

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**MIOSINAS TIPO II DE Taenia solium: ANALISIS COMPARATIVO
DE FRAGMENTOS PROTEOLITICOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

LAURA GUADALUPE GONZALEZ MALERVA

TUTORA DE TESIS: DRA. ANA FLISSER STEINBRUCH

CO-ASESOR: DR. JAVIER R. AMBROSIO HERNANDEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO D.F., MAYO 2005

m343385



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Quiero dedicar este trabajo de tesis

A toda mi familia

En especial a mi madre: por haberme traído a este mundo, apoyarme a lo largo de mi vida en cada paso que doy y sobre todo por ser ejemplo de lucha incansable

A mi abuela, quien ha sido ejemplo de fortaleza y entereza cada día

A Osmin y Vale, con quienes he vuelto a renacer

A Mary y Queta, porque han sido como una madre para mí, gracias por todo su apoyo y cuidar de mí

A Memo, gracias por siempre alentarme a desarrollarme y haberme apoyado en mis estudios

A mis tíos Toño, Beto, Jorge y Felipe, quienes siempre me dieron su apoyo y aliento a lo largo de mi carrera. Gracias por cuidar de mí siempre.

A mis tías, tíos, primos, sobrinos quienes de una u otra forma han interactuado conmigo y me han dado su apoyo

A Lau, Paty, Cris, Dulce, Vero, Oli, May, Iliana, Alex, Ale, Gerardo, Edgar, gracias por siempre estar ahí, mi mundo no sería lo mismo sin ustedes

A mis compañeros de laboratorio:

Infinidad de historias llegan a mi mente y, sin especificar nombres, estoy segura que los momentos vividos quedarán en nuestra memoria. Ha sido gratificante y divertido aprender junto a ustedes

El trabajo experimental de esta tesis se realizó en el laboratorio de la Dra. Ana Flisser en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México

Asesoría Técnica y Experimental:

- Gracias a la Biol. Olivia Reynoso, por su apoyo experimental y discusiones que tanto enriquecieron mi desarrollo.

- Gracias a la QFB Mayra Cruz, por que de ella aprendi grandes cosas, sus conocimientos y apoyo durante la realizacion de este trabajo fueron indispensables.

- Gracias al Dr. Javier Ambrosio por haber tenido la iniciativa de desarrollar esta nueva area en la que me ofreció la oportunidad de participar, ademas de ser una de las personas que siempre confio en mi y me alento a salir adelante a pesar de las adversidades.

- Gracias a la Dra. Ana Flisser quien me desafio a cada momento para al final de mi trayecto confiar en mi.

- Gracias al Dr. Guillermo Mendoza, por su apoyo, confianza y dedicación.

- Gracias al Dr. Claudio Retamal, conocerte y aprender de ti, ha sido de las mejores cosas que me han sucedido.

- Gracias al Dr. Juan Pedro Laclette por la gentil donacion del anticuerpo policlonal anti-paramiosina

Este trabajo fue apoyado económicamente por las siguientes instituciones:

- CONACYT proyecto 28094B y beca registro 130114.

- "Research Student Grant 2002" otorgado por IUPAB Task Force on Capacity Building in Biophysics.

- PAEP proyectos 201322, 202318, 202376.

- DGAPA-UNAM proyecto IN200297, IN203900, IN201003.

	Indice
TEMA	Página
I. Resumen en español	1
II. Resumen en inglés	2
III. Introducción	
1. Músculos de invertebrados	
1.1. Estructura de los músculos en invertebrados	3
1.2. Características de proteínas musculares:	4
1.2.1. Actina	5
1.2.2. Paramiosina	6
2. Miosina	
2.1. Características generales	7
2.2. Miosina convencional o tipo II	8
2.3. Isoformas	11
3. Sistema muscular en céstodos	12
4. <i>Taenia solium</i>	
4.1. Parasitosis	13
4.2. Ciclo de vida	15
4.3. Sistema muscular	18
5. Caracterización de proteínas musculares en <i>T. solium</i>	19
5.1. Actina	20
5.2. Paramiosina	21
5.3. Miosina	22
IV. Hipótesis y Objetivos	23

TEMA	Página
V. Material y Métodos	
1. Diseño experimental	24
2. Obtención de parásitos de <i>T. solium</i>	
2.1. Cisticercos	25
2.2. Cisticercos evaginados	25
2.3. Tenias	25
3. Extracción de miosina II	26
4. Obtención de la cadena pesada de miosina II	27
5. Digestión enzimática de la cadena pesada de miosina	28
6. Análisis de los péptidos de miosina	29
7. Estandarización de la técnica de digestión	29
8. Reconocimiento de péptidos con anticuerpos anti-miosina	32
9. Análisis de isoformas de miosina	33
VI. Resultados	
1. Extracción de miosina II	34
2. Obtención de la cadena pesada de miosina	37
3. Digestión enzimática de la cadena pesada de miosina	38
4. Análisis de los péptidos de miosina	42
5. Reconocimiento de péptidos con anticuerpos anti-miosina	
5.1. Anticuerpo monoclonal 4B3	44
5.2. Anticuerpo policlonal contra miosina	46
6. Análisis de isoformas de miosina	50
VII. Discusión	52
VIII. Referencias	59

Las miosinas tipo II son los componentes principales de los filamentos gruesos del músculo, son proteínas diméricas de alto peso molecular, conformadas por un par de cadenas pesadas y dos pares de cadenas ligeras. Son enzimas que transforman la energía química, producida por la degradación del ATP, en energía mecánica, lo que favorece el movimiento unidireccional sobre los filamentos de actina llevando a cabo la contracción muscular. Las miosinas son proteínas muy conservadas, sin embargo presentan regiones de variabilidad, por lo que se expresan diferentes isoformas dependiendo del tipo de tejido, estado de desarrollo y grado de actividad contráctil. En esta tesis se analizó la presencia de isoformas de la cadena pesada de miosina tipo II en los diferentes estadios de desarrollo de *Taenia solium* (Cestoda). Este parásito representa un problema serio en la salud pública de países en vías de desarrollo. La miosina fue analizada y comparada por digestión enzimática y reconocimiento con anticuerpos antimiosina. Los resultados mostraron diferencias entre las miosinas de cisticercos, cisticercos evaginados y tenias sugiriendo la presencia de isoformas. El análisis de electroforesis en geles que contenían SDS, EDTA y glicerol nos permitieron confirmar la presencia de isoformas de la cadena pesada de la miosina, ya que se encontró una sola isoforma en tenia, dos en cisticercos evaginados y tres en cisticercos. Las diferencias en los patrones de digestión, el reconocimiento con anticuerpos, el análisis electroforético y la expresión diferencial de miosinas demuestran que las isoformas de la miosina tipo II de *Taenia solium* probablemente se asocian a los requerimientos fisiológicos de cada estadio de desarrollo.

Type II myosin, the primary component of the thick filament of muscle fibers, is organized as a dimeric high molecular weight protein, and is composed of a pair of heavy chains and two pairs of light chains. Myosin II transforms ATP energy into mechanical force to generate muscular contraction through the unidirectional movement towards actin filaments. Myosins are conserved proteins but they have variable regions and various isoforms are expressed. The expression of myosin isoforms depends on the type of tissue, developmental stage and degree of contractile activity. In this thesis, the presence of heavy chain isoforms of type II myosin in the different developmental stages of *Taenia solium* (Cestoda) was analyzed. This parasite represents a serious public health problem in many developing countries. Myosin was compared using proteolytic fragmentation, and recognition by antibodies. The results obtained showed differences between cysticerci, evaginated cysticerci and tapeworms that suggest the presence of isoforms. Electrophoretic separation in SDS gels containing EDTA and glycerol allowed us to confirm the presence of isoforms. One isoform was found in the tapeworm, two in evaginated cysticerci and three in cysticerci. The differences in digestion patterns, antigenic reactivity and differential expression of isoforms demonstrate that isoforms of type II myosin in *Taenia solium* are probably associated to physiological requirements of each developmental stage.

1. Músculos de invertebrados

1.1. Estructura de los músculos en invertebrados

Las células musculares de invertebrados pueden ser divididas en tres clases principalmente con base en el patrón de estrías que presentan y pueden ser: transversalmente estriadas, oblicuamente estriadas o músculo liso. De los músculos de invertebrados, los transversalmente estriados tienen líneas Z discontinuas o continuas, estos últimos son los que más se parecen al músculo esquelético de vertebrados. Los músculos oblicuamente estriados consisten de filamentos gruesos y delgados compuestos por células mononucleadas. Los miofilamentos forman sarcómeros delimitados por líneas Z, los cuales no son perpendiculares a estas líneas, sin embargo son oblicuos, por lo que las bandas A e I se pueden ver juntas en cada uno de los tres planos espaciales. Las células del músculo liso tienen un núcleo central y miofilamentos gruesos y delgados abundantes sin aparentes sarcómeros (Paniagua et al., 1996). Las miofibrillas que conforman el aparato contráctil del músculo liso están alineadas lateralmente y son menos regulares que las miofibrillas de los músculos estriados de vertebrados. Esta irregularidad se ha relacionado directamente con la alta cantidad de paramiosina contenida en los miofilamentos gruesos de invertebrados y se ha propuesto que esta diferencia podría ser la responsable de las diferencias que existen en los deslizamientos de los miofilamentos durante la contracción (Lowy y Hanson, 1962).

1.2. Características de proteínas musculares

Las características más relevantes de la musculatura de invertebrados son los miofilamentos gruesos y delgados. La constitución de estos miofilamentos recae básicamente en tres tipos de proteínas: actina, miosina y paramiosina. Estas proteínas fibrosas forman filamentos largos, los cuales están constituidos y ordenados por la asociación de subunidades proteicas. Los miofilamentos gruesos pueden medir de 2.2-6 μm de longitud y 14-231 nm de ancho, están constituidos por paramiosina a diferencia de los vertebrados, la cual se encuentra formando el corazón e interactúa con la miosina, localizada en la superficie de la miofibrilla. Los filamentos gruesos son homogéneos en los músculos transversalmente estriados y homogéneos o fusiformes en los oblicuamente estriados así como en el músculo liso. Los miofilamentos delgados miden 6 nm de diámetro. Los filamentos contienen tropomiosina y solamente en los músculos estriados también troponina.

La relación entre filamentos gruesos y delgados varía de 3-1 y de 6-1 en músculo liso. Las placas de anclaje en los filamentos (líneas Z en músculo estriado o cuerpos electrodensos en músculo liso) contienen α -actinina. El músculo estriado (transversalmente u oblicuamente) presenta grandes sarcómeros (mayores a 9 μm) y el número de filamentos delgados alrededor de cada filamento grueso varía de 3-12, por lo tanto cada filamento delgado lo comparten 2 filamentos gruesos. Las líneas Z en estos músculos estriados muestran una gran variedad de estructuras que difieren de una especie a otra, por ejemplo en los haces de filamentos en nemátodos, las barras en anélidos y pequeños parches en moluscos. Muchos músculos estriados contienen además titina (conectina), filamentos intermedios y disponen de un sistema

sarcotubular que consiste de túbulos T y retículo sarcoplásmico. La localización de los túbulos T así como la distribución del retículo sarcoplásmico varía entre los músculos y las especies. El músculo liso de invertebrados difiere de los vertebrados principalmente en que los miofilamentos gruesos están en gran proporción, tienen diámetro largo, son fusiformes y varían en tamaño y número entre las células.

1.2.1. Actina

Es una proteína evolutivamente muy conservada y sólo presenta pocas variaciones en los primeros 10 aminoácidos del extremo amino terminal. Esta variabilidad permite la interacción con otras proteínas como las miosinas (Sheterline et al., 1998; Mounier y Sparrow, 1997). Se han encontrado varios genes que codifican a estas proteínas, las cuales sufren modificaciones postraduccionales, principalmente por acetilación del residuo amino terminal y/o mutación de una de sus histidinas, lo cual explica la presencia de isoformas. Estas isoformas mantienen tanto sus propiedades físicas y químicas, como el sitio de unión con ATP y la conformación tridimensional para la interacción con proteínas que se asocian a ellas. Los monómeros de actina G se asocian entre sí para formar los microfilamentos y dan origen a la actina filamentosa ó actina F (Bray, 2001). En lo referente a los genes que codifican a estas proteínas se han encontrado organismos que presentan el mismo número de genes que de proteínas, sin embargo algunos organismos contienen un solo gen que codifica a diferentes proteínas (Bray, 2001).

1.2.2. Paramiosina

La paramiosina se asocia estrechamente a la miosina en el interior de los miofilamentos gruesos, el ensamblaje depende en parte de regiones periódicas cargadas que se localizan en la porción α -hélice del tallo de ambas proteínas (Figura 1). Según lo reportado, existe una pequeña región cerca del extremo carboxilo-terminal que es crítica para el ensamblaje y solubilización de ambas proteínas, esta región está conformada por una secuencia conservada de aminoácidos cargados (EEAEE en músculo estriado de vertebrados, DEATE en músculo liso y no muscular; EDAEE en invertebrados, Cohen y Parry, 1998). La paramiosina es la proteína estructural más conservada, a diferencia de la miosina no tiene actividad ATPasa, no interactúa con actina y su importancia biológica, determinada en los moluscos que la contienen en grandes cantidades, es permitir que los músculos mantengan la contracción por períodos de tiempo prolongados sin requerir de mucho gasto energético, ya que al parecer puede modular la actividad ATPasa (Szent-Györgyi et al., 1971; Dowben, 1969).

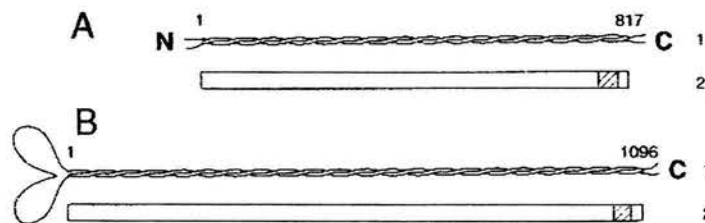


Figura 1. Estructura de paramiosina y miosina. Las moléculas de paramiosina (A) y miosina (B) son proteínas superenrolladas en α -hélice (1) las cuales presentan una alta homología (cuadro amarillo) en la región carboxilo terminal (2), sitio propuesto como dominio de ensamblaje de competencia, que se considera como una región crítica para la solubilidad y ensamblaje de estas proteínas (Tomado y modificado de Cohen y Parry, 1998).

2. Miosina

2.1 Características generales

Las miosinas son enzimas que transforman la energía química, producida por la degradación del ATP, en energía mecánica, lo que favorece el movimiento unidireccional sobre los filamentos de actina. Son proteínas motoras que participan en el movimiento celular, la contracción muscular, el transporte de organelos a través de membrana y la transducción de señales. Las miosinas están conformadas por tres dominios funcionales: la cabeza ó región globular, es la zona más conservada y es el sitio donde reside la unión hacia ATP; el cuello, sitio donde reside la región de bisagra, permite que la molécula se flexione y realice el movimiento en forma de palanca al interactuar con los filamentos delgados, y el tallo, que es la porción carboxilo terminal de la molécula y corresponde a la región filamentosa, estructurada en α -hélice. Este último se considera el sitio de variabilidad entre las miosinas que determina la localización, función y formación de filamentos en soluciones de baja fuerza iónica (Alberts et al., 2002; González Malerva y Ambrosio, 2003; Holmes, 1996; Sellers, 1999).

Las miosinas presentan diferentes características entre las que se encuentran: a) cambios estructurales dependiendo de su ubicación celular, b) posibilidad de asociarse o no en fibras, y c) distribución tanto en células musculares como no musculares, en organismos que van desde levaduras hasta células especializadas (Cameron et al., 2003). En la actualidad se ha descrito una superfamilia de miosinas conformada por 17 clases de miosinas (Figura 2) con base en la homología de las secuencias de los genes de la

región globular de estas proteínas (Hodge y Cope, 2000). Esta clasificación demuestra su gran variabilidad y diversidad biológica (Andersen et al, 2000; Moore et al., 1992; Kimura et al., 1991). Se conocen como miosinas convencionales a las miosinas tipo II localizadas en el músculo, las demás se denominan miosinas no convencionales.

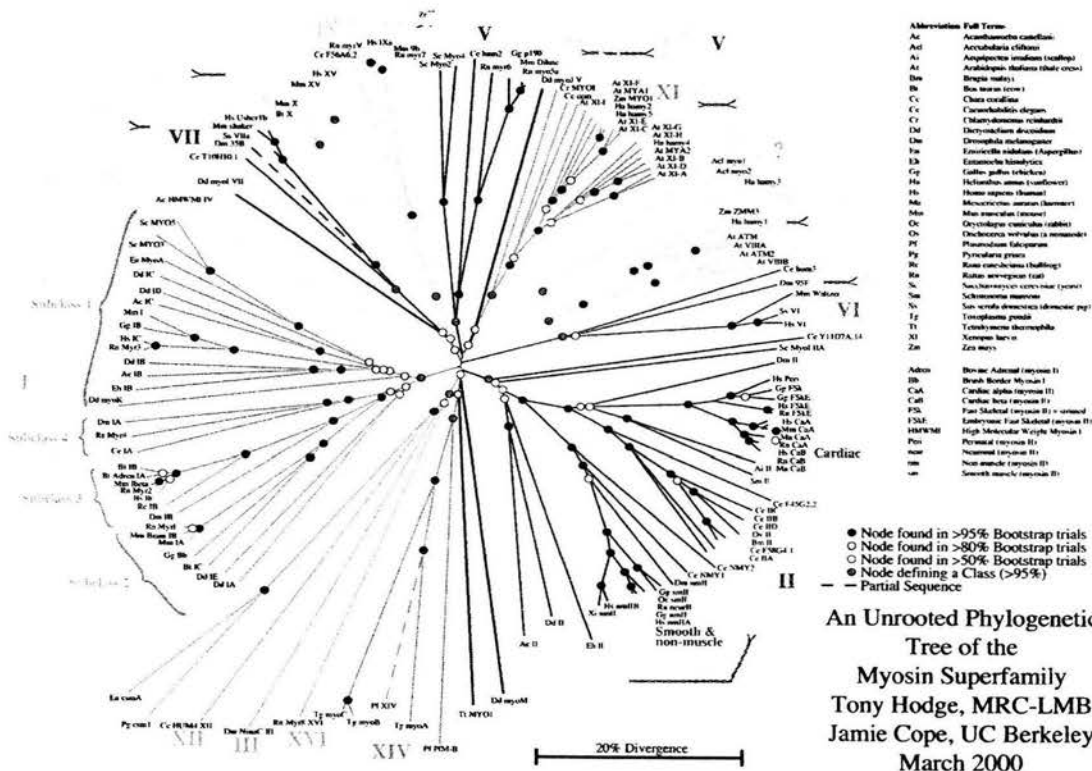


Figura 2. Superfamilia de miosinas. Árbol filogenético de miosinas donde se observan las 17 familias de miosinas descubiertas hasta ahora, las cuales están agrupadas con base en la homología que tienen en la región de la cabeza (Imagen tomada de Hodge y Cope, 2000).

2.2. Miosina Convencional o Tipo II

Las miosinas convencionales o miosinas II son moléculas hexaméricas que consisten de dos cadenas pesadas, dos ligeras y dos regulatorias. Por conveniencia, han sido subdivididas en 4 subclases según de donde provengan: 1) músculo esquelético vertebral y cardíaco; 2) músculo liso vertebral y no muscular; 3) músculo invertebrado y 4) protozoarios. Aún cuando este tipo de proteínas presentan diferencias en cuanto al tejido en el que se encuentran, están conformadas por los tres dominios funcionales descritos anteriormente (Figura 3).

La actividad de ATPasa de las miosinas es diferente dependiendo del tipo de tejido u organismo en el que se encuentra; por ejemplo, en los moluscos, dicha actividad esta influenciada por la paramiosina, la cual es capaz de disminuir la actividad de ATPasa, éste fenómeno se ha descrito como “catch” y es un mecanismo de contracción muscular en el que la relajación muscular es muy lenta, la contracción se mantiene más tiempo y requiere menos energía para llevarse a cabo (Cohen, 1982; Szent-Györgyi et al., 1971).

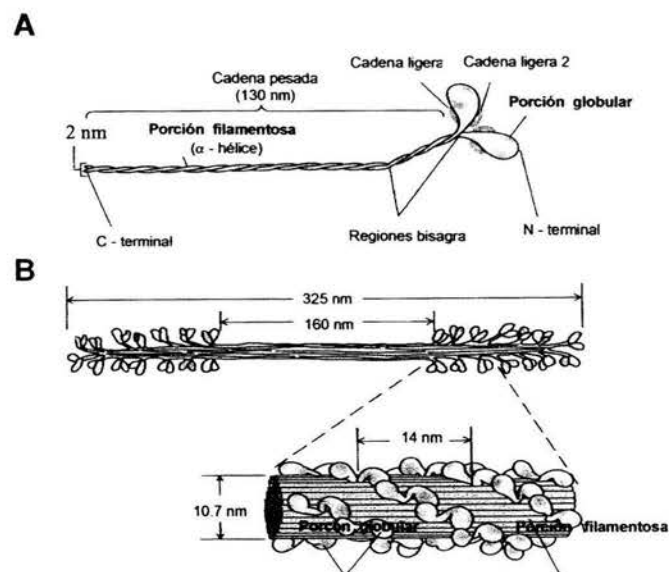


Figura 3. Estructura de Miosina II. Esta imagen muestra la miosina convencional ó II (A) y la interacción entre las miosinas para la formación de filamentos gruesos (B) (Imagen tomada de Lodish, 2001).

Las miosinas son susceptibles a la proteólisis enzimática principalmente en las regiones de bisagra que corresponden a las uniones cabeza-tallo (meromiosina pesada/meromiosina ligera, MMP-MML) y cabeza-cuello (subfragmento 1/subfragmento 2, S1-S2) (Figura 4), lo que ha permitido definir que regiones de la proteína están asociadas a propiedades específicas tales como el sitio de actividad ATPasa, los sitios de fosforilación (Barylko et al., 1986; Peltz et al., 1981) que regulan dicha actividad y la formación de filamentos gruesos. Los mapas peptídicos generados por la digestión enzimática de miosinas II de músculo liso y esquelético han permitido establecer que los perfiles de digestión podrían estar relacionados con las propiedades contráctiles características de cada una de estas proteínas, lo que está asociado al tipo de músculo analizado. Esta estrategia de análisis molecular de miosinas ha demostrado ser una herramienta útil para estudiar la variabilidad molecular de las miosinas (King et al., 1995).

