



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

Facultad de Medicina

CARACTERIZACIÓN INMUNOQUÍMICA DE TUBULINA ALFA

EN CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps* CEPA ORF

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

Q.F.B. CRISTINA PAREDES SALOMON

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNANDEZ

MEXICO, D.F.

NOVIEMBRE 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la
Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos

A los miembros del Comité Tutorial Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández, Dra. Gloria A. Benítez-King, Dra. Lilian Yépez Mulia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con Número de registro 189741.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por la beca otorgada.

Al Programa de Apoyos a los Estudios de Posgrado convocatoria 2006.

Al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México siendo parte del programa de estudios de Posgrado en Ciencias Biológicas en donde se realizó la presente tesis.

Clave de proyectos que financiaron la tesis

PAPIIT-UNAM [1N20003, IN216107]

CONACYT [V43629-M]

Agradecimientos

A la Biol. Olivia Reynoso-Ducoing por el apoyo técnico y científico durante la realización de esta tesis y la corrección de estilo.

Al Dr. Javier Ambrosio Hernández por la dirección, consejos y experiencia transmitida durante la realización de esta tesis.

A los miembros del jurado Dra. Gloria Benítez-King, Dr. Javier R. Ambrosio Hernández, Dra. Lilian Yépez Mulia, Dra. Ana María Cevallos Gaos, Dra. Teresa Fortoul y Van Der Goes por sus recomendaciones sobre este trabajo.

Agradecimientos

A la mamá y al papá, WOW sin ustedes no hubiera llegado hasta aquí. Son un increíble ejemplo a seguir. Los quiero muchísimo y en cada momento de mi vida, siempre están presentes. Mil gracias por el apoyo que me han brindado y porque sé que van a seguir apoyándome en los demás pasos que faltan por seguir.

Mostros, muchas grax por el apoyo que me han dado, los jalones de orejas, los gritos, las peleas, los abrazos y por estar en mi vida. Dicen que los hermanos no se escogen, son los que nos deben de tocar, pero estoy segura que me tocaron los que eran perfectos para mí!. Son con los que iba a crecer y aprender muchas cosas. Los quiero mucho.

Oli: por ser tan paciente, enseñarme todo lo que sabías y por esforzarte de convertirme en mejor científico y porque me diste la oportunidad de como se debe de realizar el trabajo en un laboratorio y como ser un buen científico.

Lau por las porras y la ayuda para terminar. Por lo “divertido” que fue Rio... ¿a ver cuando volvemos?. Muchas gracias, ha sido muy divertido compartirlo contigo.

A mis amigos, que se cruzaron en el camino, ya sea por error, ¿gusto?, o infortunio de la vida. Los quiero taanto!!!

A mis amigos del lab May, Carlos, Liliana, Lau, Mony,y Yamile por hacer del lab un lugar maravilloso y divertido, difícil de olvidar y un lugar que añoro.

Mo, muchas gracias por el apoyo, revisión, tiempo, por las cosas que hemos compartido y las que faltan ¡3737! 830266!!!.

Índice

Resumen	1
I. Introducción	3
1. El citoesqueleto.....	3
1.1 Generalidades y dinámica.....	3
1.2 Variabilidad en la expresión de proteínas.....	4
1.3 Microtúbulos y tubulina.....	5
1.3.1 Genes y evolución.....	6
1.3.2 Expresión de las proteínas.....	7
2. Proteínas del citoesqueleto en ténidos.....	11
3. Infecciones parasitarias producidas por ténidos	12
3.1 Enfermedades producidas por <i>T. solium</i> y tratamiento.....	12
3.2 Modelo de cisticercosis murina producida por <i>T. crassiceps</i> y el desarrollo de fármacos cestocidas.....	13
3.4 Tubulina como blanco de fármacos antihelmínticos.....	13
II. Hipótesis.....	16
2. Hipótesis.....	16
2. Objetivos.....	16
2.1 Objetivo general	16
2.2. Objetivos particulares.....	16
III. Objetivos.....	17
3. Objetivos.....	17
3.1 Objetivo general	17
3.2. Objetivos particulares.....	17
IV. Materiales y Métodos	18
4.2. Obtención de parásitos	18
4.4. Separación electroforética en una dimensión de las fracciones enriquecidas con tubulina y proteínas asociadas.....	19
4.5. Separación electroforética por isoelectroenfoco y doble dimensión.....	20
4.6. Inmunodetección de la tubulina alfa.....	20
V. Resultados	21
5.1 Obtención de cisticercos y extracción de tubulina.....	21
5.2. Separación del enriquecido de tubulina.....	21
VI. Discusión de Resultados.....	27
VII. Conclusiones.....	37
VIII. Perspectivas.....	38
IX. Referencias	39