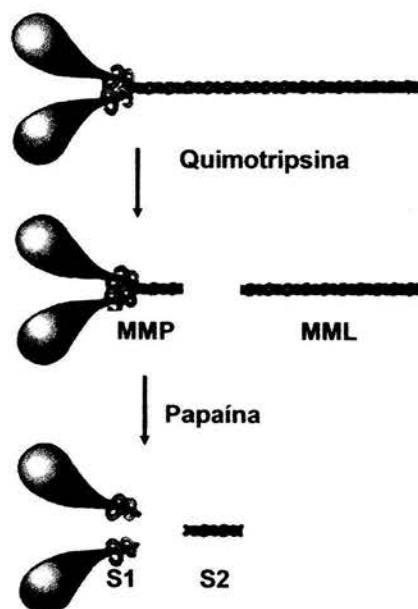


Figura 4. Digestión enzimática de miosina II. Las uniones cabeza-tallo y cabeza-cuello dan origen a los fragmentos MMP-MML y S1-S2 respectivamente (Imagen de Lodish et al, 2001).

2.3. Isoformas

La expresión de las isoformas de la cadena pesada de la miosina (CPM) depende en gran medida del estado de desarrollo del tejido en el que se encuentren, así como del tipo o grado de actividad contráctil y de las características histológicas del tejido (Kimura et al., 1991; Winkelmann et al., 1983, Ardizzi and Epstein, 1987). Sin embargo también se ha observado que la expresión de éstas esta influenciada por la presencia de hormonas o bien cuando se presentan enfermedades específicas (Babu et al., 2000; Amer et al., 2003). Por estas características se han convertido en una importante área de investigación. En vista de que las isoformas se originan por expresión diferencial de los genes o por modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación, se puede afectar la actividad contráctil del músculo donde se encuentren (Schiaffino y Reggiani 1996; Sellers 1999).

La técnica de electroforesis de Laemmli (Laemmli, 1970) en geles de poliacrilamida en presencia de SDS ha sido utilizada para determinar la CPM de diferentes músculos, Burridge y Bray (1975) fueron los primeros en observar diferencias en las movilidades electroforéticas de la CPM de músculo liso y esquelético. Actualmente se han desarrollado diversas técnicas que permiten mejorar la resolución de la CPM, con la finalidad de conocer el número de isoformas que se expresan en el músculo de diferentes organismos (Picard et al., 1999; Kubis and Gros, 1997; Blough et al., 1996; Talmadge and Roland, 1993). Además, para completar la caracterización de isoformas, se han realizado múltiples esfuerzos para obtener anticuerpos contra éstas, sin

embargo muchos tienen reacción cruzada con otras isoformas (Kimura et al., 1991; Murakami et al., 1991; Winkelmann et al., 1983;) por lo que la herramienta principal ha sido la resolución de la CPM en electroforesis.

3. Sistema muscular en céstodos

Los sistemas musculares que se han descrito en algunos platelmintos (monogeneos, digeneos y céstodos) son de tipo liso, los cuales, al igual que los sistemas de músculo-esquelético y cardíaco (los otros tipos de sistemas musculares de vertebrados), están constituidos por miofilamentos gruesos y delgados (Lowy y Hanson, 1962; Huxley, 1957). A diferencia de los otros sistemas musculares mencionados, la musculatura lisa se caracteriza por la plasticidad de sus movimientos, en contraste con la rigidez de otros músculos, además el músculo liso es capaz de mantener una contracción prolongada utilizando el mínimo de energía (Morano 2003; Szent-Györgyi et al., 1971). Las miosinas que conforman el músculo liso tienen propiedades únicas, por ejemplo, la cadena ligera debe estar fosforilada por la calmodulina- Ca^{2+} dependiente de la cadena ligera de cinasa, esto es un prerrequisito para la activación y contracción muscular. En ensayos de motilidad *in vitro* se reportó que tanto la velocidad de contracción como la de deslizamiento sobre actina de las miosinas de músculo liso son por lo menos un grado de magnitud menor que las miosinas que conforman el músculo esquelético (Morano, 2003).

La musculatura de los platelmintos incluye la musculatura somática, responsable de la forma y movimiento, la de los órganos adhesivos, y la de los sistemas reproductor y digestivo (Mair et al., 1998). El sistema muscular somático es en general el más desarrollado y las fibras que lo constituyen se

encuentran ubicadas en capas internas del tejido parasitario. En parásitos se han descrito diferentes tipos de fibras musculares dependiendo de su localización y estructuración; en todos los casos se ha visto que predominan las longitudinales, las cuales frecuentemente se encuentran estratificadas en capas externas o corticales e internas o medulares, junto con fibras dorsoventrales y transversales, y raramente, con las diagonales. El sistema muscular no somático, que incluye órganos adhesivos como las ventosas, está formado por fibras musculares que presentan una constitución más compleja, mientras que la contracción de las fibras orientadas en forma meridional, ocasiona la apertura de los bordes de las ventosas; la contracción de las fibras orientadas ecuatorialmente en conjunto con las radiales, ubicadas por dentro y por fuera de los bordes, permiten que la ventosa adquiera la forma de una copa de succión. La distribución de estas fibras refleja la funcionalidad del músculo en el que se encuentran. En el sistema reproductor y digestivo, las fibras musculares son de tipo circular y algunas de tipo longitudinal, se encuentran regularmente en la parte interna; estas fibras participan en la apertura y cerrado de esfínteres. Otros sitios como la faringe y el cirro o pene están formados por fibras de tipo radial, lo que permite que éstos órganos realicen las funciones que requieren (Halton et al., 1998).

4. *Taenia solium*

4.1. Parasitosis

Taenia solium es un parásito que causa dos infecciones: la cisticercosis y la teniosis. La cisticercosis se considera un problema de salud pública en

México y en otros países en vías de desarrollo (Flisser, 2002). La neurocisticercosis es la parasitosis más frecuente en el sistema nervioso central. Se ha demostrado que dos de cada tres casos de neurocisticercosis cursan con epilepsia de inicio tardío, aunque esta enfermedad genera también otros síntomas y signos neurológicos diversos, lo que dificulta su diagnóstico y el manejo de los pacientes. Estas características le confieren una gran importancia clínica a la neurocisticercosis, por lo que se han realizado muchos esfuerzos para conocerla y entenderla. Por otro lado la cisticercosis porcina es causa de decomiso de canales de cerdo con las consecuentes pérdidas económicas, especialmente a población rural de bajos recursos (Flisser, 1994; Flisser et al., 1997; Flisser 2002). Ambas enfermedades parasitarias están estrechamente asociadas ya que se ha demostrado que los portadores de la tenia intestinal en el entorno familiar son el principal factor de riesgo para adquirir cisticercosis (Flisser, 2002; Sarti, 1997; Schantz et al., 1992). Paradójicamente la teniosis prácticamente no genera sintomatología clínica, lo que dificulta la detección y tratamiento de estos portadores, aunque es de suma importancia para el control de la cisticercosis, ya que actualmente esta parasitosis ha cobrado importancia como una enfermedad emergente o re-emergente en países desarrollados, por lo que la *Taenia solium* debe ser controlada, y mejor aún, erradicada (Simanjuntak et al., 1997; White, 1997). Debido a la importancia de las enfermedades parasitarias que produce *T. solium*, se ha tratado de profundizar en la biología de estos parásitos pues se considera que los conocimientos obtenidos puedan generar estrategias que permitan apoyar el desarrollo de tecnología útil para la prevención y control de

las enfermedades que producen los diferentes estadios parasitarios de *T. solium*.

4.2. Ciclo de vida

Este céstodo presenta dos estadios de desarrollo que causan enfermedad: la forma larvaria o cisticerco y el adulto o tenia. Mientras que los cisticercos se pueden alojar en el ojo, el músculo o el cerebro, la tenia se aloja en el intestino causando la teniosis. Cuando los cisticercos se alojan en el cerebro producen la neurocisticercosis, la forma más maligna de las infecciones producidas por *T. solium* (Flisser, 1994). El tercer estadio de este parásito, que son los huevos, se desalojan con la materia fecal y se encuentran en el medio ambiente, aunque aún no se ha definido su distribución ni el mecanismo de infección.

El ciclo de vida de *T. solium* se inicia cuando un ser humano ingiere carne de cerdo insuficientemente cocida, contaminada con cisticercos. Los cisticercos se reconocen a simple vista, tienen forma esférica u ovalada, son vesículas en cuyo interior se encuentra el escolex invaginado, rodeado de fluido vesicular. Gracias a las condiciones de pH ácido y a los componentes de la bilis, el cisticerco evagina y se adhiere al primer tercio del intestino delgado (Smyth y McManus, 1989). Se considera que sólo uno de los cisticercos se establece en el intestino y se convierte en el parásito adulto o tenia. La porción cefálica de la tenia se ancla a las vellosidades del epitelio intestinal con la doble corona de ganchos del rostelo, debido a la forma invertida que éstos presentan, y con las ventosas musculares situadas bajo el cono rostelar (Cañedo et al., 1982; Merchant et al., 1998). La tenia crece en el intestino hasta alcanzar

alrededor de un par de metros, tiene la apariencia de un listón blanco y plano. Después de 4 meses esta completamente desarrollada e inicia la expulsión de proglótidos grávidos. A partir del cuello, se desarrollan los proglótidos, los cuales son considerados como unidades reproductoras, ya que contienen órganos sexuales masculinos y femeninos (Willms y Sotelo, 2001), y por su grado de madurez se dividen en inmaduros, maduros y grávidos. Los proglótidos más cercanos al cuello se denominan inmaduros porque aún no se han formado los órganos sexuales. Los proglótidos maduros han desarrollado los órganos sexuales y se convertirán en grávidos, los cuales contienen los huevos, y son liberados con la materia fecal de manera periódica (Flisser et al., 1997). No se sabe cuánto dura la teniosis, se considera que es de larga duración, pero esta información se obtuvo con la otra especie de tenia que infecta a humanos, la *T. saginata*. Los huevos que son microscópicos, se liberan al medio ambiente dentro de los proglótidos grávidos, en donde resisten las condiciones ambientales por largos tiempos, excepto en épocas de intenso calor y sequías, o temperaturas muy bajas. Esto se debe a que están cubiertos por diversas capas. La capa más externa, llamada embrióforo, es degradada por enzimas del tracto digestivo del hospedero, liberando el embrión (Laclette et al., 1982). El embrión, eclosiona de la membrana oncosférica y la larva recién eclosionada inicia movimientos activos con los ganchos y produce vacuolas que contienen enzimas. En principio, los movimientos, los ganchos y las enzimas permiten que las larvas atraviesen el epitelio intestinal para llegar a la circulación sanguínea o linfática, por donde circulan por períodos cortos y se establecen en diversos tejidos en donde los parásitos se convierten en cisticercos (Figura 5). En los pacientes de América Latina se localizan los

cisticercos principalmente en el sistema nervioso central y en el ojo, mientras que en Asia, existen muchos casos de cisticercosis muscular.

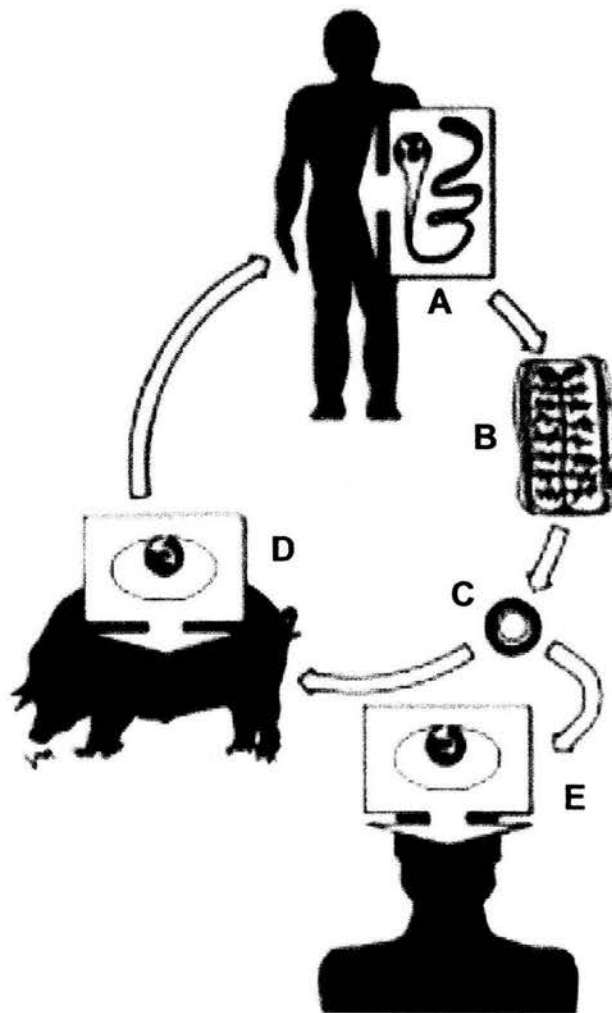


Figura 5. Ciclo de vida de *Taenia solium*. El parásito adulto o tenia (A) se aloja en el intestino delgado del ser humano, la tenia, que mide varios metros de longitud, libera periódicamente proglótidos grávidos (B). Cada proglótido contiene alrededor de 60,000 huevos (C), los proglótidos y los huevos son liberados en la materia fecal. Cuando los cerdos ingieren proglótidos enteros, los huevos se transforman en cisticercos principalmente en el músculo esquelético, pero también en el cerebro y en el ojo (D). Accidentalmente el ser humano puede ingerir huevos, los cuales se transforman en cisticercos y causan neurocisticercosis, oftalmocisticercosis y cisticercosis muscular (E). Cuando una persona ingiere carne de cerdo insuficientemente cocida que contiene cisticercos, los cisticercos evaginan y el escólex de la

tenia se fija en el intestino, transformándose en 4 meses en el parásito adulto, completamente desarrollado e infectivo (Tomado y modificado de Aluja et al., 1987).

4.3. Sistema muscular

Aún cuando en este céstodo se han observado diferentes sistemas musculares, éstos no han sido clasificados; sin embargo las características morfológicas que presenta la *Taenia solium* podrían corresponder a sistemas musculares de tipo liso, igual que lo descrito en otros organismos invertebrados (Lumsden y Byram 1967; Mair et al., 1998). La importancia de este sistema muscular en los parásitos, se manifiesta en diferentes actividades, por ejemplo durante el establecimiento en el hospedero y en el proceso de evaginación. La evaginación permite que el cisticerco desenrolle el escólex invaginado favoreciendo la transformación en el parásito adulto o tenia (Figura 6) consecuente, ocasionando una serie de cambios morfológicos y fisiológicos (Rabiela et al., 2000). Los movimientos que desarrollan los parásitos durante estos fenómenos de contracción muscular requieren de la participación de proteínas contráctiles como actina, paramiosina y miosina II, proteínas musculares que ya han sido caracterizadas (Laclette et al., 1990; 1991; 1992; 1995; Ambrosio et al., 1997; 2003; Gonzalez-Malerva et al., 2004). Dichas proteínas presentan características biológicas asociadas al desarrollo de los diferentes estadios parasitarios: cisticercos, cisticercos evaginados y tenias (Ambrosio et al, 2003; Gonzalez-Malerva et al, 2004) y permiten que los parásitos realicen diferentes actividades musculares, como en el caso de las tenias, que se mantienen ancladas al intestino del hospedero y resisten los movimientos peristálticos resistiendo de esta forma a las presiones del microambiente del hospedero.

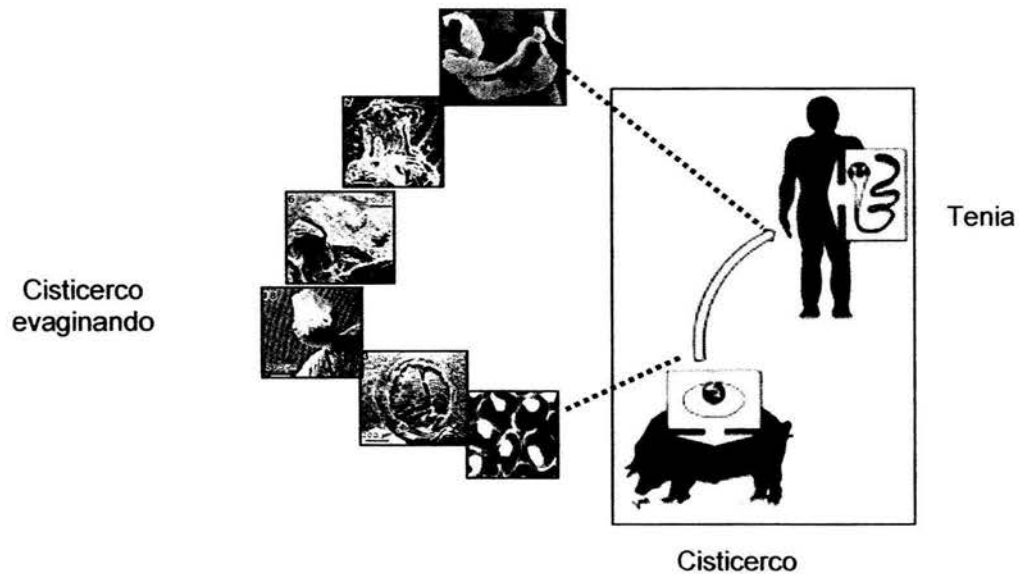


Figura 6. Evaginación de un cisticerco para transformarse en tenia. Los seres humanos se infectan accidentalmente por la ingestión de carne de cerdo contaminada con cisticercos. El cisticerco se transforma en tenia gracias a las condiciones microambientales proporcionadas por el aparato digestivo del hospedero (Flecha gruesa y continua). Las imágenes presentadas en forma secuencial (dentro de las líneas punteadas) muestran los pasos que sigue el cisticerco para transformarse en tenia, que incluyen la evaginación y el anclaje del escólex en el intestino, que son procesos fundamentales para el desarrollo de la tenia (Tomado y modificado de Aluja et al., 1987 y Lacleite et al, 1982).

5. Caracterización de proteínas musculares en *T. solium*

En la actualidad no existen muchos estudios de caracterización de proteínas musculares en céstodos. Sin embargo estas proteínas filamentosas y contráctiles son parte importante del sistema muscular de los platelmintos y representan blancos atractivos para el tratamiento quimioterapéutico, cuyo objetivo principal es minimizar o eliminar la capacidad de movimientos de los parásitos, que les permiten alimentarse, reproducirse y sobrevivir dentro del

hospedero. Aunque el efecto sobre la motilidad se emplea frecuentemente para evaluar la eficacia de drogas antihelmínticas, se desconocen los mecanismos que controlan la musculatura del parásito (Mair et al., 1998). Probablemente una mejor caracterización molecular de las proteínas musculares de *T. solium* permitirá reabordar aspectos relacionados con la detección de los parásitos y su tratamiento como se ha demostrado en la detección de miosina II liberada por tenias (Ambrosio et al, 1997) y cisticercos (Moran, 1999, Reyes 2000). Los avances que se obtengan durante la caracterización de estas proteínas generarán mayor conocimiento sobre la fisiología de los parásitos y la posibilidad de diseñar y desarrollar otros fármacos que permitan eliminarlos de una manera más eficiente y económica en comparación con los fármacos empleados en la actualidad.

5.1. Actina

Hasta ahora se han identificado dos genes de *T. solium* que codifican para actina PAT 5 y PAT 6, los que han sido aislados y secuenciados (Campos et al., 1990). Estos genes muestran una gran homología con los genes reportados para el céstodo *Diphyllobotrium dendriticum* (Wahlberg y Johnson, 1997; Wahlberg et al., 1994) y para el tremátodo *Schistosoma mansoni* (Oliveira y Kemp, 1995). Un estudio reciente sobre el análisis de la expresión de actina en cisticercos mostró la presencia de 7 isoformas (Ambrosio et al., 2003), que podría ser indicativo de que existen más genes que estén codificando para esta proteína o bien que la proteína tenga modificaciones post-transduccionales que den origen a las isoformas encontradas. Se han reportado resultados preliminares de la detección de isoformas en cisticercos,

cisticercos evaginados y tenias. Estos datos sugieren que las isoformas de actina presentan una expresión diferencial durante el desarrollo de los parásitos (Reynoso-Ducoing, comunicación personal) similar a lo demostrado por hibridización *in situ* en *D. dendriticum* (Wahlberg, 1997). Estas isoformas podrían estar asociadas con los requerimientos fisiológicos del parásito e incluso influir en la relación hospedero-parásito (Ambrosio et al., 2003). La distribución de actina F en cisticercos, es semejante a lo descrito en miosina II (Ambrosio et al, 1997; 2003) y paramiosina (Laclette et al., 1995) aunque no existen estudios que muestren la colocación de estas proteínas, tal y como se ha demostrado en el nemátodo *C. elegans*, que indica que éstas proteínas interaccionan entre sí en los músculos de invertebrados (Epstein et al., 1985).

5.2. Paramiosina

La paramiosina es una proteína que ha sido ampliamente estudiada en *T. solium* y aunque se conoce la secuencia de aminoácidos (Laclette et al., 1995, 1991; Landa et al., 1993) aún no se ha definido su función en la contracción muscular. Es una proteína antigénica reconocida por la mayoría de los sueros de pacientes con neurocisticercosis y de cerdos infectados (Flisser et al., 1980), se le ha denominado Antígeno B (Laclette et al., 1989; Guerra et al., 1982). Además se ha asociado con otros fenómenos de tipo inmunológico (Landa et al., 1993; Laclette et al., 1992, 1990), aunque se desconoce como es secretada (Laclette et al., 1991).