X. Apéndices	48
Apéndice 1 Soluciones utilizadas.....	48
Apéndice 2. Cuantificación de proteínas.....	49
Apéndice 3. Electroforesis en una dimensión en gel de poliacrilamida.....	50
Apéndice 4. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida por Azul de Coomassie R-350.	51
Apéndice 5. Isoelectroenfoque.....	52
Apéndice 6. Electroforesis en doble dimensión en gel de poliacrilamida.	54
Apéndice 7 Electrotransferencia e inmunquímica.	56
Apéndice 8 Captura, registro y análisis de imágenes.	58

Índice de Tablas y Figuras

Figura 1	08
Figura 2	22
Figura 3	23
Figura 4	24
Figura 5	25
Figura 6	25
Tabla 1	26

Abreviaturas

°C	Grados centígrados
aa	Aminoácidos
DAB	3,3 – Diaminobenzidina.
DTT	Ditiotreitol
	Sal disódica del ácido etilendiamino
EDTA	tetracético.
g	Gramos
GTP	Guanosín trifosfato
IEE	Isoelectroenfoque
IET	Inmunolectrotransferencia.
kDa	Kilodaltones
kg	Kilogramos
m	Metro (s)
M	Molar
MAP	Proteínas asociadas a microtúbulos
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetro (s)
mM	Milimolar
MT	Microtúbulos
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
PM	Peso molecular
PVDF	Polivinil difluoruro
SSAF	Solución salina amortiguadora de fosfatos.
TA	Temperatura ambiente.
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
µm	Micrómetro

Resumen

La tubulina es el componente de los microtúbulos, se encuentra en todos los organismos eucariontes. La evolución de la tubulina, es dirigida de acuerdo a la función de los microtúbulos, por esto existen diferentes isoformas alfa, beta, gama, delta, epsilon y zeta, cada una con una función y localización específica. Están codificadas por pequeñas familias de genes relacionados. Tubulina alfa está más conservada. Las isoformas de tubulina confieren funciones específicas a las células y funcionalmente son intercambiables. Tal diversidad es conferida por modificaciones postraduccionales como acetilación, poliglicilación, tirosinación y fosforilación y se llevan a cabo en el extremo carboxilo-terminal de las proteínas. Por otro lado, las beta-tubulinas son blanco de fármacos como los derivados de los bencimidazoles porque se bloquea la polimerización de los microtúbulos y ello produce pérdida de la homeostasis celular. Hasta los estudios presentes no se había llevado a cabo caracterización alguna de estas proteínas en *Taenia crassiceps* cepa ORF..

Por lo que el objetivo del trabajo fue determinar el número de isoformas de tubulina alfa en cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF. Para ello se obtuvo una fracción rica en tubulina, por el método de polimerización - despolimerización, y se evaluó por medio de electroforesis en 1 y 2 dimensiones (Isoelectroenfoque y SDS-Page) en tiras de gradiente inmovilizado de pH (IPG strips, Amersham Biosciences) de 3-10 NL y 4-7, posteriormente se realizó la inmunoelectrotransferencia en membrana de PVDF y se reveló con anticuerpo monoclonal comercial anti- tubulina alfa.