5.3. Miosina

La primera evidencia experimental de la existencia de miosina II en diferentes estadios parasitarios de *T. solium* se logró durante la caracterización

realizada con el anticuerpo monoclonal 4B3 (AcM 4B3) producido contra extractos crudos de parásitos adultos; los estudios permitieron tanto la identificación como la caracterización parcial de ésta proteína (Ambrosio et al., 1997; Cruz, 1995). Con la caracterización de otro anticuerpo monoclonal (AcM) producido contra el mismo tipo de antígenos (AcM 12DO1), se encontró que ambos AcM's reconocían miosina y paramiosina de cisticercos, sin embargo lo hacían de forma diferente, lo cual indica diferencias en las proteínas en estudio (González, 1998). La miosina podría tener un papel importante en la parasitosis, tanto para el diagnóstico como para el control de las mismas, ya que existen evidencias de que la proteína ha sido identificada en materia fecal y en el suero de hámsteres infectados experimentalmente (Ambrosio et al, 1997; Martínez, 1998; Reyes, 2000).

La presente tesis tiene por objetivo continuar con la caracterización de esta proteína, por medio de la determinación de los perfiles de digestión de las miosinas tipo II en los diferentes estadios de desarrollo de *T. solium*, y la identificación de isoformas, ya que éstas podrían influir en los movimientos musculares que llevan a cabo los parásitos. Esto se debe a que, aunque ambos estadios del parásito tienen movimiento, los sitios del hospedero en donde habitan ambos parásitos sugieren que el cisticerco tiene poco movimiento pues está básicamente inactivo, mientras que la tenia, que se fija al intestino delgado por la porción cefálica, y cuyo estróbilo está encima o cercano a la mucosa, y en ocasiones en espiral a lo largo del intestino, seguramente mantiene una actividad muscular continua y dinámica que le permite resistir los movimientos intestinales (Andreassen, 1998; Flisser, 1995; Merchant et al. 1998).

Hipótesis

Las miosinas tipo II de *Taenia solium* presentan diferencias bioquímicas que influyen en la actividad muscular desarrollada por los parásitos según su estadio de desarrollo.

Objetivo General

Comparar el perfil de digestión enzimática de miosina tipo II de *Taenia solium* en cisticercos, cisticercos evaginados y tenias, y determinar si hay diferencias que pudieran influir en la actividad muscular desarrollada por los parásitos.

Objetivos Particulares

- 1.- Extraer miosina tipo II de cisticercos, cisticercos evaginados y tenias.
- 2.- Obtener la cadena pesada de miosina.
- 3.- Evaluar los perfiles de digestión enzimática de la miosina con quimotripsina para cada uno de los estadios de desarrollo.
- 4.- Analizar y comparar cada uno de los perfiles de digestión.
- 5.- Evaluar el reconocimiento de los péptidos obtenidos con anticuerpos anti-miosina.
- 6.- Analizar la presencia de isoformas de miosina II en cada estadio de desarrollo.

1. Diseño experimental

En la figura 7 se muestra el diseño experimental de este estudio. A partir de cerdos infectados se obtuvieron cisticercos, unos se usaron directamente, otros se sometieron a evaginación, y otros más se usaron para infectar hámsteres y obtener tenias. Con todos estos parásitos se extrajo y purificó miosina, la cual fue sometida a diversos procesos analíticos.

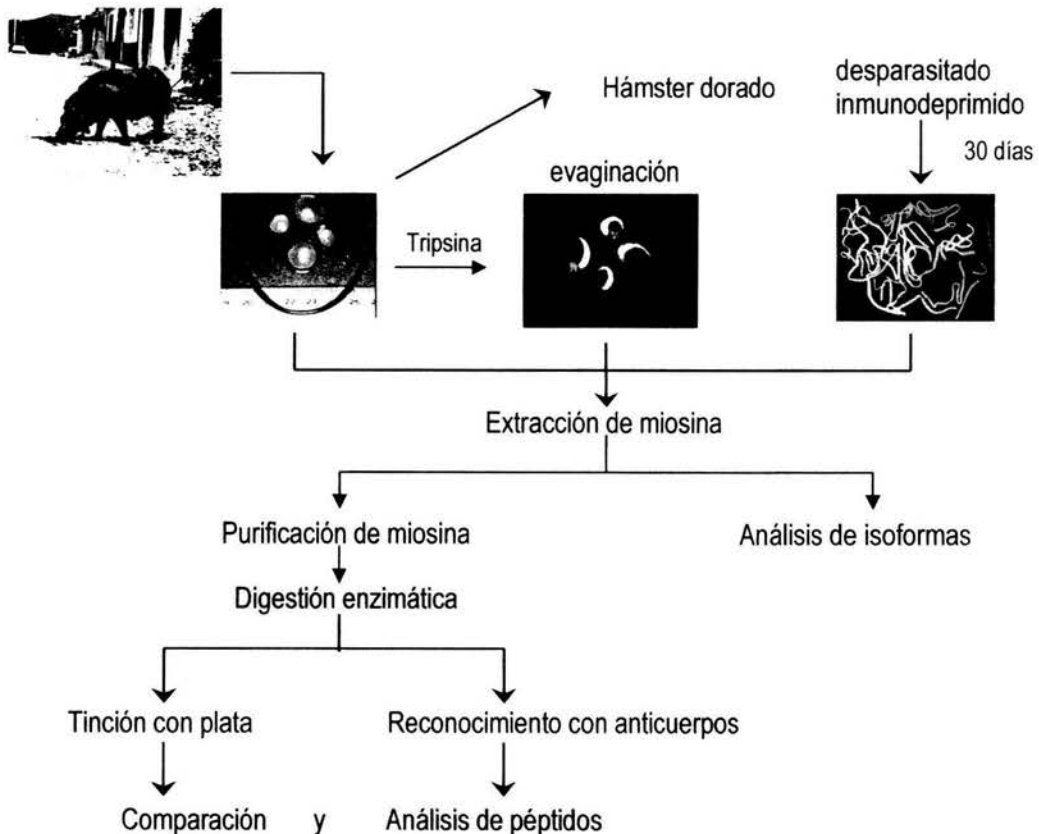


Figura 7. Diseño experimental para caracterizar isoformas de miosina tipo II. Este diagrama incluye la obtención de los diversos estadios parasitarios y las metodologías usadas.

2. Obtención de parásitos de *T. solium*

2.1. Cisticercos

Se utilizaron cerdos con cisticercosis diagnosticada por palpación de lengua, se sometieron a necropsia bajo condiciones éticas y los cisticercos se recuperaron del músculo esquelético. Con la finalidad de evitar la contaminación de los parásitos con tejido del hospedero, la disección se hizo cuidadosamente y se les retiró la cápsula inflamatoria que los rodeaba, si era necesario. Posteriormente, los parásitos se lavaron con solución salina 0.15 M amortiguada con fosfatos de sodio 0.01 M, pH 7.2 (SSAF) y se separaron en diferentes grupos dependiendo de los estudios a realizar: algunos se utilizaron para inducir la evaginación *in vitro*, otros para la infección experimental de hámsteres dorados y finalmente otros se emplearon para la extracción de miosina II, por lo que se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

2.2. Cisticercos evaginados

Los cisticercos se lavaron con SSAF y se colocaron en una solución que contenía tripsina al 0.1% (Sigma) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante una hora aproximadamente o bien hasta la evaginación completa de los parásitos (Cañedo et al., 1982). Los parásitos evaginados se lavaron con SSAF y se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para emplearlos en la extracción de miosina.

2.3. Tenias

Para la infección experimental se emplearon hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*) de 10 semanas de edad, desparasitados con praziquantel (Cesol, Merck) a una dosis de 30 mg/kg una semana previa a la infección experimental. Para mantener la infección experimental los hámsteres

se inmunodeprimieron con 2 mg de acetato de metilprednisolona administrado por vía intramuscular (Depomedrol, Pharmacia & Upjohn) a intervalos de 15 días. Después de aplicar la primera dosis del inmunodepresor cada hámster se infectó por vía oral con 8 cisticercos viables. A los 30 días post-infección los animales fueron sacrificados y las tenias recuperadas del primer tercio del intestino delgado (Maravilla et al., 1998). Las tenias se lavaron con SSAF hasta eliminar los restos del intestino y se congelaron a -20 °C para emplearlas en la extracción de miosina.

3. Extracción de miosina II

La extracción se llevó a cabo utilizando el método descrito por Szent Györgyi y colaboradores (1971) para la obtención de proteínas musculares de moluscos, al cual se le hicieron algunas modificaciones. Los cisticercos, cisticercos evaginados y tenias se colocaron por separado en un homogenizador de tejidos (Polytron, Brinkmann) a velocidad media (7) durante 10 seg con una solución fría de KCl 40 mM, MgCl₂ 1 mM, solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.01 M pH 7.2 (SAF) 6.7 mM pH 7.4, en presencia de un coctel de inhibidores de proteasas sin EDTA (Incomplete, Roche), en una proporción de 1:2 (tejido: solución de homogenización) en presencia de un baño de hielo con la finalidad de evitar la degradación de las proteínas. La suspensión de cada tejido parasitario se filtró con gasa y el homogenado se centrifugó a 20,000 g (Beckman) durante 5 min. El precipitado obtenido se resuspendió en la misma solución de homogenización y se centrifugó una vez más bajo las mismas condiciones. El precipitado que se obtuvo finalmente se resuspendió en una segunda solución compuesta de KCl

50 mM, MgCl_2 1 mM, SAF 6.7 mM pH 6.0, una vez resuspendido el precipitado, se agregó EDTA 0.1 mM, ATP 5 mM e inhibidores de proteasas con EDTA (Complete, Roche), la mezcla se agitó durante 10 min a 4 °C y se centrifugó a 80,000 g (Beckman) durante 20 min. Este procedimiento permite la polimerización de actina y, en consecuencia, elimina la mayor cantidad de actina del sobrenadante. El precipitado se resuspendió en KCl 50 mM, SAF 6.7 mM pH 6.0, y se agregó EDTA 1 mM con agitación durante 10 min a 4 °C, la mezcla se centrifugó a 80,000 g durante 20 min. El precipitado se resuspendió en KCl 50 mM y SAF 6.7 mM pH 6.0 y se agregó KCl en polvo hasta llegar a una concentración final de 400 mM. Aunque esta suspensión contenía principalmente a la miosina, para eliminar residuos de actina, se agregaron ATP 3 mM y MgCl_2 5 mM y se centrifugó a 100,000 g durante 4 h. La solución de miosina II se obtuvo en el sobrenadante, el cual se fraccionó en volúmenes pequeños y se conservaron a -20 °C. Todo el proceso de extracción de miosina se analizó mediante corrimiento electroforético (Mini Protean III, BioRad) en geles de poliacrilamida al 10% bajo condiciones reductoras (Laemmli, 1970) a 80 V durante 3 h. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie brillante para la visualización de las proteínas.

4. Obtención de la cadena pesada de miosina II

En el sobrenadante final del proceso de extracción arriba mencionado se observaron otras dos proteínas, así que para lograr la recuperación de la miosina II, se hicieron corrimientos electroforéticos como los indicados anteriormente, sólo que esta vez las proteínas se visualizaron mediante una tinción negativa con Zinc-imidazol de acuerdo a lo descrito por Fernández

Patrón y colaboradores (1995). La banda correspondiente a la CPM de miosina II ubicada en 250 kDa se cortó del gel, se trató con EDTA 0.5 M pH 8.0 y se lavó con agua destilada para quitar el exceso de EDTA. La banda se trató para su secado con diferentes soluciones de lavado: 5 min con acetonitrilo al 50%, 30 min con NH_4HCO_3 50 mM y acetonitrilo al 50%, y por último 30 min con NH_4HCO_3 10 mM y acetonitrilo al 50%. El secado final de la banda se hizo en una microcentrífuga de vacío (Labnet) durante 1 hora y se almacenó a -20°C hasta ser usada. Para determinar la concentración de CPM contenida en cada banda se realizó una curva estándar con concentraciones crecientes de miosina de cerdo comercial (Sigma), analizada en gel de poliacrilamida 8% y procesada para su visualización con la estrategia de Zn-Imidazol. Finalmente, el análisis semi-cuantitativo de la curva obtenida se llevó a cabo utilizando el programa LabWorks Análisis Software V.3.0.02.00. Con este programa se hicieron determinaciones con valores arbitrarios de densidad óptica de cada una de las bandas que contenían a las miosinas y, posteriormente, los valores obtenidos se compararon con los de la curva estándar de miosina de cerdo, de esta forma se estimaron las concentraciones de CPM de cada estadio parasitario.

5. Digestión enzimática de la cadena pesada de miosina

La digestión de la CPM de cada estadio parasitario se llevó a cabo *in situ* en el gel según la técnica descrita por Cleveland et al. (1977) con algunas modificaciones. Para estos fines, las bandas de CPM se incubaron previamente con quimotripsina (Tosil fenil alanil cloro metil cetona: 1-cloro-3-tosilamido-4-fenil-2-butanona, TPCK, Sigma) en una proporción de 1:40 (w/w) durante 30

min a 4 °C; posteriormente se agregó un volumen igual de NH_4HCO_3 10 mM pH 8.0 y se incubaron durante 30, 60 o 120 min a 37 °C. La reacción enzimática se detuvo al agregar una solución amortiguadora de muestra con β -mercaptoetanol (Sigma) y colocarla en agua en ebullición durante 2 min.

6. Análisis de los péptidos de miosina

Cada una de las bandas sometidas a digestión enzimática se analizó por electroforesis (Mini protean III, BioRad) en un gel de poliacrilamida al 8%, bajo condiciones de fraccionamiento de 100 V durante 2 h (Laemmli 1970). Para la visualización de los péptidos, los geles resultantes se tiñeron con plata. Las imágenes de los geles se capturaron con un equipo Laboratory Imaging and Analysis System (UVP), se analizaron y compararon mediante el software Labworks Analysis V.3.0.02.00. Los pesos moleculares y las concentraciones de los péptidos obtenidos se calcularon a partir de un análisis densitométrico mediante el programa "Gel Perfect" (Retamal et al., 1999) a partir de las imágenes capturadas en un equipo de escaneo (ScanJet 3200C, Hewlett Packard). Dicho programa permitió calcular la movilidad relativa (Rf) de cada péptido teñido, así como el área ocupada, con ello se le asignó un porcentaje a cada péptido presente en cada carril. La comparación del valor de cada péptido se hizo con la CPM sin digerir en los carriles donde se encontraba dicha proteína. La obtención de las concentraciones relativas por carril se hizo relacionando a éstas con la concentración inicial de proteína.

7. Estandarización de la técnica de digestión

Previo a los análisis de digestión enzimática de las CPM de *T. solium* y con la finalidad de lograr una adecuada estandarización de la digestión enzimática *in situ*, se decidió realizar la digestión con quimotripsina de miosina de músculo esquelético de cerdo (Sigma), así como de miosina de músculo liso de molleja de pollo (la cual se extrajo en el laboratorio siguiendo la misma estrategia presentada para la extracción de la miosina II de parásitos), de la misma manera, se hicieron los análisis de los péptidos resultantes de acuerdo a lo descrito anteriormente.

Los péptidos generados se compararon con los reportados en la literatura (King et al., 1995). Los resultados obtenidos mostraron péptidos de bajo peso molecular desde el tiempo 0, los cuales se mantuvieron y aumentaron en concentración hasta los 120 min de digestión enzimática (Figura 8), además, se encontró que varios de los péptidos tenían un peso molecular similar al reportado en la literatura (Tabla 1), por lo que se determinó que la técnica presentaba reproducibilidad.

Se encontraron otros péptidos de diferentes pesos y concentraciones, lo que se atribuyó a que el presente proceso de digestión enzimática permitía una mejor digestión de las proteínas debido al desdoblamiento de las mismas por el procedimiento electroforético utilizado, probablemente porque la proteína presenta más sitios de corte al estar desdoblada. El proceso de comparación de los péptidos generados y presentados en la Tabla I permitió hacer una identificación de algunas regiones clásicas de las miosinas como el tallo, S1, S2, MML.

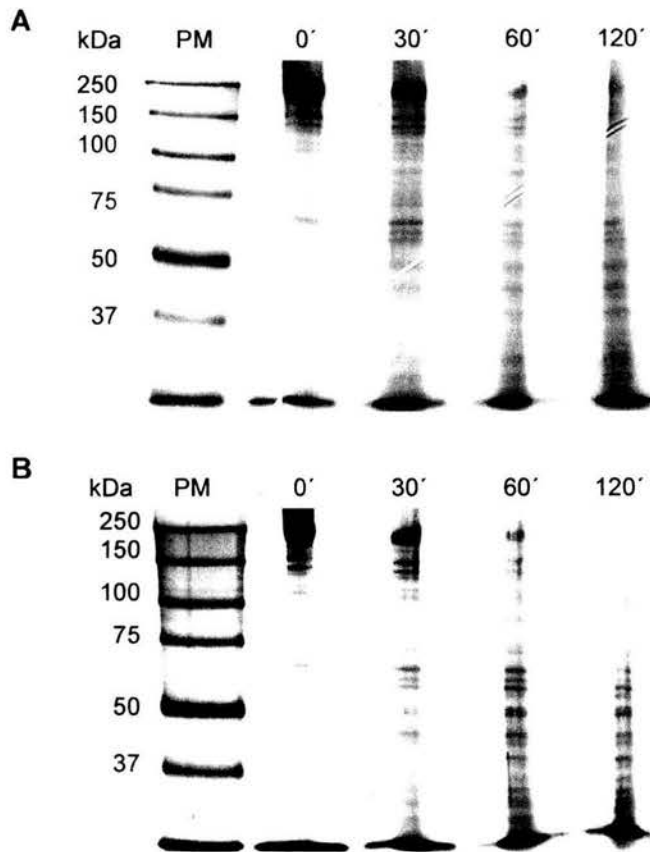


Figura 8. Digestión enzimática de miosina de músculo esquelético de cerdo y liso de molleja de pollo. Los patrones peptídicos generados muestran diferencias dependiendo del tipo de miosina estudiada. La miosina de músculo esquelético (A) es más resistente a la digestión enzimática que la miosina de músculo liso (B).

Tabla I. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DE MIOSINA TIPO II

MIOSINA II	S1 (kDa)	S2 (kDa)	MML (kDa)	Tallo (kDa)
M Esquelético T	90	58	68,65,62	125
M Esquelético E	90	59	68,66,64	126
M Liso T	95	40-45	80-85	125
M Liso E	95	40-45	80-88	123

Los valores teóricos (T) de los pesos moleculares de los fragmentos de miosina están basados en King et al, 1995 y se compararon con los datos experimentales de esta tesis (E)

8. Reconocimiento de péptidos con anticuerpos anti-miosina

Con la finalidad de evaluar que péptidos de las diferentes miosinas II de *T. solium* podrían reaccionar con los anticuerpos monoclonales 4B3 y policlonales producidos contra la miosina nativa y CPM de éstos parásitos, se transfirieron geles de poliacrilamida que contenían los péptidos de miosina de cada estadio parasitario a membranas de difluoruro de polivinilo (PVDF, Millipore) previamente activadas con metanol, con una cámara de transferencia semi-seca (BioRad) durante 10 min a 10 V y 30 min a 20 V. La solución amortiguadora de transferencia empleada fue Tris 48 mM, glicina 39 mM pH 9.2, dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0.375% y metanol al 20%. Las membranas se bloquearon con albúmina bovina al 1% (Sigma) en SSAF-tween 0.3% y se incubaron con sobrenadantes de cultivo de los hibridomas productores del AcM 4B3 (Ambrosio et al., 1997). Las membranas se incubaron con anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (1:1000) y la reacción enzimática se visualizó por quimioluminiscencia (Super Signal West Pico, Pierce) según instrucciones del fabricante. Cada una de las membranas se capturó con el equipo y software mencionados anteriormente. Posteriormente, para evaluar el reconocimiento de anticuerpos policlonales en las mismas membranas, se incubaron con una solución que contenía Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2% y β -mercaptoetanol 100 mM durante 30 min a 50° C, y se lavaron alternativamente con SSAF y SSAF-tween 0.3%. Finalmente, las membranas se incubaron con el anticuerpo policlonal anti miosina (1:17000) toda la noche a 4° C, seguido por el suero anti-conejo (1:1500) como anticuerpo secundario y la reacción se reveló con 3, 3' diaminobenzidina (DAB). Las bandas de reacción

presentes en las membranas se capturaron y analizaron como se indicó anteriormente.

9. Análisis de isoformas de miosina

Para determinar la presencia de isoformas en cada estadio parasitario, las miosinas se analizaron en geles de poliacrilamida de acuerdo a lo descrito por Talmadge y Roland (1993) con ligeras modificaciones como la adición de β -mercaptoetanol (Sigma) al buffer superior de acuerdo con lo descrito por Picard et al., (1999). Las miosinas fueron desalinizadas (Micro Bio-Spin, BioRad) y diluidas en una solución de KCl 40 mM, $MgCl_2$ 1 mM, SAF 6.7 mM pH 7.4 y glicerol 50% previamente al análisis electroforético. Para la visualización de las proteínas los geles se tiñeron con plata.

1. Extracción de Miosina II

Múltiples esfuerzos realizados resultaron infructuosos para el aislamiento exclusivo de miosina II de los diferentes estadios de desarrollo de *T. solium*. A pesar de que inicialmente era posible obtener la miosina de cisticerco empleando el procedimiento convencional de extracción con sales descrito por Dowben (1969), los tejidos se homogeneizaban con una solución de NaCl 0.2 M y posteriormente con KCl 0.6 M, finalmente los filamentos de miosina se precipitaban por la adición de agua destilada hasta llegar a una concentración final de KCl 0.04 M; sin embargo, este proceso no favorecía el manejo de la proteína y los ensayos no eran reproducibles para los fines de este proyecto. Diversas modificaciones se realizaron con la finalidad de obtener la CPM, entre ellas utilizar una solución amortiguadora basada en urea 8 M, tiourea 2 M, trizma base 0.05 M, DTT 0.075 M, SDS 3%, pH 6.8 y azul de bromofenol 0.004%, sin embargo al analizar las muestras en geles de poliacrilamida se observó que la miosina tenía un menor corrimiento electroforético a mayor tiempo de ebullición con la solución amortiguadora, esto debido a que la miosina formaba agregados con la urea, además se observaron huecos en las bandas correspondientes a la CPM, debido a que se formaron tiocianatos cargados, los cuales lograban entrar al gel aumentando la viscosidad de la muestra y disminuyendo la movilidad al aumentar el tiempo de ebullición. Posteriormente se empleó un agente caótopico, KI (0.6 M) el cual permite la solubilización de los componentes del citoesqueleto y favorece la disociación de filamentos gruesos y del complejo actina-miosina (Medeiros et al., 1998). La

miosina que se obtuvo con este procedimiento fue mucho mejor, sin embargo se encontraba contaminada con otras proteínas por lo que se decidió electroeluirarla (BioRad). A pesar de que con el procedimiento de electroelución la proteína se encontraba pura, el rendimiento que se obtenía era muy bajo para los fines de digestión que se requerían.

El proceso final que se utilizó para la extracción consistió en usar las propiedades de solubilización de la miosina II bajo control preciso de la fuerza iónica y pH, los cuales fueron factores críticos en la recuperación de la proteína (Szent Györgyi et al., 1971). Como se observa en la figura 9, correspondiente al análisis electroforético de las diferentes etapas de extracción de miosina II de cisticercos, al inicio se encontraron una gran cantidad de proteínas en la solución de KCl 0.04 M (carril 1); sin embargo, gracias a una serie de centrifugaciones y a la solubilización específica de la miosina, varias de estas proteínas fueron eliminadas. Este proceso permitió que se lograra, en determinadas etapas, enriquecer a la actina (carril 5), posteriormente se disoció el complejo actina-miosina, y se obtuvo en el sobrenadante a la forma monomérica de actina, de aproximadamente 45 kDa (carril 7). Al precipitado de esta misma solución, que corresponde a los filamentos gruesos se le agregó KCl hasta alcanzar una concentración igual a 0.4 M, pH 6.0 con lo cual se logró solubilizar a la miosina (carril 8).

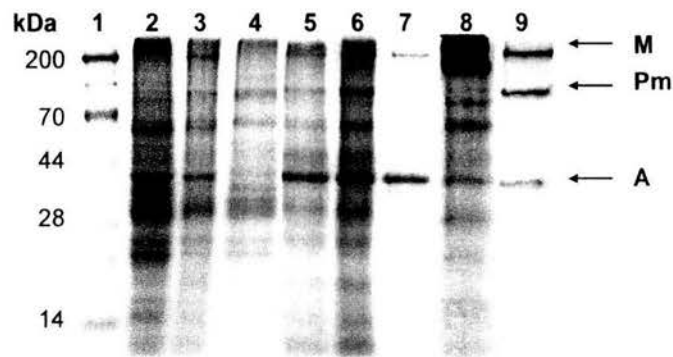


Figura 9. Análisis de la extracción de miosina II de cisticercos. Las muestras, recuperadas en diferentes etapas siguiendo lo descrito por Szent-György et al. (1971) fueron separadas por electroforesis bajo condiciones reductoras en geles de poliacrilamida al 10%, los cuales se tiñeron con azul de Coomassie brillante. Marcadores de peso molecular preteñidos comerciales y de amplio rango, carril 1; Extracto crudo en KCl 0.04 M, carril 2; Precipitado de la centrifugación a 10,000 g, carril 3; Sobrenadante de centrifugación anterior, carril 4; Precipitado resuspendido en KCl 0.05 M, carril 5; Precipitado con EDTA 0.1mM y ATP 5mM, carril 6; Filamentos delgados (actina), carril 7; Filamentos gruesos (miosina y paramiosina), carril 8; Miosina semipurificada (M) con paramiosina (Pm) y actina (A), carril 9.

Este proceso de obtención de miosina II tuvo resultados similares en los diferentes estadios de desarrollo de los parásitos. Durante la solubilización de la miosina (ubicada aproximadamente hacia los 245 kDa) otras proteínas de 98 y 45 kDa también fueron copurificadas (Figura 10). Con la finalidad de identificar la naturaleza de las proteínas copurificadas, se realizaron ensayos de inmunoelectrotransferencia mediante el uso de anticuerpos específicos y se encontró que estas proteínas correspondían a miosina II de 245 kDa (revelada por el AcM 4B3), paramiosina de 98 kDa (revelada por anticuerpos policlonales anti-paramiosina) y actina de 45 kDa (revelada por anticuerpos monoclonales anti-actina comerciales, Chemicon). Otra proteína situada en los 40 kDa no

reaccionó con ninguno de los anticuerpos mencionados (datos no mostrados) y se desconoce el tipo de proteína que es.

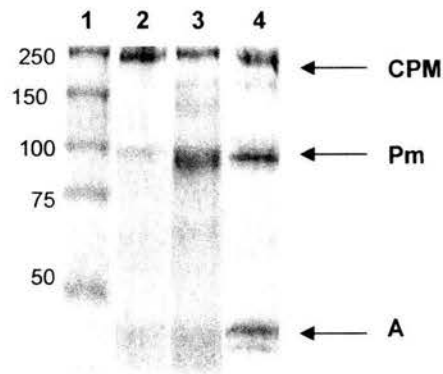


Figura 10. Miosina II semipurificada de *Taenia solium*. Se muestra la comparación de miosinas II semipurificadas de diferentes estadios parasitarios: cisticercos (2); cisticercos evaginados (3) y tenias (4). La comparación de las proteínas se hizo mediante electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida al 8% y posterior tinción con azul de Coomassie brillante. El peso molecular de cada una de las bandas se determinó con base a los marcadores comerciales de peso molecular (1, BioRad): cadena pesada de miosina II (CPM), 245 kDa; Paramiosina (Pm), 98 kDa; Actina (A), 45 kDa. Bandas de miosina II, semejantes a las obtenidas en la presente figura, se recuperaron de los geles y se sometieron a digestión enzimática con quimotripsina.

2. Obtención de la cadena pesada de miosina

A pesar del control riguroso de la fuerza iónica y del pH de las soluciones amortiguadoras empleadas no fue posible separar el complejo miosina, paramiosina, actina. Estas muestras, conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, eran estables por períodos de tiempo prolongados. Debido a que no se logró obtener a la miosina pura en forma soluble se recurrió a la estrategia alterna de





cortar la banda correspondiente a la CPM (245 kDa) de los geles de poliacrilamida y con ésta realizar las digestiones enzimáticas correspondientes.

3. Digestión enzimática de la cadena pesada de miosina

Las bandas correspondientes a la CPM de cisticercos, cisticercos evaginados y tenias se cortaron de los geles de poliacrilamida y fueron digeridas con quimotripsina. Los pesos moleculares inferidos con el software Labworks UVP se compararon con lo descrito en la literatura para las miosinas de músculo liso y esquelético (King et al, 1995) y se asociaron con los péptidos correspondientes a regiones específicas de miosina, como el tallo, la porción globular y la meromiosina ligera (Tabla II). Los datos se basan en los péptidos obtenidos de acuerdo a la figura 11, la cual muestra las imágenes de la digestión a los 30, 60 y 120 min, para todas las miosinas estudiadas, indicando el peso molecular y la región de miosina a la que corresponden. Para cada uno de los patrones peptídicos se hicieron varias repeticiones en las que se obtuvieron resultados semejantes.

Con base en el peso molecular de los péptidos obtenidos se propone que la región del tallo de miosina de *T. solium* podría corresponder a un péptido ubicado entre 125-130 kDa, la MML a péptidos ubicados entre los 80 y los 88 kDa. En lo que se refiere a los péptidos situados en la porción globular; el S1 es de 97 ó 98 kDa mientras que el S2 es de 40 kDa (Tabla II).

Tabla II. COMPARACION DE LA DIGESTIÓN DE MIOSINA II

Miosina después de la digestión	S1 (kDa)	S2 (kDa)	MML (kDa)	Tallo (kDa)
				
M Esquelético T	90	58	68,65, 62	125
M Liso T	95	40-45	80-85	125
Cisticerco E	98	40	80-85	128
C evaginado E	97	40	80-88	130
Tenia E	97	40	80-87	125

Los valores teóricos (T) de los pesos moleculares de los fragmentos de miosina están basados en King et al, 1995 y se compararon con los datos experimentales de esta tesis. (Esquemas tomados de Lodish et al, 2001)

En la miosina de cisticercos, el péptido de 128 kDa que podría corresponder a la región del tallo, disminuyó en concentración hacia el final de la digestión, al igual que se observó para los péptidos de 101, 98, 85 y 80 kDa; sin embargo, péptidos de 74, 67 y 58 kDa aumentaron en concentración hacia el final de la digestión (Figura 11A). En el caso de los péptidos de 32 y 40 kDa, éstos aparecieron desde los 30 min y aumentaron en concentración a lo largo de la digestión.

En la miosina de cisticercos evaginados (Figura 11B), se observó que el péptido de 130 kDa, el cual podría corresponder al tallo, disminuyó en concentración al final de la digestión; sin embargo, desde los 30 min, otros péptidos situados entre 130 y 33 kDa, se mantuvieron hasta los 120 min. Sólo los péptidos de 78 y 69 kDa, aumentaron en concentración y el péptido de 58 kDa no se observó.

A diferencia de la miosina de cisticercos y cisticercos evaginados en la miosina de tenias (Figura 11C) se observaron mayor cantidad de péptidos entre 169-30 kDa desde los 30 min de digestión, algunos aparecieron en mayor concentración como los de 103, 97, 66, 40 y 30 kDa. Llama la atención que hacia el final de la digestión no se observaron péptidos de alto peso molecular (200-103 kDa), mientras que los de 97 y 30 kDa disminuyeron en concentración los de 74, 66 y 40 kDa aumentaron. Péptidos de 45, 47, 50 y 58 kDa sólo aparecieron en tenias y en cisticercos.

Al comparar los péptidos de miosina de *T. solium*, con los reportados para diferentes tipos de músculo liso, se encontraron similitudes en cuanto al peso molecular (Eddinger y Murphy, 1988; Tashiro et al., 1985), lo cual concuerda con el tipo de musculatura lisa que ha sido descrita para céstodos (Lumsden and Byram III, 1967). Con base en los péptidos de miosina descritos en la literatura se observó que en cisticercos y tenias los péptidos relacionados con el tallo desaparecieron a los 120 min de digestión mientras que en los cisticercos evaginados un péptido semejante se mantuvo presente hasta el final de la digestión. De la misma forma, se observó que el fragmento peptídico que podría corresponder al S2, aumentó en concentración en cisticercos y tenias pero no en cisticercos evaginados.

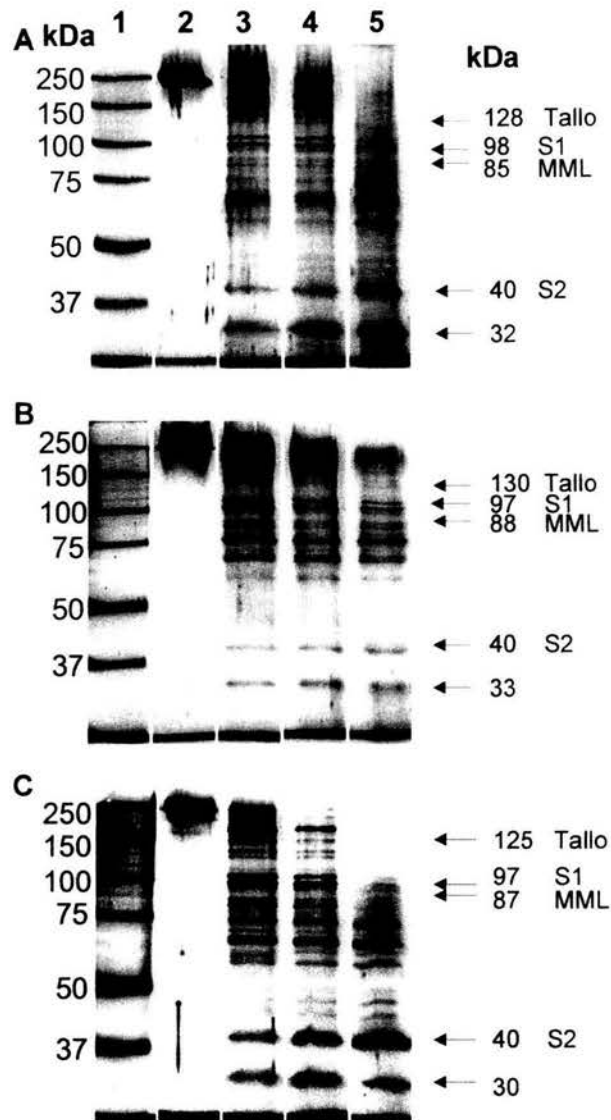


Figura 11. Digestión enzimática de miosina de *Taenia solium*. La cadena pesada de miosina de cisticercos (A), cisticercos evaginados (B) y tenias (C) se incubó con quimotripsina y los péptidos obtenidos se analizaron por electroforesis en geles teñidos con plata. Los carriles corresponden a los 0, 30, 60 y 120 min de digestión (2-5 respectivamente). Se utilizaron pesos moleculares preteñidos de amplio rango (BioRad, 1) para evaluar los pesos de los péptidos obtenidos. Las flechas señalan sólo aquellos péptidos que coinciden con regiones características de miosina según lo publicado por King et al (1995).

4. Análisis de los péptidos de miosina

Se realizaron análisis más precisos de los péptidos obtenidos con el programa de computación "Gel Perfect", en el que se hicieron comparaciones de los diferentes tiempos de digestión de los resultados presentados anteriormente. En la figura 12 se muestra gráficamente la variación de los valores de absorbencia respecto a la movilidad relativa de cada uno de los péptidos (Rf) en los diferentes tiempos de digestión. El análisis mostró que el patrón peptídico, antes de la digestión enzimática, de las miosinas de cisticercos, cisticercos evaginados y tenias fue similar; sin embargo, a los 30 min el patrón de digestión para cada miosina fue diferente. En tenias, se observaron mayor cantidad de péptidos los cuales variaron entre 211-66 kDa (Rf 0.1-0.6) mientras que en cisticercos, aparecieron más concentrados los péptidos entre 74-68 kDa (Rf 0.5), los cuales estuvieron en menor concentración en cisticercos evaginados. Los péptidos localizados entre 54-44 kDa (Rf 0.6-0.7) aparecieron en poca concentración en tenias y cisticercos y estuvieron en mayor concentración en cisticercos evaginados; sin embargo los péptidos de 40-30 kDa (Rf 0.7-0.9) aparecieron en mayor concentración en tenias y cisticercos pero no en cisticercos evaginados. Con respecto a la cadena pesada (Rf 0.1), ésta se mantuvo en cisticercos y en cisticercos evaginados hasta los 60 min, sin embargo en tenias desapareció a los 60 min, mientras que en los otros estadios de desarrollo desapareció hasta los 120 min. El análisis de todos los patrones de digestión a los 60 min mostró que estos eran similares a los de los 30 min, excepto en los de tenia en donde los péptidos de alto peso molecular (Rf 0.1-0.2) disminuyeron en concentración y

VI. Resultados

los de bajo peso molecular (R_f 0.7-0.9) se incrementaron en cisticercos y tenias. A los 120 min los péptidos de alto peso molecular prácticamente desaparecieron en cisticercos y tenias, dando origen a péptidos de 74-66 y 54-32 kDa en cisticercos; en tenias se observaron en mayor concentración péptidos entre 58-40 kDa, por el contrario la banda de 30 kDa disminuyó. El péptido de 58 kDa, que apareció en cisticercos y tenias no se observó en cisticercos evaginados. El patrón de digestión de miosina de cisticercos evaginados fue similar desde los 30 hasta los 120 min.

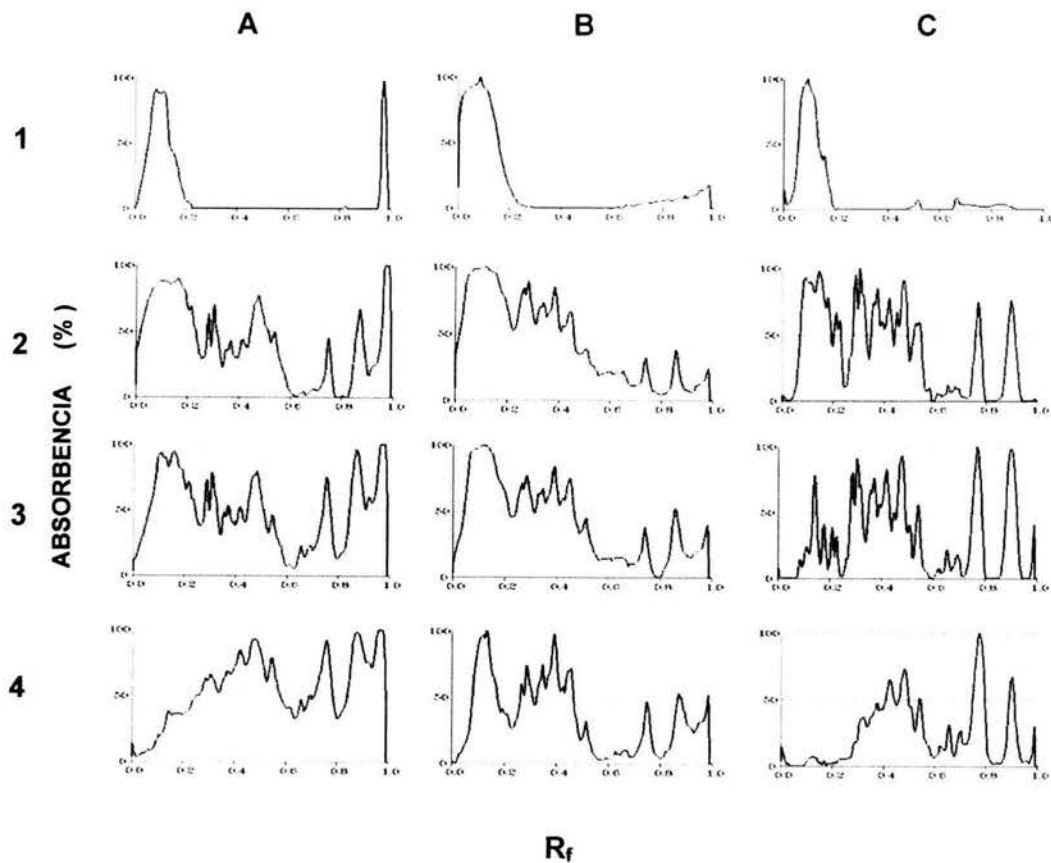


Figura 12. Análisis de la digestión enzimática de la cadena pesada de miosina. Con el programa "Gel Perfect" se realizó el análisis de la digestión de miosina de cisticercos (A), cisticercos evaginados (B) y tenias (C) en diferentes tiempos 0, 30, 60 y 120 min (1-4 respectivamente). En las gráficas se muestran los valores de absorbencia y de movilidad relativa (Rf) de los péptidos analizados.

La miosina de tenia fue más susceptible a la digestión con quimotripsina que la miosina de cisticercos, y la miosina de cisticercos evaginados fue la menos susceptible.

5. Reconocimiento de péptidos con anticuerpos anti-miosina

Los ensayos de inmunoelectrotransferencia de los péptidos obtenidos de las digestiones de miosina de *T. solium* mostraron que todos los anticuerpos antimiosina reconocieron siempre a las cadenas pesadas de miosinas no digeridas (254 kDa) y el péptido reconocido de menor peso molecular fue de 63 kDa.

5.1. Anticuerpo monoclonal 4B3

Desde el inicio de la digestión el reconocimiento del AcM 4B3 en cisticercos fue hacia péptidos de 188, 126, 105, 96, 85, 80 y 74 kDa, los cuales no solo se mantuvieron, sino que también aumentaron en concentración a los 120 min digestión (Figura 13A). En la miosina de cisticercos evaginados se observó un débil reconocimiento hacia bandas localizadas en los 200, 105, 85 y 80 kDa desde los 30 hasta los 120 min (Figura 13B). A diferencia de estos dos estadios de desarrollo, en el caso de la miosina de tenias sólo se observó reconocimiento a los 30 y 60 min hacia péptidos de 170, 99, 94, 82 y 79 kDa (Figura 13C). Según los resultados del análisis, el péptido de 68 kDa fue el de

menor tamaño que mantuvo el epítipo del AcM 4B3 y fue débilmente reconocido en la miosina de cisticercos.

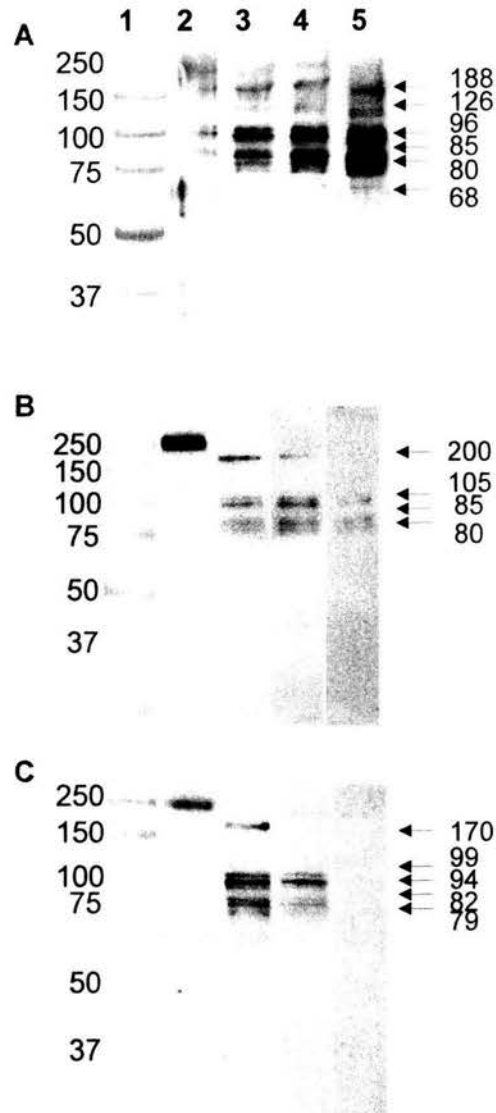


Figura 13. Reconocimiento del AcM 4B3 a péptidos de miosina. Las CPM de cisticercos (A), cisticercos evaginados (B) y tenias (C) fueron procesadas como se indicó en la figura 3; posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF, en donde reaccionaron con el AcM 4B3. Para el revelado del reconocimiento con los anticuerpos, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo anti-ratón conjugado a peroxidasa y la reacción se reveló por quimioluminiscencia. El cálculo del peso molecular de los péptidos reconocidos por los anticuerpos se hizo con base en los marcadores de pesos moleculares preteñidos (1: BioRad) y el empleo del software Labworks.

Después de registrar los péptidos que reconocen el AcM 4B3 hacia y posterior al cálculo del peso molecular, las imágenes se analizaron mediante el programa "Gel perfect" (Figura 14). Los resultados obtenidos mostraron que el anticuerpo reconoció a la cadena pesada de cada uno de los estadios analizados (Rf 0.1). Los péptidos obtenidos durante las digestiones de miosina de cisticercos y cisticercos evaginados fueron reconocidos por los anticuerpos desde el inicio hasta los 120 min de digestión (Figura 14A y B); solo en el caso de los péptidos de miosina de tenias no se observó reconocimiento a los 120 min (Figura 14C). El peso molecular de los péptidos varió desde los 105 a los 79 kDa (Rf 0.2 - 0.4).

5.2. Anticuerpo Policlonal hacia Miosina

El reconocimiento del Anticuerpos policlonales anti miosina hacia la miosina de cisticercos (Figura 15A) se observó desde el inicio de la digestión hacia péptidos de diferente tamaño molecular: 180, 150, 135, 127, 105, 98, 85, 80 y 63 kDa, los cuales se mantuvieron y aumentaron en concentración a los 120 min. Para la miosina de cisticercos evaginados (Figura 15B) se encontró un débil reconocimiento hacia péptidos situados en los 200, 105 y 99 kDa en los 30 y 60 min de digestión enzimática. En el caso de la miosina de tenias (Figura 15C), el reconocimiento fue hacia péptidos de 150, 105, 99, y 63 kDa, a los 30 y 60 min de digestión.

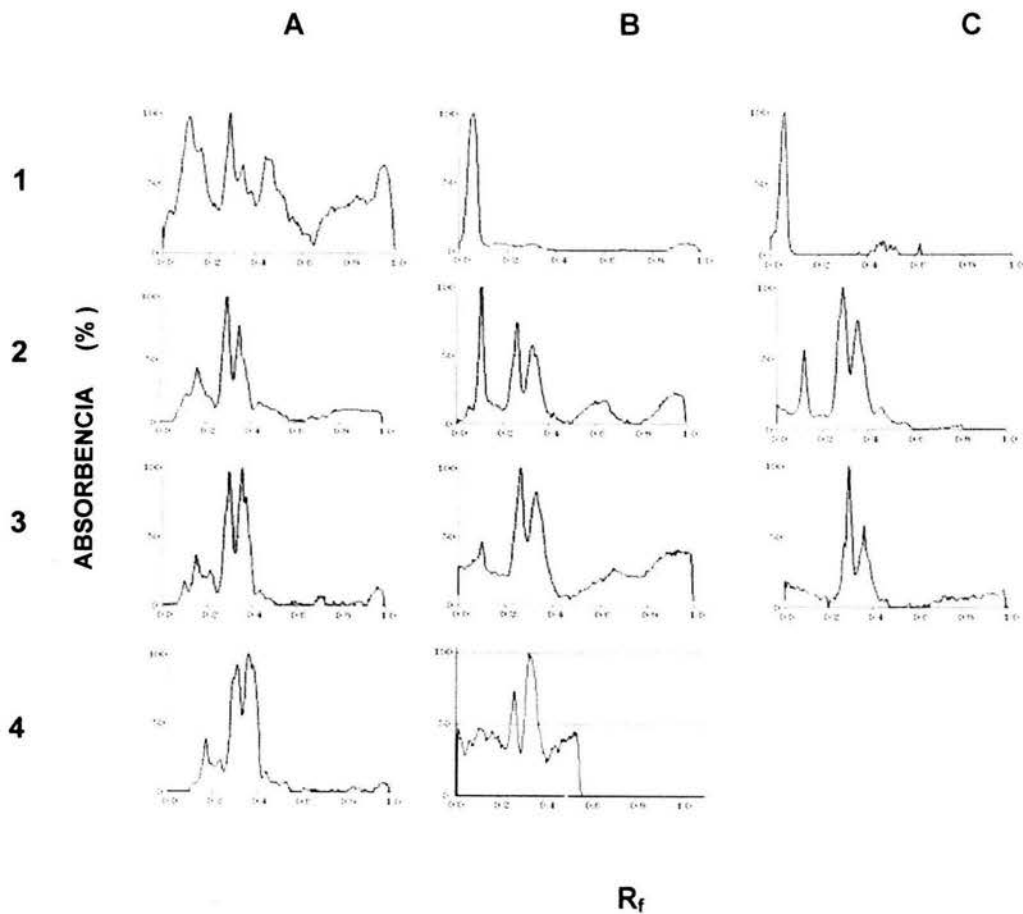


Figura 14. Análisis de los péptidos de miosina reconocidos por el AcM 4B3. Después de la digestión de las miosinas de cisticercos (A), cisticercos evaginados (B) y tenias (C), a diferentes tiempos 0, 30, 60 y 120 min (1-4 respectivamente), los análisis de los reconocimientos de los péptidos con el AcM 4B3, se hicieron con el programa "Gel Perfect". En las gráficas se muestran los valores de absorbencia y de movilidad relativa (R_f) de los péptidos reconocidos.

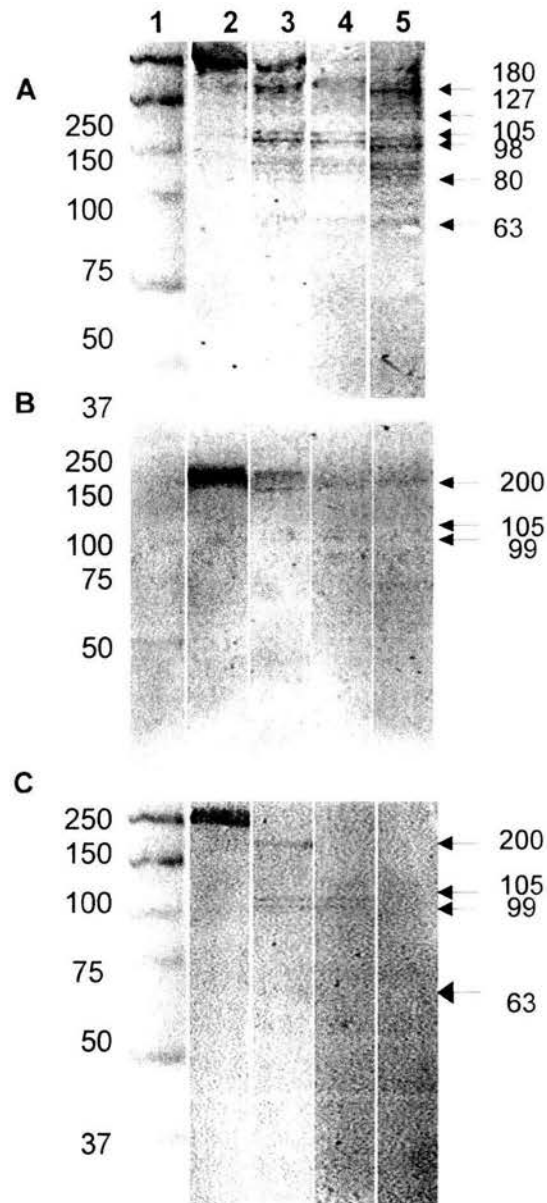


Figura 15. Reconocimiento del Anticuerpos policlonaes anti miosina a péptidos de miosina. Las membranas de PVDF de las cadenas pesadas de miosina de cisticercos (A), cisticercos evaginados (B) y tenias (C) se incubaron con el Anticuerpos policlonaes anti miosina. Para el revelado del reconocimiento de los anticuerpos hacia los péptidos obtenidos en los diferentes tiempos de digestión 0, 30, 60 y 120 min (carriles 2-5 respectivamente), las membranas se incubaron con un anticuerpo anti-conejo conjugado a peroxidasa como anticuerpo secundario y la reacción, en este caso, se reveló por quimioluminiscencia. El cálculo del peso molecular de los péptidos reconocidos por los anticuerpos se hizo con base en los marcadores de pesos moleculares preteñidos (1: BioRad) y el empleo del software Labworks.

Posterior del análisis con el programa "Gel Perfect" del reconocimiento del Anticuerpos policlonales anti miosina (Figura 16), se encontraron variaciones en el peso molecular de los péptidos de las miosinas, éstos péptidos variaron entre 180 y 98 kDa (Rf 0.2 - 0.3). Sólo hacia el final de la digestión se observó reconocimiento hacia los péptidos de 85, 80 y 63 kDa (Rf 0.4-0.5) en la miosina de cisticercos (Figura 16A). De todos los péptidos reconocidos, el de 63 kDa (Rf 0.5) fue el de menor tamaño que mantuvo el epítipo del Anticuerpos policlonales anti miosina, aunque fue débilmente reconocido en la miosina de cisticercos y tenias (Figura 16 Ay C)

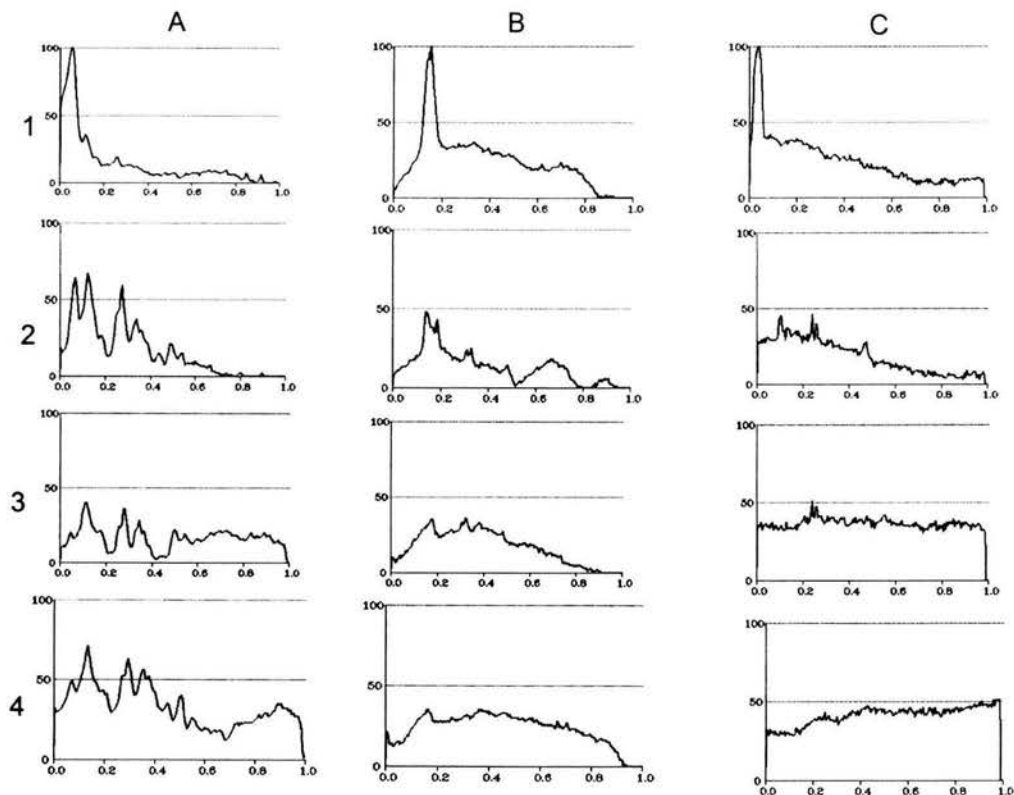


Figura 16. Análisis de los péptidos de miosina reconocidos por el Anticuerpos policlonales anti miosina. Después de la digestión de las miosinas de cisticercos (A), cisticercos evaginados (B) y tenias (C), a diferentes tiempos 0, 30, 60 y 120 min (1-4 respectivamente), los análisis de los reconocimientos de los péptidos con el AcM 4B3, se

hicieron con el programa "Gel Perfect". En las gráficas se muestran los valores de absorbencia y de movilidad relativa (Rf) de los péptidos.

Haciendo la comparación de los péptidos de miosina que reaccionaron con ambos anticuerpos en los estadios parasitarios analizados, se encontró que éstos reconocieron péptidos mayores a 100 kDa, así como otros situados entre los 80 y 100 kDa. Según los análisis realizados, estos anticuerpos reconocieron de manera diferente a los péptidos dependiendo del tiempo de digestión de las miosinas; a mayores tiempos de digestión, el AcM 4B3 reconoció péptidos de menor peso molecular, mientras que con el Anticuerpos policlonales anti miosina se encontró un débil reconocimiento. Para los péptidos de miosina de cisticercos evaginados y de tenias, el reconocimiento por ambos anticuerpos fue débil.

6. Análisis de isoformas de miosina

El análisis de las miosinas, bajo condiciones de separación de isoformas en geles de policrilamida, mostró que dependiendo del estadio parasitario estudiado hay diferencias en la expresión de estas proteínas (Figura 17). Mientras que en cisticercos se observaron tres isoformas; en cisticercos evaginados, dos y en tenias, una. Esta última con un peso molecular mayor que las de los otros estadios de desarrollo. Bajo las mismas condiciones de separación de las isoformas de miosina, en la miosina comercial de cerdo (Sigma), se observaron tres isoformas. Todas las isoformas que se encontraron en estos análisis tuvieron un peso molecular cercano a los 250 kDa.

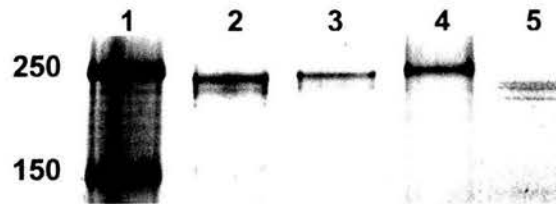


Figura 16. Isoformas de Miosina II de *Taenia solium*. El análisis de isoformas de miosina de cisticercos (2), cisticercos evaginados (3), tenias (4) y cerdo (5) se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida que contenían EDTA-glicerol, y el revelado de las proteínas se hizo por tinción con plata después de un corrimiento de 24 h a 70V a 4°C. El carril 1 contiene marcadores de pesos moleculares de amplio rango comerciales (PM, BioRad).

Las proteínas filamentosas que componen los sistemas musculares han sido muy estudiadas y por lo tanto, ampliamente conocidas, sin embargo se han llevado a cabo pocos estudios en parásitos helmintos. Aunque en *Taenia solium* se han realizado algunos estudios de estas proteínas (Laclette et al., 1990, 1991, 1992, 1995; Landa et al., 1993; Ambrosio et al, 1997, 2003, Martínez, 1998; Moran, 1999; Reyes, 2000, González-Malerva et al, 2004), la estructura, funcionalidad, modo de expresión, formas de regulación y proteínas accesorias que interaccionan con las proteínas musculares durante los fenómenos de contracción muscular de los parásitos, son aún poco conocidos. La importancia de estudiar a este tipo de proteínas en los parásitos radica en la posibilidad de explorar nuevas estrategias para el diagnóstico de las enfermedades que producen, así como el tratamiento de los hospederos con la finalidad de eliminar la infección parasitaria y la vacunación para prevenir la parasitosis.

Los estudios relacionados con la caracterización de actina y miosina II en *T. solium* (Ambrosio et al, 1997; 2003; Martínez-Guarneros, 1998; Moran, 1999; Reyes, 2000 González-Malerva et al, 2004) y recientemente en *Taenia crassiceps* (Reyes, 2000), han mostrado que éstas presentan propiedades específicas para cada estadio parasitario. Esto implica que a pesar de ser proteínas ubicuas, se expresan de manera específica, y, por consiguiente, la probabilidad de la presencia de isoformas específicas es muy alta. Estas características hacen que las proteínas específicas de cada estadio parasitario sean candidatas para utilizarse como blancos potenciales de ataque o bien, como indicadores de la presencia de los parásitos.

En lo que se refiere específicamente a miosina II se sabe que es una proteína dimérica, localizada en cisticercos, cisticercos evaginados y tenias y, aún cuando es una proteína constitutiva, se libera durante las infecciones experimentales (Ambrosio et al, 1997; Martínez, 1998) o bien en el medio de cultivo cuando los parásitos han sido mantenidos *in vitro* (Reyes, 200). Esto no es nuevo, ya que otra proteína muscular y constitutiva, la paramiosina, también es secretada por los cisticercos de *T. solium* (Laclette et al, 1990) y se ha postulado que podría tener aplicación tanto en el diagnóstico como en el desarrollo de vacunas.

En el trabajo de tesis aquí descrito, se planteó continuar con la caracterización de miosinas tipo II en los diferentes estadios parasitarios de *T. solium*. El enfoque bioquímico aplicado permitió ampliar la caracterización bioquímica e inmunológica de estas proteínas (González-Malerva et al, 2004).

Aislar a la miosina II de los diferentes estadios de desarrollo del parásito fue todo un reto y un proceso complejo de realizar, posiblemente, por las características intrínsecas de las proteínas de los parásitos, por lo que se tuvieron que considerar diferentes protocolos para lograr la purificación de la misma. A pesar del conocimiento de que estas proteínas forman parte de sistemas musculares de tipo liso; con estos protocolos no se logró el aislamiento de proteínas contráctiles, por lo que se consideró la estrategia experimental establecida por Szent-György et al., 1971, enfocada hacia la obtención y caracterización de paramiosina en moluscos. Sin embargo, se requirió adaptar algunas modificaciones las cuales permitieron mejorar la obtención de miosina II, además se logró el aislamiento de otras proteínas

musculares como la actina, con lo cual se logró la identificación y caracterización de isoformas de actina (Ambrosio et al, 2003). Durante el proceso de extracción se encontró que tanto el pH como la fuerza iónica de las soluciones utilizadas son factores críticos para la solubilización de la miosina. Cabe destacar que aunque el proceso de purificación se llevó a cabo muchas veces, los resultados siempre fueron los mismos, ya que no se logró obtener a la miosina en forma pura y siempre se la encontró contaminada con paramiosina y actina. El hecho de que la miosina no pudiera ser aislada pura, tiene que ver con la forma en que se estructuran las fibras musculares en invertebrados y específicamente en helmintos como los nemátodos, ya que en estos organismos se ha demostrado que su separación es compleja en filamentos gruesos (Deitiker y Epstein., 1993; Epstein et al., 1985; Lowy y Hanson, 1962).

La paramiosina es una proteína que ha sido ampliamente estudiada en *Taenia solium*, tanto desde el punto de vista bioquímico (Laclette et al., 1989; Guerra et al., 1982), inmunológico (Landa et al., 1993; Laclette et al., 1992; Flisser et al., 1980) y molecular (Landa et al., 1993), así como por su localización celular (Laclette et al., 1995; 1990). A nivel molecular se sabe que la paramiosina se une con la porción carboxilo terminal de la miosina, con lo que se permite el ensamblaje de los filamentos gruesos, tal interacción determina la solubilidad de los filamentos e influye en la extracción de las proteínas puras (Medeiros et al., 1998; Cohen y Parry, 1998; Epstein et al., 1985). Con lo respecta a la actina, la contaminación con miosina era esperada, debido a que tal interacción genera la contracción muscular (Holmes, 1996). En cisticercos de *Taenia solium* se encontraron 7 isoformas de actina (Ambrosio et

al., 2003), estas isoformas claramente indican la variabilidad de esta proteína y por lo tanto la interacción que puede haber con las miosinas tipo II en estudio.

Con la finalidad de evaluar los péptidos de miosina de cisticercos, cisticercos evaginados y tenias se realizó la digestión con quimotripsina en las bandas respectivas de miosinas (250 kDa aproximadamente). Al comparar el patrón de digestión de las miosinas de *Taenia solium* con los de músculo liso y esquelético (King et al., 1995) se encontró que los péptidos obtenidos tienen pesos similares a los de las miosinas de músculo liso (Eddinger y Murphy, 1988; Tashiro et al., 1985). Estos resultados correlacionan con la presencia de músculo liso descrita en céstodos (Mair et al., 1998; Willms et al., 2003;).

Las digestiones con quimotripsina mostraron que la miosina de tenia era la más susceptible, seguida por la de cisticercos; la de cisticercos evaginados fue la menos susceptible. La mayor concentración de péptidos al final de la digestión se observó en péptidos de 78, 74, 69, 67 y 66 kDa en todos los estadios de desarrollo, sugiriendo que no hay más sitios de digestión para la enzima. Estos péptidos podrían corresponder a la región LMM de acuerdo a lo reportado por otros autores (King et al., 1995; Cross and Vanderckhove, 1986 Tashiro et al., 1985). Los péptidos de 40, 32, 33 y 30 kDa, que corresponden al S2, mostraron diferencias en el porcentaje de absorbencia de las bandas, indicando diferencias en la secuencia de aminoácidos de este subfragmento, lo que sugiere la presencia de isoformas. Las miosinas de músculo liso tienen una región flexible en el tallo, que es susceptible a la digestión y origina péptidos entre 30-33 kDa. Esto apoya nuevamente que las miosinas analizadas en el presente trabajo son de tipo liso. Se cree que esta región permite la flexibilidad que requiere la miosina para la forma plegada de la proteína (King et al., 1995).

La digestión en gel fue un procedimiento exitoso, ya que los péptidos obtenidos en *T. solium* fueron similares a los reportados por otros autores (King et al., 1995; Eddinger et al., 1988; Cross and Vandeerckhove, 1986; Tashiro et al., 1985). Sin embargo, se obtuvieron péptidos de bajo peso molecular desde el principio de la digestión, debido probablemente a que la miosina se encuentra desnaturalizada en la banda del gel y quedan expuestos más sitios de corte para la enzima.

El uso de los anticuerpos monoclonales y policlonales preparados en contra de miosina mostró diferencias en el reconocimiento de los péptidos de miosina generados con la quimotripsina en todos los estadios de desarrollo. Este tipo de anticuerpos ha sido muy utilizado en el análisis estructural de isoformas de miosina (Moore et al., 1992; Murakami et al., 1991; Kimura et al., 1991; Winkelmann et al., 1983). Los patrones de digestión obtenidos y analizados con el AcM 4B3 mostraron péptidos entre 200-63 kDa, los cuales podrían provenir de la región del tallo, ya que los péptidos de 79-85 kDa corresponden a la región de MML y son reconocidos en todos los estadios de desarrollo del parásito. Sin embargo se observaron diferencias en cuanto a la absorbencia de los péptidos que se mantuvieron al final de la digestión, mientras que en la miosina de cisticercos aumentaron en concentración, en los cisticercos evaginados se observó un débil reconocimiento y en la tenia no se observó ninguna banda.

El reconocimiento con el AcP Mio, también mostró diferencias ya que se observó un reconocimiento débil en la miosina de cisticercos evaginados y de tenia, mientras que en las miosina de cisticercos se observó un reconocimiento débil hacia péptidos entre 85 y 80 kDa, que podrían provenir de la región de

MML. En general se observaron reacciones positivas con bandas entre 180-98 kDa. Estos resultados indican que ambos anticuerpos están reconociendo diferentes sitios dentro de la miosina, aunque ambos podrían estar situados en el tallo, sitio donde se encuentra la mayor variabilidad entre las miosinas. Mientras que el AcM 4B3 reconoció una banda de 68 kDa sólo en cisticercos, el AcP Mio reconoció una banda de 63 kDa presente tanto en cisticercos como en tenias.

Los ensayos de ELISA realizados con los anticuerpos utilizados en el presente estudio demostraron que las miosinas de cisticercos y de tenias son antigénicamente diferentes, la miosina de cisticercos es mejor reconocida por los anticuerpos que la de tenia (González-Malerva et al. 2004). Estos datos apoyan los resultados obtenidos por inmunoelectrotransferencia en este trabajo. Los resultados del reconocimiento de los anticuerpos indican diferencias estructurales de la miosina en los diferentes estadios de desarrollo de *T. solium*, lo cual indica variabilidad a nivel de la secuencia de aminoácidos de la proteína a nivel del tallo, sitio que determina la localización y función de las miosinas en los tejidos (Tashiro et al., 1985; Medeiros et al., 1998).

La presencia de isoformas se confirmó por el análisis de las miosinas en geles de poliacrilamida con EDTA y glicerol. Se encontró una sola isoforma en tenia, mientras que en cisticercos evaginados se encontraron dos y en cisticercos estuvieron presentes tres isoformas. Todas tuvieron un peso cercano a 250 kDa, aunque la de tenia tuvo un peso superior a los 250 kDa. La presencia de mayor cantidad de isoformas en cisticercos y cisticercos evaginados esta en correlación con los péptidos de alto peso molecular encontrados al final de la digestión y no así en la digestión de tenia, en la que

no se observan péptidos de alto peso molecular. Además, de esta forma se explica porqué la miosina de cisticercos es la más reconocida por los anticuerpos, seguida por la de cisticercos evaginados y la menos reconocida es la de tenia.

Las diferencias encontradas entre las miosinas de los estadios de desarrollo analizados se apoyan en ensayos de actividad ATPasa, en los que se observó que la miosina de tenia usa el ATP de forma más eficiente que la miosina de cisticerco (González-Malerva et al, 2004). Aunque ambos estadios del parásito tienen movimiento (lo que se ha visto cuando están *in vitro*), los sitios del hospedero en donde habitan sugieren que el cisticerco necesita un menor gasto de energía, pues su movimiento esta más limitado (Flisser, 1994; Ostrosky et al., 1991). En cambio la tenia, que se fija al intestino delgado por la porción cefálica, y cuyo estróbilo esta encima o cercano a la mucosa, y en ocasiones en espiral a lo largo del intestino, seguramente mantiene una actividad muscular continua y dinámica que le permite resistir los movimientos intestinales (Andreassen, 1998; Flisser, 1995; Merchant et al. 1998). Por lo anterior, probablemente la miosina de las tenias requiere mayor eficiencia.

Las diferencias entre las miosinas de cisticercos, cisticercos evaginados y tenias indican que se deben a que se expresan como isoformas, las cuales se expresan en cada estadio dependiendo de las condiciones fisiológicas y del tipo de tejido, tal y como se ha encontrado en otros organismos (Andersen et al., 2000; Babu et al., 2000; Pette and Staron, 2000; Murakami et al., 1991; Winkelmann et al., 1983). Es posible que estas isoformas de miosina encontradas junto con las de actina recientemente publicadas (Ambrosio et al., 2003) definan los movimientos musculares en cada estadio del parásito.

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) The cytoskeleton: Molecular Motors. In: Molecular Biology of the Cell. Fourth edition, Garland Science, Taylor and Francis Group, New York. 949-953.
2. Aluja A, Escobar A, Escobedo F, et al (1987) Cisticercosis, una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por *Taenia solium*. México, D.F., Biblioteca de la Salud, Fondo de Cultura Económica. 115pp
3. Ambrosio J, Cruz-Rivera M, Allan J, Moran E, Ersfeld K, Flisser A (1997) Identification and partial characterization of a myosin-like protein from cysticerci and adults of *Taenia solium* using a monoclonal antibody. *Parasitology*. 114:545-553.
4. Ambrosio, J, Reynoso-Ducoing O, Hernández-Sánchez, H, Correa-Piña D, González-Malerva L, Cruz-Rivera M, Flisser A (2003) Actin expression in *Taenia solium* cysticerci (Cestoda): tisular distribution and detection of isoforms. *Cell Biology International*. 27:727-733.
5. Andersen L, Schjerling P, Saltin, B (2000) Muscle, genes and athletic performance. *Scientific American*. September:30-37.
6. Andreassen J. Intestinal tapeworms. En: Cox FG, Kreier JP, Wakelin D, editors. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 9a. ed. 1998; 5, 521-537
7. Ardizzi JP, Epstein HF (1987) Immunochemical localization of myosin heavy chain isoforms and paramyosin in developmentally and structurally diverse muscle cell types of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Cell Biology*. 105; 6:2763-2770.

8. Arner A, Löfgren M, Morano I (2003) Smooth, slow and smart muscle motors. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 24:165-173.
9. Babu GJ, Warshaw D, Periasamy M (2000) Smooth muscle myosin heavy chain isoforms and their role in muscle physiology. *Microscopy and Research Techniques*. 50:532-540.
10. Barylko B, Tooth P, Kendrick-Jones J (1986) Proteolytic fragmentation of brain myosin and localisation of the heavy-chain phosphorylation site. *European Journal of Biochemistry*. 158:271-282.
11. Blough ER, Rennie ER, Zhang F, Reiser PJ (1996) Enhanced electrophoretic separation and resolution of myosin heavy chains in mammalian and avian skeletal muscles. *Analytical Biochemistry*. 233:331-35.
12. Bray D (2001) Myosin. In: Cell Movements. From molecules to motility. Second edition. Garland Publishing, Taylor & Francis Group, New York. 103-117.
13. Burridge K, Bray D (1975) Purification and structural analysis of myosins from brain and other non-muscle tissues. *Journal of Molecular Biology*. 99:1-14.
14. Cameron LC, Machado M, Meza G (2003) Las miosinas en el movimiento celular I, Estructura y propiedades cinéticas. *Revista de Educación Bioquímica*. 22;2:53-59.
15. Campos A, Bernard P, Fauconnier A, Landa A, Gomez E, Hernández R, Willms K, Laclette JP (1990) Cloning and sequencing of two genes from *Taenia solium* (Cestoda). *Molecular and Biochemical Parasitology*. 40: 87-94.

16. Cañedo L, Laclette JP, Morales E. (1982) Evagination of the metacestode of *Taenia solium*. In: Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán C (eds). Academic Press, New York. 363-373.
17. Cleveland D, Fischer S, Kirschner M, Laemmli U (1977) Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*. 252:1102-1106.
18. Cohen C (1982) Matching molecules in the catch mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 79:3176-3178.
19. Cohen C, Parry D (1998) A conserved C-terminal assembly region in paramyosin and myosin rods. *Journal of Structural Biology*. 122:180-187.
20. Cross RA, Vandekerckhove J (1986) Solubility-determining domain of smooth muscle myosin rod. *FEBS letters*. 200:355-360.
21. Cruz-Rivera M (1995) Caracterización de anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos del estadio adulto de *T. solium*. Tesis Licenciatura. FES Cuautitlán. UNAM. México.
22. Deitiker PR, Epstein HF (1993) Thick filament substructures in *Caenorhabditis elegans*: evidence for two populations of paramyosin. *Journal of Cell Biology*. 123;2:303-311
23. Dowben R.M (1969) Contractility. In: General Physiology. A molecular approach. Harper International ed. New York. 4:499, 504.
24. Eddinger TJ, Murphy RA (1988) Two smooth muscle myosin heavy chains differ in their light meromyosin fragment. *Biochemistry*. 27:3807-3811.

25. Epstein HF, Miller III DM, Ortiz I, Berliner GC (1985) Myosin and Paramyosin are organized about a newly identified core structure. *Journal of Cell Biology*. 100:904-915.
26. Fernandez-Patron C, Hardy E, Sosa A, Seoane J, Castellanos L (1995) Double staining of Coomassie blue stained polyacrylamide gels by imidazole-sodium dodecyl sulfate-zinc reverse staining: sensitive detection of Coomassie blue undetected proteins. *Analytical Biochemistry*. 224:263-269.
27. Flisser A, Woodhouse E, Larralde C (1980) Human cysticercosis: antigens, antibodies and non responders. *Clinical and Experimental Immunology*. 39:27-37.
28. Flisser A (1994) Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*. In: Progress in Clinical Parasitology. Tsieh Sun (eds). CRC press, Inc. 77-116
29. Flisser A (1995) *Taenia solium*, *Taenia saginata* and *Hymenolepis nana*. In: Enteric Infection 2. Intestinal helminths. Farthing MJG, Keusch GT and Wakelin D, editors. Chapman and Hall Medical. 13:173-189.
30. Flisser A, Madrazo I, Delgado H (1997) Cisticercosis humana. Ed El Manual Moderno. México. 1-64.
31. Flisser A (2002) Epidemiological studies of taeniosis and cisticercosis in Latin America. In: Cestode Zoonoses: Echinococcosis and cysticercosis. An emergent and global problem. Craig P, Pawloski Z, ed. IOS Press Omega: Nato Science series. 341:3-11.
32. Guerra G, Flisser A, Cañedo L, Lacleste J.P (1982) Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of

- Taenia solium*. In: Cysticercosis: Present states knowledge and perspectives. Flisser A, Willms K, Lacleste J.P, Larralde C, Ridaura C, Beltran F. Academic Press, New York. 437-451.
33. González Malerva L (1998) Comparación del reconocimiento de dos anticuerpos monoclonales producidos en contra de parásitos adultos de *Taenia solium* hacia diferentes miosinas. Tesis de Licenciatura QFB. Universidad La Salle. México.
34. González L, Ambrosio J (2003) Una mirada al interior de las células: el citoesqueleto. *Ciencias*. Facultad de Ciencias, UNAM. 70:68-75.
35. Gonzalez Malerva L, Cruz Rivera M, Reynoso-Ducoing O, Retamal C, Flisser A, Ambrosio JR (2004) Muscular myosin isoforms of *Taenia solium*. *Cell Biology International* 28;12: 885-894.
36. Halton DW, Maule AG, Mair GR, Shaw C (1998) Monogenean neuromusculature: some structural and functional correlates. *International Journal for Parasitology*. 28:1609-1623.
37. Hodge T, Cope J (2000) A myosin family tree. *Journal of Cell Science*. 113:3353-3354. <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/myosin/trees/trees.html>.
38. Holmes K (1996) Mucle proteins – their actions and interactions. *Current Opinion in Structural Biology*. 6:781-789.
39. Huxley HE (1957) The double array of filaments in cross-striated muscle. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. 3:631-647.
40. Kimura A, Tsuji T, Matoba R, Fujitani N, Ohmori K, Matsumura S (1991) Tissue-specific and non-tissue-specific heavy-chain isoforms of myosin in the brain as revealed by monoclonal antibodies. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1118:59-69.

41. King L, Jiang MJ, Huang TS, Sheu GC (1995) Protease-susceptible sites and properties of fragments of aortic smooth-muscle myosin. *Biochemical Journal*. 312:511-518.
42. Kubis HP, Gros G (1997) A rapid electrophoretic method for separating rabbit skeletal muscle myosin heavy chains at high resolution. *Electrophoresis*. 18:64-66.
43. Laclette JP, Ornelas Y, Merchant MT, Willms K (1982) Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. In Flisser A, Willms K, Laclette J.P, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds). Cysticercosis: Present states knowledge and perspectives. Academic Press. New York. 375-387.
44. Laclette J.P, Rodriguez M, Landa A, Arcos L, De Alba P, Mancilla R (1989) The coexistence of *Taenia solium* cysticerci and the pig: role of the antigen B. *Acta Leidensia*. 57; 2:115-122.
45. Laclette J.P, Alagon A, Willms K, Torre-Blanco (1990) A histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *T. solium* *Journal of Parasitology*. 76; 2:273-275.
46. Laclette JP, Landa A, Arcos L, Willms K, Davis EA, Shoemaker CB (1991) Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda). *Molecular and Biochemical Parasitology*. 44:287-296.
47. Laclette J.P, Shoemaker B, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C, Bing D, Nicholson Weller A (1992) Paramyosin inhibits complement C1 *Journal of Immunology*. 148:124-128.

48. Laclette JP, Skelly PJ, Merchant M, Shoemaker CB (1995) Aldehyde fixation dramatically alters the immunolocalization pattern of paramyosin in platyhelminth parasites. *Experimental Parasitology*. 81:140-143.
49. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
50. Landa A, Laclette J.P, Nicholson-Weller A, Shoemaker C (1993) cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). *Molecular and Biochemical Parasitology*. 60:343-348.
51. Lodish H, Berk A, Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell (2001) *Molecular Cell Biology*. Fourth Edition. W.H Freeman and Company
52. Lowy J, Hanson J (1962) The ultrastructure of invertebrate smooth muscles. *Physiological Reviews*. 42:34-47
53. Lumsden R, Byram J (1967) The ultrastructure of cestode muscle. *The Journal of Parasitology*. 53:2:326-342.
54. Mair GR, Maule AG, Shaw C, Halton DW (1998) Muscling in on parasitic flatworms. *Parasitology Today*. 14:73-76.
55. Maravilla P, Avila G, Cabrera V, Aguilar L, Flisser A (1998) Comparative development of *Taenia solium* in experimental models. *Journal of Parasitology*. 84: 882-886.
56. Martinez Guarneros A (1998). Detección de miosina de parásitos adultos de *Taenia solium* en fluidos biológicos recuperados de infecciones experimentales y naturales. Tesis de Licenciatura QFB. Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán, UNAM. México.

57. Medeiros NA, Reese TS, Jaffe TH, Degiorgis JA, Bearer EL (1998) Primary peptide sequences from squid muscle and optic lobe myosin II: strategy to identify an organelle myosin. *Cell Biology International*. 22:161-173
58. Merchant MT, Aguilar L, Avila G, Robert L, Flisser A, Willms, K (1998) *Taenia solium*: description of the intestinal implantation sites in experimental hamster infections. *Journal of Parasitology*. 84; 4:681-685.
59. Moore LA, Arrizubieta MJ, Tidyman WE, Herman LA, Bandman E (1992) Analysis of the chicken fast myosin heavy chain family. Localization of isoform-specific antibody epitopes and regions of divergence. *Journal of Molecular Biology*. 225:1143-1151.
60. Moran Tlatelpa EM (1999) Caracterización parcial de miosina de cisticerco de *Taenia solium*. Tesis de Licenciatura QFB. Facultad de Estudios Superiores de Zaragoza, UNAM.
61. Morano I (2003) Tuning smooth muscle contraction by molecular motors *Journal of Molecular Medicine*. 81:481-487.
62. Mounier N, Sparrow JC (1997) Structural comparison of muscle and non muscle actins gives insights into the evolution of their functional differences. *Journal of Molecular Evolution*. 44:89-97.
63. Murakami N, Mehta P, Elzinga M (1991) Studies on the distribution of cellular myosin with antibodies to isoform-specific synthetic peptides. *FEBS letters*. 278:23-25.
64. Oliveira GC, Kemp WM (1995) Cloning of two actin genes from *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 75:119-122.

65. Ostrosky L, Correa D, Faradji R, Garcia H, Flisser A (1991) *Taenia solium*: inhibition of spontaneous evagination of cysticerci by the host inflammatory capsule. *International Journal for Parasitology*. 21:603-604.
66. Paniagua R, Royuela M, Garcia-Anchuelo RM, Fraile B (1996) Ultrastructure of invertebrate muscle cell types. *Histology and Histopathology*. 11;1: 181-201.
67. Peltz G, Kuczmarski E, Spudich J (1981) Characterization of chymotryptic fragments and localization of the heavy chain phosphorylation site. *Journal of Cell Biology*. 89:104-108.
68. Pette D, Staron R (2000) Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy Research and Techniques*. 50:500-509.
69. Picard B, Barboiron MP, Duris H, Gagnière H, Jurie C, Geay Y (1999) Electrophoretic separation of bovine muscle myosin heavy chain isoforms. *Meat Science*. 1999:1-7
70. Rabiela MT, Hornelas Y, García-Allan C, Rodríguez-del-Rosal E, Flisser A (2000) Evagination of *Taenia solium* cysticerci: A histologic and electron microscopy study. *Archives of Medical Research*. 31:605-607.
71. Retamal CA, Thiebaut P, Alves EW (1999) Protein purification from polyacrylamide gels by sonication extraction. *Analytical Biochemistry* 268:15–20.
72. Reyes Nicolas VM (2000) Miosina de cisticerco de *Taenia solium* como producto de excreción/secreción *in vitro* e *in vivo*. Tesis de Licenciatura QFB. Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán, UNAM.

73. Reynoso-Ducoing O, Cruz-Rivera M, Ambrosio J, Flisser A (2000) Las actinas y su estudio en parásitos. *Revista de Educación Bioquímica*. 19; 1:32-35.
74. Sarti, E (1997) La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. *Salud Pública de México*. 39; 3:225-231.
75. Schantz PM, Moore A, Muñoz JL, Hartman B, Schoefer J, Aron A, Persaud D, Sarti E, Wilson M, Flisser A (1992) Neurocysticercosis in an Orthodox Jewish community in New York city. *New England Journal of Medicine*. 327; 10:692-695.
76. Schiaffino S, Reggiani C (1996) Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiological Reviews* 76;2: 371-423.
77. Sellers JR (1999) Myosins. Series Protein Profile. Second Edition. Oxford University Press, New York. 1:18-19.
78. Sheterline P, Clayton J, Sparrow JC (1998) Actin. Series Protein Profile. Fourth ed. Oxford University Press, UK.
79. Simanjuntak GM, Margono M, Okamoto Ito A (1997) Taeniasis/Cysticercosis in Indonesia as an emerging disease. *Parasitology Today* 13;9:321-323.
80. Smyth JD, McManus DP (1989) The physiology and biochemistry of cestodes. Cambridge University Press, Cambridge.
81. Szent-Györgyi A, Cohen C, Kendrick-Jones J (1971) Paramyosin and the filaments of molluscan catch muscles. II Native filaments: isolation and characterization. *Journal of Molecular Biology*. 56:239-258.

82. Talmadge RJ, Roland RR (1993) Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy chain isoforms. *Journal of Applied Physiology* 75:2337-2341.
83. Tashiro Y, Kumon A, Yasuda S, Murakami N, Matsumura S (1985) Two chymotrypsin-susceptible sites of myosin rod from chicken gizzard. *European Journal of Biochemistry*. 148:521-528.
84. Wahlberg MH, Karlstedt KA, Paatero G. C (1994) Cloning, sequencing and characterization of an actin cDNA in *Diphyllobotrium dendriticum* tapeworm (Cestoda). *Molecular and Biochemical Parasitology*. 65: 357-360.
85. Wahlberg MH (1997) Three main patterns in the expression of six actin genes in the plerocercoid and adult *Diphyllobotrium dendriticum* tapeworm (Cestoda). *Molecular and Biochemical Parasitology*. 86: 199-209.
86. Wahlberg MH, Johnson MS (1997) Isolation and characterization of 5 actin cDNAs from the cestode *Diphyllobotrium dendriticum*: a phylogenetic study of the multigene family. *Journal of Molecular Evolution*. 44:159-168.
87. White Clinton A (1997) Neurocysticercosis: A major cause of neurological disease world wide. *C I D*. 24; 101-115.
88. Winkelmann DA, Lowey S, Press JL (1983) Monoclonal antibodies localize changes on myosin heavy chain isozymes during avian myogenesis. *Cell*. 34:295-306.

VIII. Referencias

89. Willms K, Robert L, Caro JA (2003) Ultrastructure of smooth muscle, gap junctions and glycogen distribution in *Taenia solium* tapeworms from experimentally infected hamsters. *Parasitology Research*. 89:308-316.
90. Willms K, Sotelo J (2001). Cestodes. In: Principles and Practice of Clinical Parasitology. Gillespie S, Pearson RD (eds). John Wiley & Sons Ltd. 23:613-632.

Muscular myosin isoforms of *Taenia solium* (Cestoda)

Laura Gonzalez-Malerva^a, Mayra Cruz-Rivera^a, Olivia Reynoso-Ducoin^a,
Claudio Retamal^b, Ana Flisser^a, Javier R. Ambrosio^{a,*}

^aDepartamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Interior, Ciudad Universitaria, México DF 04510, México

^bCentro de Biotecnología e Biotecnología, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro 28015400, Brasil

Received 29 April 2004; revised 23 August 2004; accepted 6 September 2004

Abstract

Type II myosin, the primary component of the thick filament of muscle fibers, is organized as a dimeric high molecular weight protein, and is composed of a pair of heavy chains (MHC) and two pairs of light chains. Myosin II transforms ATP energy into mechanical force. All type II myosins are conserved proteins but they have two variable regions that are located in different places of the molecule. Myosin molecules are encoded by a multigene family and many isoforms are generated. The expression of myosins depends on the developmental stage and on the type and degree of contractile activity and tissue, therefore several myosin isoforms are found in the same organism. Here we describe the use of different techniques that allowed demonstrating the presence of isoforms of the heavy chain type II myosin of *Taenia solium* cysticerci (larvae) and tapeworms (adults), a cestode parasite of importance in public health in many developing countries. Myosin was purified and used in comparative proteolytic fragmentation, ATPase activity, detection of antigenic differences and electrophoretic separation. The results obtained showed biochemical and immunochemical differences among cysticerci and tapeworms, and demonstrate the presence of myosin isoforms in *T. solium* that are probably associated to physiological requirements of each developmental stage.

© 2004 International Federation for Cell Biology. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Isoforms; ATPase; Myosin II; Myosin heavy chain; Muscular proteins; *Taenia solium*

1. Introduction

Type II myosins are the major contractile proteins in muscles. Myosin is the primary component of the thick filament and is organized as a dimeric high molecular weight protein, composed of a pair of heavy chains (MHC) and two pairs of light chains. Myosin II transforms ATP energy into mechanical force because of its ATPase enzymatic activity dependent of polymerized actin (Alberts et al., 2002; Sellers, 1999; Holmes,

1996). All type II myosins are conserved proteins but they have two variable regions that are located in different places of the molecule. Members of type II myosin, the best studied of all myosins, are mainly divergent at their filamentous regions because of differences in their amino acid composition (Sellers, 2000). The filament or rod is responsible for the immunochemical properties (Moore et al., 1992; Murakami et al., 1991) and determines the function and location of myosin, as well as the binding sites for assemblage into thick filaments (Liang et al., 1999). The head or globular region, and its light chains, differs in ATPase activity, conferring specific physiological tasks to the molecule (De la Cruz and Ostap, 2004; Sellers, 1999). Myosin molecules are encoded by a multigene family and many

* Corresponding author. Tel.: +5255 5623 2467; fax: +5255 5623 2382.

E-mail address: jrah@servidor.unam.mx (J.R. Ambrosio).

isoforms are generated as products of alternative splicing in pre mRNA (Sellers, 1999; Schiaffino and Reggiani, 1996). The expression of myosin depends on the developmental stage, on the type and degree of contractile activity and tissue, therefore several myosin isoforms are found in the same organism (Arner et al., 2003; Berg et al., 2001; Babu et al., 2000). Myosin ATPase activities, limited proteolysis, electrophoretic separation and immunochemical assays are successful strategies for demonstrating the presence of isoforms (De la Cruz and Ostap, 2004; Blough et al., 1997; King et al., 1995; Kimura et al., 1991). Type II myosin and several actin isoforms were found in muscle fibers of *Taenia solium* (Ambrosio et al., 2003; Ambrosio et al., 1997). This cestode parasite has two developmental stages, cysticerci (larvae) and tapeworms (adults), the former causes neurocysticercosis in humans, a disease of public health importance in many developing countries (Flisser, 2002). The aim of the present work was to analyze protein expression of myosin II in both stages of this cestode in order to demonstrate the presence of isoforms.

2. Materials and methods

2.1. Parasites

T. solium cysticerci were obtained from infected pig muscle, washed and kept at -20°C . Some cysticerci were used for producing intestinal tapeworms, in the experimental model of taeniosis in hamsters (Maravilla et al., 1998). After infection tapeworms were recovered, washed and kept at -20°C .

2.2. Muscular protein extractions

2.2.1. Myosin

Two different strategies for obtaining muscular myosin from cysticerci and tapeworms were followed. For biochemical assays, myosin in solution was obtained in 600 mM KCl according to Ambrosio et al. (1997). For evaluation of isoforms, a more enriched fraction of myosin was isolated as for molluscan muscular proteins with slight modifications (Szent-Györgyi et al., 1971): parasites were homogenized in a Brinkmann polytron at medium speed for 10 s in 2 vol of cold solution of 40 mM KCl, 6.7 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 and 1 mM MgCl_2 . Afterwards protease inhibitor cocktail tablets (complete™ EDTA-free, Roche) were added; each suspension was filtered with gauze and homogenates were centrifuged at $20,000 \times g$ for 5 min. Each pellet was resuspended in the same solution, homogenized and centrifuged once more. The pellet was resuspended in 50 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 6.7 mM sodium phosphate buffer pH 6.0 and

homogenized, afterwards 0.1 mM EDTA, 5 mM ATP and protease inhibitor cocktail tablets (complete™, Roche) were added; the mixture was stirred at 4°C for 10 min and centrifuged at $80,000 \times g$ for 20 min. The pellet was resuspended in 50 mM KCl, 6.7 mM sodium phosphate buffer pH 6.0 afterwards 1 mM EDTA and 5 mM ATP were added, stirred at 4°C for 10 min and centrifuged at $80,000 \times g$ for 20 min. The pellet was resuspended in 50 mM KCl and 6.7 mM sodium phosphate buffer pH 6.0, powdered KCl was added during stirring to bring it to a final concentration of 400 mM. This suspension contained mainly myosin; to remove remains of actin, 3 mM ATP and 5 mM MgCl_2 were added and centrifuged at $100,000 \times g$ for 4 h. The supernatant, which contained myosin for isoform analysis was aliquoted and kept at -20°C . The extraction procedure was analyzed in 10% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, Laemmli, 1970) in a Mini protean III chamber (BioRad) at 80 V for 3 h under reduced conditions using the commercial buffer with β -mercaptoethanol (BioRad).

2.2.2. Myosin heavy chain

Final supernatants for myosin isoform analysis were submitted to 8% SDS-PAGE in the same conditions as above, after being stained with Zn-imidazole (negative stain), the myosin heavy chain (MHC) band (245 kDa) was excised from the gel, destained in 0.5 M EDTA (pH 8.0) and washed with distilled water to remove EDTA (Fernandez-Patron et al., 1995). In order to dry the band, the gel was washed with 50% acetonitrile for 5 min, 50 mM NH_4HCO_3 /50% acetonitrile for 30 min, and with 10 mM NH_4HCO_3 /50% acetonitrile for 30 min. MHC bands were dried in a vacuum, centrifuged (Dyna Vap, Labnet) for 1 h and kept at -20°C until use. In order to estimate the MHC concentration in each band, an 8% SDS-PAGE gel that also contained several concentrations of commercial porcine myosin (Sigma), used as a standard curve, was analyzed after being stained with Zn-imidazole. Semi-quantitative analysis was performed by LabWorks Analysis Software V.3.0.02.00, for each band, arbitrary values in percent units were obtained and, in comparison with a standard curve, the concentration of MHC was established.

2.2.3. Actin

In order to obtain actin to be used in enzymatic reactions, parasites were homogenized at low speed in equal volume of cold 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 with 1 mM EDTA at 4°C . The suspension was centrifuged at $500 \times g$; the pellet was recovered and mixed with 2 vol of 100 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , and 5 mM ATP in 16 mM phosphate buffer pH 7.3, homogenized at high speed for 30 s and centrifuged at $500 \times g$. The supernatant was again centrifuged at $40,000 \times g$ to separate myofilaments (Heidcamp, 1996)

that were recovered in the supernatant and diluted 1:1 with 1 M Tris–HCl, 0.2 mM ATP, 0.1 mM MgCl₂ and 0.2 mM DTT pH 7.0 and processed for F-actin purification with minor modifications (Pinder et al., 1995). The solution was incubated 15 min at 30 °C to polymerize actin, applied to a Sheparose CL-4B column (1 × 23.6 inches) and eluted in the same buffer at 1 ml/min. The column was calibrated with the following standards: dextran blue, 2000 kDa; apoferritin, 443 kDa; albumin, 66 kDa; carbonic anhydrase, 29 kDa. Each fraction collected was determined at 280 nm and, in accordance to molecular weight markers; actin was identified in an ELISA using commercial polyclonal anti-actin antibody (Sigma).

2.3. Biochemical analysis

2.3.1. Myosin ATPase activity and kinetics

Inorganic phosphate (Pi) was measured using a malachite green colorimetric assay (Hightower and McCarty, 1996) under conditions for myosin ATPase (Perry, 1955). Individual tubes containing 5 µg of semipure myosin (Ambrosio et al., 1997) and 0.5 µg of F-actin were prepared in 200 µl ATPase reaction medium (100 mM Tris base, 100 mM CaCl₂, 100 mM MgCl₂, 50 mM ATP, pH 9.0–9.5 at 25 °C). Reactions were measured during 10 min, using one sample each minute. For this, reactions were stopped with 100 µl of cold 15% trichloroacetic acid and placed on ice. In order to measure Pi released, 100 µl of each sample were added to 400 µl distilled water, 500 µl of 0.55% green malachite solution and mixed. After 2 min 500 µl of 10% citric acid (w/v) was added and the solution was again mixed. Tubes were centrifuged to remove the pellet and absorbance values were determined at 600 nm in the following 30–120 min. Enzymatic activity was measured with increasing actin concentrations (from 0.01 to 0.2 nM). Speed of the enzymatic reaction was expressed as specific activity (nmole Pi/min/mg of protein). V_{max} and K_m for each myosin were calculated using Michaelis and Hill equations in the Microcal Origin program 6.0 version (Trybus, 2000). As controls, commercial porcine myosin and actin (Sigma) were used.

2.3.2. Proteolytic fragmentation of myosin heavy chain

Partial digestion of MHC bands was performed as described by Cleveland et al. (1977) with some modifications as follows: MHC bands were incubated with chymotrypsin (Sigma) at a ratio of 1:40 (w/w) for 30 min at 4 °C; afterwards an equal volume (15 µl) of 10 mM NH₄HCO₃ pH 8.0 was added. Each band was incubated at 37 °C for 30, 60 or 120 min. The digestion was stopped with SDS reducing sample buffer (Sigma) and boiled for 2 min. To evaluate peptides, each MHC band from *cysticerci* and tapeworms was loaded onto

a lane and analyzed in 8% SDS-PAGE at 100 V for 2 h (Laemmli, 1970) and the peptides were visualized after silver staining. The apparent molecular weights and the relative amounts of peptides were calculated by densitometric analysis using the Gel Perfect computational program (Retamal et al., 1999) from a TIFF image obtained with a ScanJet 3200C (Hewlett–Packard, USA) scanner at 400 dpi.

2.3.3. Myosin isoforms analysis

To evaluate the presence of isoforms, parasite MHC was submitted to an electrophoretic separation according to Talmadge and Roy (1993), with slight modifications as performed by Picard et al. (1999) that included the addition of β-mercaptoethanol into the upper buffer. The resultant proteins were visualized after silver staining.

2.4. Immunochemical analysis

2.4.1. Anti-myosin antibody recognition

Reactivity of anti-myosin antibodies with soluble parasite myosins (Ambrosio et al., 1997) was evaluated by ELISA. Protein samples (1 µg per well) were adsorbed onto plates (Maxisorb, Nunc) overnight in 0.1 M carbonate buffer, pH 9.6, washed and blocked with 5% commercial unfatted milk (Svelty, Mexico) in PBS 0.3% Tween. Monoclonal antibody (MAb4B3) as a hybridoma culture supernatant (Ambrosio et al., 1997) and a polyclonal anti-*T. solium* myosin antibody (MyoPAb) from hyperimmune rabbit sera (Kumar et al., 2003) were added at decreasing dilutions. After washing the plate, anti-mouse or anti-rabbit IgG coupled to peroxidase (1:1000, Zymed) was incubated followed by 0.4 mg/ml OPD (*ortho*-phenyl diamine), diluted in 0.1 M citrate buffer with 30% (v/v) H₂O₂. All antibodies were incubated for 120 min at 30 °C. The final reaction was stopped with 2 M sulphuric acid and absorbance values were obtained at 492 nm.

2.4.2. Immunoreactivity of MHC peptides

Peptides in the SDS-PAGE gels were submitted to western blotting in polyvinyl-difluoride membrane (PVDF, Millipore), previously activated with methanol, in a Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BioRad) for 10 min at 10 V and 30 min at 20 V. The transfer buffer was 48 mM Tris, 39 mM glycine pH 9.2, 0.375% SDS and 20% methanol and the membrane was blocked with 1% bovine albumin (Sigma) in PBS–Tween and incubated with MAb4B3 (culture supernatant); the reaction was visualized when the membrane was incubated with anti-mouse conjugated to peroxidase (1:1000) and developed with a chemiluminescent substrate Super Signal West Pico (Pierce). A laboratory imaging and analysis system (UVP) was used to capture the PVDF image and analyze it by LabWorks Analysis

Software V.3.0.02.00. Afterwards the membrane was washed to eliminate antibodies by incubating 30 min at 50 °C with buffer containing 62.5 mM Tris–HCl pH 6.8, 2% SDS and 100 mM β -mercaptoethanol; this solution was washed with PBS–Tween 0.3% alternating with PBS, finally the membrane was incubated with MyoPAb (1:17000, Zymed), anti-rabbit IgG (1:1500, Zymed) as secondary antibody and the reaction was developed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB). The resultant image was processed as the previous one.

3. Results

3.1. ATPase myosin activity

Enzymatic activity was analyzed using soluble myosin and actin from cysticerci, tapeworms and pigs. Linear positive slopes were obtained for homologous proteins but negligible activity was induced in non-homologous myosin–actin systems (Fig. 1A). Also

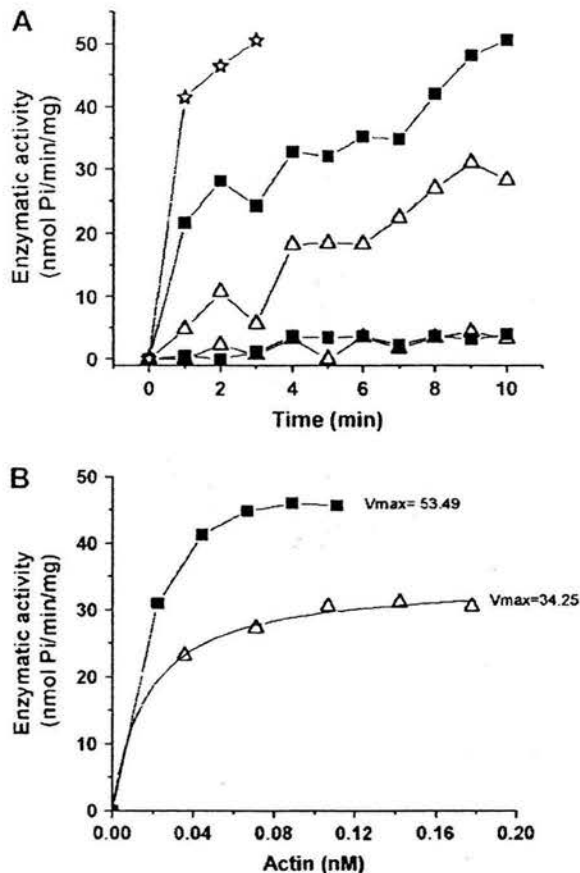


Fig. 1. ATPase myosin activity. Malachite green colorimetric determinations of enzymatic activity of *T. solium* myosin from cysticerci (empty triangles), tapeworms (full squares) and porcine muscle (empty stars) are shown along 10 min (A) and according to actin concentration (B). V_{max} estimation was obtained at steady state using Microcal Origin software.

linear positive slopes were obtained when enzymatic kinetics at steady state of specific actin–myosin interactions was performed (Fig. 1B). V_{max} for each myosin was adjusted according to Michaelis–Menten equation and different values were obtained: 34.25 for cysticerci and 53.49 for tapeworms.

3.2. Myosin extraction

Muscular MHC from cysticerci and tapeworms was seen at 245 kDa, but other proteins weighting approximately 98, 45 and 40 kDa were also obtained with the extraction procedure. In cysticerci, contaminating proteins appeared faintly in comparison with tapeworms (Fig. 2). Western blot assays allowed to corroborate the nature of these bands: anti-myosin MAb4B3 reacted with the upper band, hyperimmune anti-paramyosin (kindly donated by JP Laclette, UNAM, Mexico) reacted with the 98 kDa band and anti-actin antibodies (Chemicon) with the 45 kDa band; the 40 kDa band did not react with any antibody used (data not shown).

3.3. Proteolytic fragmentation of myosin heavy chain

The band corresponding to MHC was excised from SDS-PAGE and digested in the gel with chymotrypsin. Fig. 3 shows the digestion patterns at 0, 30, 60 and 120 min of cysticerci (A) and tapeworms (B). The relative mobility and concentration of each band were obtained with the Gel Perfect program, and is shown in Fig. 3C and D for cysticerci and tapeworms, respectively. Prior to digestion, cysticerci and tapeworms had

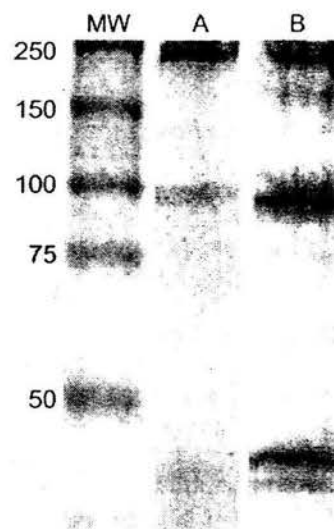


Fig. 2. Semipure myosins. Banding patterns of semi-purified myosins in gels stained with Coomassie blue are seen for cysticerci (A) and for tapeworms (B). Pre-stained broad range molecular weight markers (MW) were used. MHC band (245 kDa) was used for digestion.

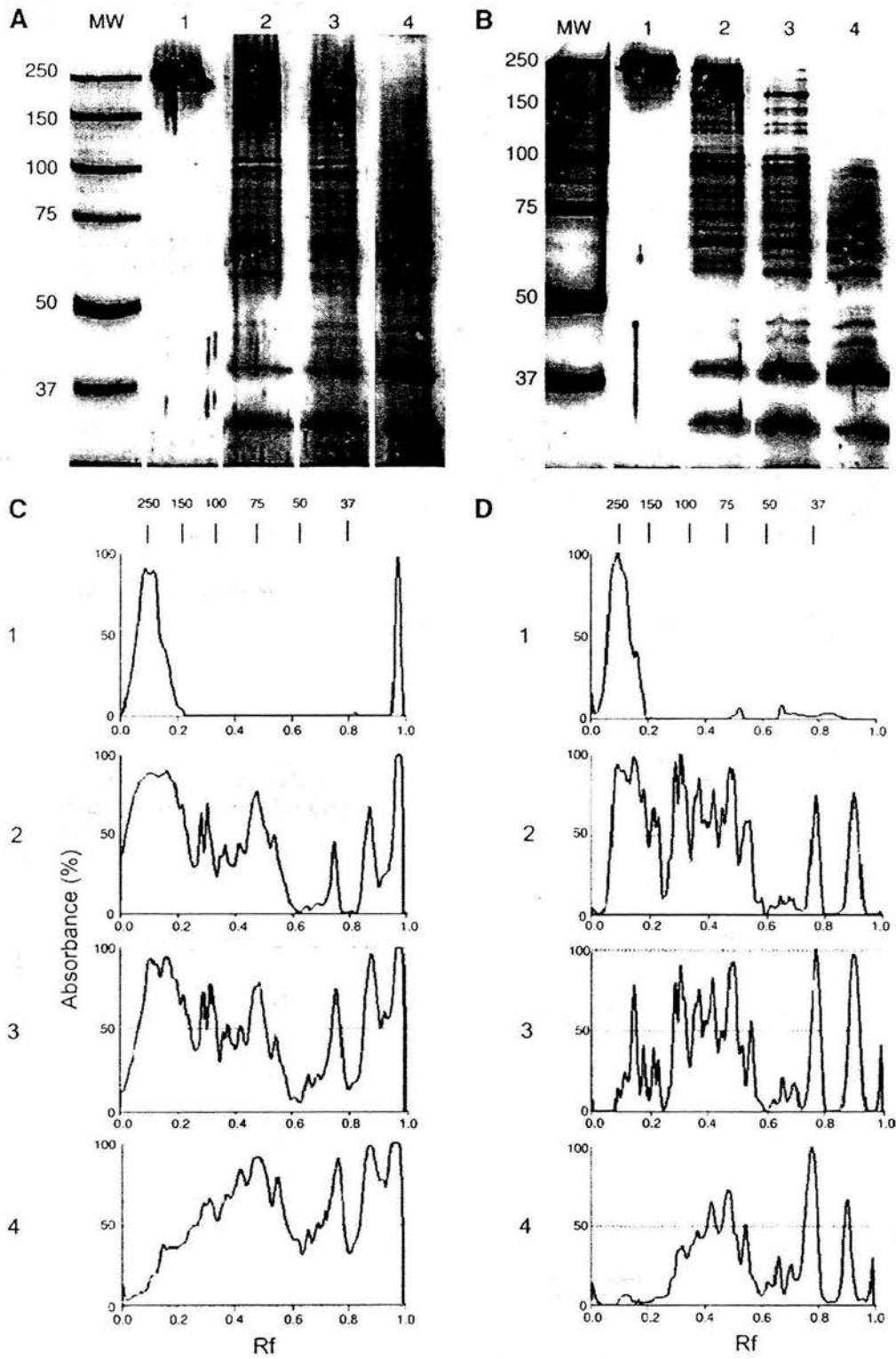


Fig. 3. Proteolytic fragmentation of MHC. Myosin heavy chain was digested with chymotrypsin in cysticerci (A) and tapeworms (B) and analyzed after silver staining. Pre-stained broad range molecular weight markers (MW) were used. Gel Perfect analysis was done to bands of each proteolytic fragmentation of cysticerci (C) and tapeworms (D) showing percentage absorbance and Rf values. Lanes and rows correspond to 0 min (1), 30 min (2), 60 min (3) and 120 min (4) of digestion.

similar patterns, at 30 min different digestion patterns were seen, with more peptides between 211 and 66 kDa, and corresponding Rf values of 0.1–0.6, in tapeworms. Bands between 54 and 44 kDa (0.6–0.7 Rf) were few in both samples, more were seen at 40–32 kDa (0.7–0.9 Rf). MHC remained at 30 and 60 min in cysticerci but started to disappear in adults from the beginning of digestion, at 120 min it was gone from all samples. The patterns seen at 30 and 60 min were similar in each parasite stage, except high molecular weight peptides (0.1–0.2 Rf) that diminished in tapeworms and low molecular ones (0.7–0.9 Rf) that increased in concentration in cysticerci and tapeworms. At 120 min, notoriously, high molecular weight bands practically disappeared in both samples, changing to middle size bands in cysticerci; in comparison, no increase of middle or low molecular weight bands was seen in tapeworms. In general, tapeworm myosin was more susceptible to chymotrypsin digestion than that of cysticerci.

3.4. Analysis of myosin isoforms

Differences in the expression of myosin isoforms were found in MHC (Fig. 4): three isoforms were detected in cysticerci, while only one, heavier, was seen in tapeworms; also porcine muscle myosin (Sigma) was resolved in three isoforms. All isoform bands were found close to 250 kDa.

3.5. Anti-myosin antibody recognition

MyoPAb reacted at dilutions around 10^6 against cysticercus myosin and around 10^5 against tapeworm myosin, dilutions of MAb4B3 decreased its reactivity; monoclonal and polyclonal antibodies had a very low reaction with porcine muscle myosin (Fig. 5).

3.6. Immunoreactivity of MHC peptides

MyoPAb and MAb4B3 recognized several peptides above 100 kDa and others between 80 and 100 kDa, interestingly at longer times of digestion recognition of the latter bands increased, MyoPab also recognized

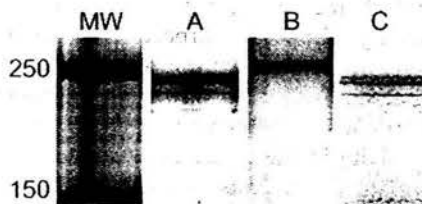


Fig. 4. Myosin isoforms. Electrophoretic separation was undertaken in SDS-PAGE gel silver stained with glycerol and EDTA for cysticerci (A) tapeworm (B) and porcine muscle myosin (C). Pre-stained broad range molecular weight markers (MW) were used.

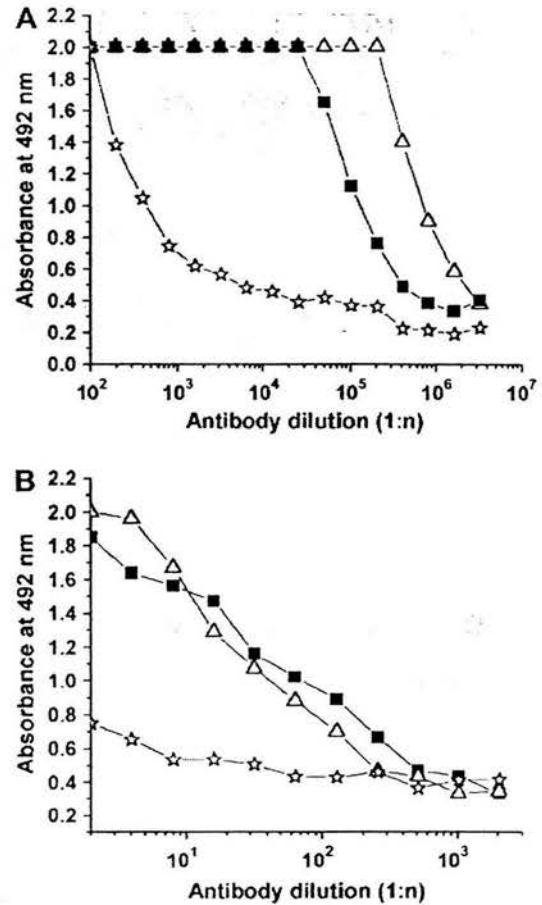


Fig. 5. Recognition of *T. solium* myosin. ELISA reactions of different dilutions of MyoPAb (A) and MAb4B3 (B) against myosin from cysticerci (empty triangles), tapeworms (full squares) and porcine muscle (empty stars).

a 63 kDa band in cysticerci and tapeworms (Fig. 6A and B) while MAb4B3 reacted with a 68 kDa band only in cysticerci (Fig. 6 C). Reactivity with tapeworm myosin was very low with MyoPAb and only apparent at 30 min digestion as compared to MAb4B3 in which bands between 80 and 100 kDa were seen at 30 and 60 min digestion (Fig 6 B and D).

4. Discussion

Purification of myosin is a difficult task; our results indicate that pH and ionic strength were critical factors for the extraction of myosin in order to attain its solubilization. Although the purification procedure was carried out many times with similar results, it was not possible to obtain purified myosin; it was contaminated with paramyosin and actin. Paramyosin is also present in the core of thick myofibers (Cohen and Parry, 1998; Epstein et al., 1985; Lowy and Hanson, 1962).

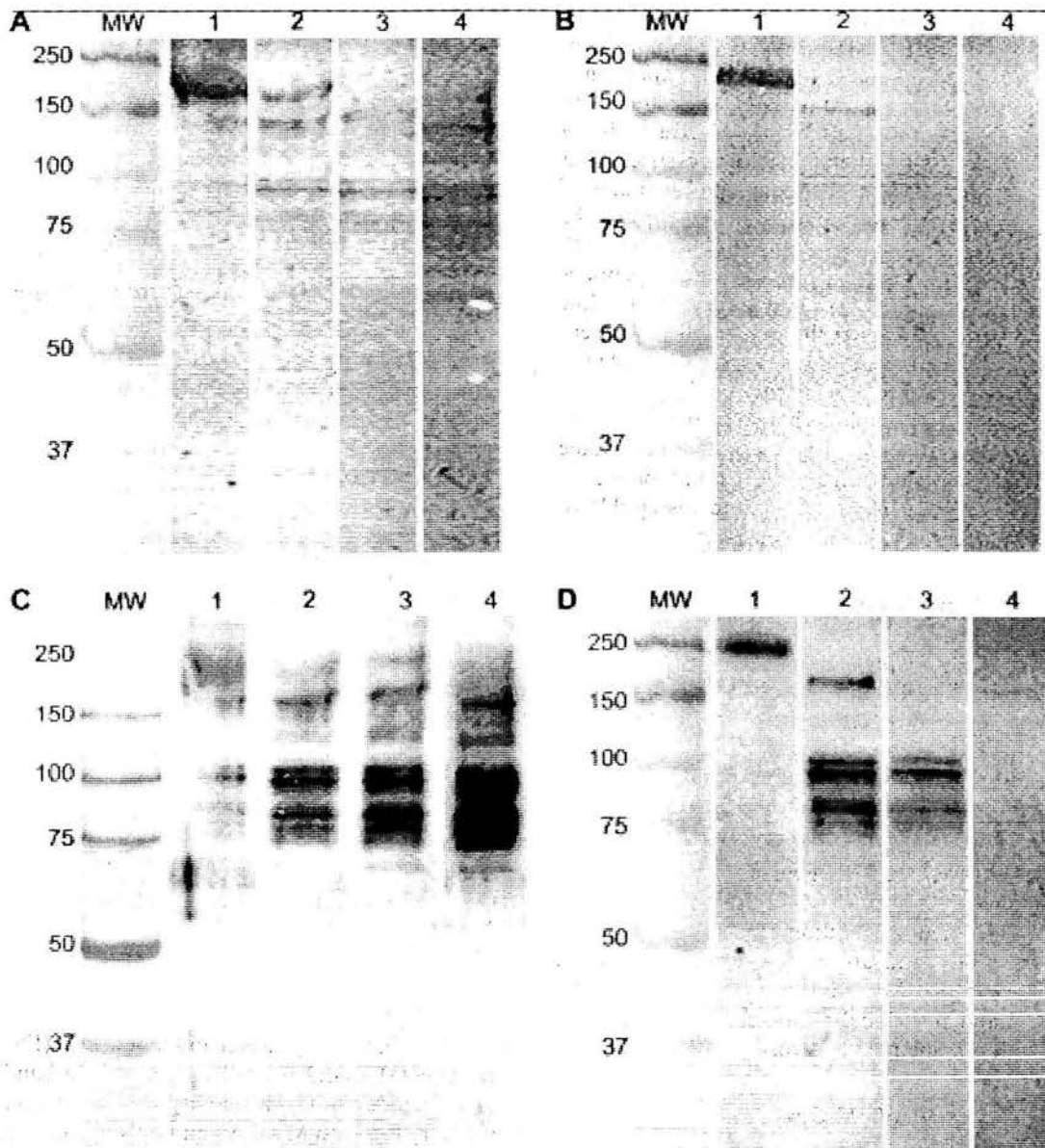


Fig. 6. MHC peptides recognized by anti-myosin antibodies. Western blotting of MHC samples from cysticerci (A and C) and tapeworms (B and D) digested with chymotrypsin as shown in Fig. 3, and reacted with MyoPAb (A and B) or MAb4B3 (C and D). Pre-stained broad range molecular weight markers (MW) were used.

separation of these proteins is difficult because the interaction of the hydrophobic region of myosin with paramyosin is necessary for the solubility and assemblage of thick filaments (Medeiros et al., 1998; Cohen and Parry, 1998). Paramyosin is an important molecule in *T. solium* and has been profusely described (Laclette et al., 1991; Guerra et al., 1982; Flisser et al., 1980). Actin association with myosin is expected since interaction of myosin with actin generates muscular contraction (Holmes, 1996). Actin isoforms have also been demonstrated in *T. solium* (Ambrosio et al., 2003).

Another technical difficulty was measurement of ATPase activity, for this purpose, a malachite green colorimetric assay (Hightower and McCarty, 1996; Kodama et al., 1986) was used with some modifications, which improved the process and consequently yielded high sensitivity in the determination of nmole concentrations of inorganic phosphorous.

The use of different types of techniques allowed demonstrating the presence of type II myosin isoforms. Specific ATPase activity depends on interaction with actin isoforms (Khaitlina, 2001) and degradation of

ATP depends on the amino acid composition of some head regions of myosin (De la Cruz and Ostap, 2004). As judged by enzymatic kinetics of cysticerci and tapeworms, these proteins are different in the utilization of ATP which could be indicative of the expression of isoforms in developmental stages of *T. solium*. V_{max} values, estimated for each myosin at steady stage level, further support that myosins used ATP for energy production with different intensity. Tapeworm myosin uses better ATP for obtaining energy probably because of the muscular contraction needed by the parasite to remain in the host intestine, where continuous and vigorous movements are always present (Flisser, 1995; Merchant et al., 1998). In contrast, cysticerci need less energy because they have restricted movements inside muscle and brain, where they lodge (Flisser, 1994; Ostrosky et al., 1991). This further suggests that there are different isoforms of myosin in *T. solium* depending on the physiologic status and type of tissue where the parasites are found, as evidenced in other organisms (Andersen et al., 2000; Babu et al., 2000; Pette and Staron 2000; Murakami et al., 1991; Winkelmann et al., 1983).

In order to analyze differences in peptide patterns, MHC was digested; peptides between 78 and 66 kDa had the highest concentration in both developmental stages at the end of the digestion, suggesting that no further cleavage sites for chymotrypsin are present. On the other hand, tapeworm myosin was more susceptible to chymotrypsin cleavage than cysticerci. This information, together with the finding that peptides between 40 and 30 kDa had different concentrations in cysticerci and tapeworms, points to differences in amino acid sequences and therefore suggests that they correspond to isoforms. We can also suggest that digestion performed in the gel was a successful procedure since similar peptides to those described in previous reports were found (King et al., 1995; Eddinger and Murphy, 1988; Tashiro et al., 1985). Furthermore, previous findings (King et al. 1995) show that the flexible region in the tail of smooth muscle myosin is found in peptides that have molecular weights similar to those found in *T. solium* myosin (30–32 kDa).

Differences in myosin peptides between parasite stages were also seen with both antibodies. The use of antibodies has been a good strategy for the analysis of structural differences between isoforms (Moore et al., 1992; Kimura et al., 1991; Winkelmann et al., 1983). Digestion patterns showed that antibody recognition was in peptides of 200–63 kDa, interestingly the epitope recognized was different, because in cysticerci recognition increased with digestion time, while in tapeworms all bands disappeared at 120 min. There were also differences detected with each antibody: MAb4B3 recognized a faint band of 68 kDa present only in cysticerci, and MyoPAb recognized a band of 63 kDa

present in both parasitic stages. These results again suggest the presence of isoforms. ELISA showed that *T. solium* myosins were antigenically different as seen in the reaction with the antibodies used; MyoPAb reacted 10 times higher with cysticerci than with tapeworm myosins. Similar differences in myosins have been detected using muscular vertebrate myosins as antigens (Kato et al., 1995; Kimura et al., 1991). Antigenic differences in taeniid myosins can be used as a tool for distinguishing them from other known myosins, as demonstrated in the present study when their reaction was compared to commercial porcine myosin using antibodies produced against parasite myosins. Similar results related with the production of specific antibodies, which detect myosin differences, were obtained in *Plasmodium falciparum* (Pinder et al., 1998).

The presence of isoforms was confirmed by electrophoretic separation of MHC in SDS gels containing glycerol and EDTA. In this gel, one isoform was seen in tapeworm myosin with a molecular weight of approximately 250 kDa and three in cysticerci, which were lower to the one of tapeworms. The existence of three isoforms in cysticerci may support the presence of high molecular weight peptides still found at 120 min digestion, which were absent in tapeworms, as well as the reactivity of both anti-myosin antibodies with cysticerci but not with tapeworms at the end of digestion. The differences found in ATPase activities, antigenic reactivity, patterns of digestion and presence of isoforms by SDS-PAGE gels in the present study demonstrate that type II myosins in *T. solium* are isoforms that are probably associated to physiological requirements of each developmental stage.

Acknowledgements

We thank Dr. Gonzalo Izaguirre for the protocol for digestion of proteins in gel. This work was supported by DGAPA-UNAM grants IN200297, IN203900 and IN201003, CONACYT 28094B and PAEP grants 201322, 202318 and 202376, as well as a fellowship of CONACYT 130114 and of IUPAB for support of LGM and CONACYT 117069 for support of MCR. The experiments described herein comply with the current laws of science and technology and animal care in Mexico.

References

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. The cytoskeleton. Molecular biology of the cell. New York: Garland Science; 2002. p. 954–56.
- Ambrosio J, Cruz-Rivera M, Allan J, Moran E, Ersfeld K, Flisser A. Identification and partial characterization of a myosin-like protein

- from cysticerci and adults of *Taenia solium*, using a monoclonal antibody. *Parasitology* 1997;114:545–53.
- Ambrosio J, Reynoso-Ducoing O, Hernández-Sánchez H, Correa-Piña D, González-Malerva L, Cruz-Rivera M, et al. Actin expression in *Taenia solium* cysticerci (Cestoda): tisular distribution and detection of isoforms. *Cell Biol Intl* 2003;27:727–33.
- Andersen L, Schjerling P, Saltin B. Muscle genes and athletic performance. *Sci Am* 2000;30–7.
- Arner A, Lofgren M, Morano I. Smooth, slow and smart muscle motors. *J Muscle Res Cell Motil* 2003;24:165–73.
- Babu GJ, Warshaw D, Periasamy M. Smooth muscle myosin heavy chain isoforms and their role in muscle physiology. *Microsc Res Tech* 2000;50:532–40.
- Berg JS, Powell BC, Cheney RE. A millennial myosin census. *Mol Biol Cell* 2001;12:780–94.
- Blough ER, Rennie ER, Zhang F, Reiser PJ. Enhanced electrophoretic separation and resolution myosin heavy chains in mammalian and avian skeletal muscles. *Electrophoresis* 1997;18:64–6.
- Cleveland D, Fischer S, Kirschner M, Laemmli U. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J Biol Chem* 1977;252:1102–6.
- Cohen C, Parry D. A conserved C-terminal assembly region in paramyosin and myosin rods. *J Struct Biol* 1998;122:180–7.
- De la Cruz EM, Ostap ME. Relating biochemistry and function in the myosin superfamily. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16:61–7.
- Eddinger TJ, Murphy RA. Two smooth muscle myosin heavy chains differ in their light meromyosin fragment. *Biochemistry* 1988;27:3807–11.
- Epstein HF, Miller III DM, Ortiz I, Berliner GC. Myosin and Paramyosin are organized about a newly identified core structure. *J Cell Biol* 1985;100:904–15.
- Fernandez-Patron C, Hardy E, Sosa A, Seoane J, Castellanos L. Double staining of Coomassie blue stained polyacrylamide gels by imidazole-sodium dodecyl sulfate-zinc reverse staining: sensitive detection of Coomassie blue undetected proteins. *Anal Biochem* 1995;224:263–9.
- Flisser A. Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*. In: Sun Tsieh, editor. *Progress in clinical parasitology*. CRC Press, Inc.; 1994.
- Flisser A. *Taenia solium*, *Taenia saginata* and *Hymenolepis nana*. In: Farthing MJG, Keusch GT, Wakelin D, editors. *Enteric infection 2. Intestinal helminths*. vol. 13. Chapman and Hall Medical; 1995. p. 173–89.
- Flisser A. Epidemiological studies of taeniasis and cysticercosis in Latin America. In: Craig P, Pawlowski Z, editors. *Cestode zoonoses: echinococcosis and cysticercosis. An emergent and global problem*. Nato Science Series, vol. 341. IOS Press Ohmsha; 2002. p. 3–11.
- Flisser A, Woodhouse E, Larralde C. Human cysticercosis: antigens, antibodies and non responders. *Clin Exp Immunol* 1980;39:27–37.
- Guerra G, Flisser A, Cañedo L, Lacleste JP. Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of *Taenia solium*. In: Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F, editors. *Cysticercosis: present status knowledge and perspectives*. New York: Academic press; 1982. p. 437–51.
- Heidecamp WH. Tubules and filaments. *Cell biology laboratory manual, lab protocols* 1996; <http://homepages.gac.edu/~cellab/chpts/chpt9/ex9-9.html>.
- Hightower KE, McCarty RE. Structural stability of chloroplast coupling factor I as determined by differential scanning calorimetry and cold inactivation. *Biochemistry* 1996;35:4852–7.
- Holmes K. Muscle proteins – their actions and interactions. *Curr Opin Struct Biol* 1996;6:781–9.
- Katoh H, Suzuki T, Yokomori K, Susuki S, Ohtaki E, Watanabe M, et al. A novel immunoassay of smooth muscle myosin heavy chain in serum. *J Immunol Methods* 1995;185:57–63.
- Khaitlina SY. Functional specificity of actin isoforms. *Int Rev Cytol* 2001;202:35–98.
- Kimura A, Tsuji T, Matoba R, Fujitani N, Ohmori K, Matsumura S. Tissue-specific and non-tissue-specific heavy-chain isoforms of myosin in the brain as revealed by monoclonal antibodies. *Biochem Biophys Acta* 1991;1118:59–69.
- King L, Jiang MJ, Huang TS, Sheu GC. Protease-susceptible sites and properties of fragments of aortic smooth-muscle myosin. *Biochem J* 1995;312:511–8.
- Kodama T, Fukui K, Kometani K. The initial burst in ATP hydrolysis by myosin and subfragment-1 as studied by a modified malachite green method for determination of inorganic phosphate. *J Biochem* 1986;99:1465–72.
- Kumar D, McGeown JG, Reynoso-Ducoing O, Ambrosio JR, Fairweather I. Observations on the musculature and isolated muscle fibres of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 2003;127:457–73.
- Lacleste JP, Landa A, Arcos L, Willms K, Davis EA, Shoemaker CB. Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda). *Mol Biochem Parasitol* 1991;44:287–96.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- Liang W, Warrick HM, Spudich JA. A structural model for phosphorylation control of *Dictyostelium* myosin II thick filament assembly. *J Cell Biol* 1999;147(5):1039–48.
- Lowy J, Hanson J. The ultrastructure of invertebrate smooth muscles. *Physiol Rev* 1962;42:34–47.
- Maravilla P, Avila G, Cabrera V, Aguilar L, Flisser A. Comparative development of *Taenia solium* in experimental models. *J Parasitol* 1998;84:882–6.
- Medeiros NA, Reese TS, Jaffe TH, Dègiorgis JA, Bearer EL. Primary peptide sequences from squid muscle and optic lobe myosin IIs: strategy to identify and organelle myosin. *Cell Biol Intl* 1998;22:161–73.
- Merchant MT, Aguilar L, Avila G, Robert L, Flisser A, Willms K. *Taenia solium*: description of the intestinal implantation sites in experimental hamster infections. *J Parasitol* 1998;84:681–5.
- Moore LA, Arrizubieta MJ, Tidyman WE, Herman LA, Bandman E. Analysis of the chicken fast myosin heavy chain family. Localization of isoform-specific antibody epitopes and regions of divergence. *J Mol Biol* 1992;225:1143–51.
- Murakami N, Mehta P, Elzinga M. Studies on the distribution of cellular myosin with antibodies to isoform-specific synthetic peptides. *FEBS* 1991;278:23–5.
- Ostrosky L, Correa D, Faradj R, García H, Flisser A. *Taenia solium*: inhibition of spontaneous evagination of cysticerci by the host inflammatory capsule. *Int J Parasitol* 1991;21:603–4.
- Perry SV. Myosin adenosinetriphosphatase. *Methods Enzymol* 1955;2:582–8.
- Pette D, Staron R. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* 2000;50:500–9.
- Picard B, Barboiron C, Duris MP, Gagnière H, Jurie C, Geay Y. Electrophoretic separation of bovine muscle myosin heavy chain isoforms. *Meat Sci* 1999;53:1–7.
- Pinder JC, Sleep JA, Bennett PM, Gratzer WB. Concentrated tris solutions for the preparation, depolymerization and assay of actin: application to erythroid actin. *Anal Biochem* 1995;225:291–5.
- Pinder JC, Fowier RE, Dziuzewski AR, Bannister LH, Lavin FM, Mitchell GH, et al. Actomyosin motor in the merozoite of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: implications for red cell invasion. *J Cell Sci* 1998;111:1831–9.
- Retamal CA, Thiebaut P, Alves EW. Protein purification from polyacrylamide gels by sonication extraction. *Anal Biochem* 1999;268:15–20.

- Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* 1996; 76(2):371–423.
- Sellers JR. Introduction. Functional properties of myosin, Myosins. Protein profile. New York: Oxford University Press; 1999. p. 31–35, 57–68.
- Sellers JR. Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta* 2000;1496:3–22.
- Szent-Györgyi A, Cohen C, Kendrick-Jones J. Paramyosin and the filaments of molluscan catch muscles. II Native filaments: isolation and characterization. *J Mol Biol* 1971;56:239–58.
- Talmadge RJ, Roy RR. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J Appl Physiol* 1993;75: 2337–41.
- Tashiro Y, Kumon A, Yasuda S, Murakami N, Matsumura S. Two chymotrypsin-susceptible sites of myosin rod from chicken gizzard. *Eur J Biochem* 1985;148:521–8.
- Trybus KM. Biochemical studies of myosin. *Methods* 2000;22: 327–335.
- Winkelman DA, Lowey S, Press JL. Monoclonal antibodies localize changes on myosin heavy chain isozymes during avian myogenesis. *Cell* 1983;34:295–306.

gonzalez_laura@harvard.edu