Los resultados demuestran la presencia de 15 isoformas de tubulina alfa con un rango de pI de 4.84 a 6.69, con PM de 53 kDa.

El número puede ser debido a las modificaciones postraduccionales, lo cual es semejante a lo reportado en cerebro de mamífero en el que se reportan 20 puntos por IEF. Es posible que el número de isoformas que han sido encontradas para *T. crassiceps* esté relacionado con la adaptación de estos parásitos en su hospedero, así como con sus continuas divisiones requeridas para la gemación que realizan.

Summary

Tubulin is the principal component of microtubules and it is found in all eukaryotic organisms. The evolution of tubulin is possible in accordance of the microtubules function, for this reason it could exist different isoforms as alpha, beta, gamma, delta, epsilon and zeta. Each of these has a specific function and location. These isoforms are encoded by small families of related genes. Tubulin isoforms confer specific functions to cells and also are functionally interchangeable.

Such diversity is conferred by covalent modifications as acetylation, polyglycylation, tyrosination and phosphorylation. These modifications are carried out in the carboxyl-terminal of proteins. The beta tubulin is target of drugs such as members of the benzimidazole compounds, the reason is because it blocks the polymerization of the microtubules and this leads to loss of cellular homeostasis. Until the present study, it was not conducted any characterization of this protein in *Taenia crassiceps* strain ORF.

The purpose of the study was to determine the number of isoforms of alpha tubulin in cysticerci of *T. crassiceps* strain ORF. It was obtain a rich sample of tubulin, by the polymerization and depolymerization method, and it was assessed by electrophoresis on first and second dimensions (Isoelectrofocusing and SDS-PAGE) in strips of Immobilized pH Gradient (IPG strips, Amersham Biosciences) of 3-10 non-linear and 4-7 linear, then was held in the inmunoelctro transfer to PVDF membrane and it was revealed with anti alpha tubulin commercial monoclonal antibody.

The results demonstrate the presence of 15 alpha tubulin isoforms with a range of pI of 4.84 to 6.69, with PM of 53 kDa. The number of isoforms may be due to covalent modifications, it's similar as reported in the mammalian brain with 20 spots by IEF. It is possible that the numbers of isoforms have been found for *T. crassiceps* cysticerci's are related with the adaptation of these parasites in their host and its continuing divisions required during budding that these parasites perform.

I. Introducción

1. El citoesqueleto.

1.1 Generalidades y dinámica.

Dentro de la organización celular, el citoesqueleto es una entidad compleja, extensa y con un gran dinamismo, el cual es dependiente de las condiciones en las que se encuentren las células que lo conforman. Sus funciones principales son: el mantenimiento de la organización interna celular como la distribución de los organelos, brindar las condiciones necesarias para que las células sostengan sus formas y tamaños, mantener la exactitud requerida para la dinámica del tráfico intracelular y sostener el movimiento y mantenimiento de la integridad celular requerida para la estructuración de los tejidos formados [1, 2].

La constitución del citoesqueleto se basa en la continua asociación e interacción de diferentes tipos de proteínas, las cuales pueden ser o no filamentosas y, debido a que las proteínas muestran una perfecta coordinación en sus ensamblajes o desensamblajes, ello permite que se lleven a cabo tanto las acciones como las funciones complejas que el citoesqueleto requiere. La adaptación del citoesqueleto a los ambientes externos o internos se debe a la continua estructuración e integración de sus constituyentes, en donde los cambios pueden llegar a ocasionar alteraciones transitorias o permanentes [1].

Los principales componentes del citoesqueleto como los filamentos delgados de actina, los filamentos intermedios y los microtúbulos son de naturaleza tanto globular como filamentosos. Cuando estas proteínas se estructuran en su forma filamentosos, para producir la dinámica requerida, las subunidades monoméricas que las componen se unen unas con otras de forma precisa y ordenada. El continuo ensamblaje o desensamblaje de los monómeros es un proceso dependiente de energía; la actina filamentosos (también conocida como actina polimerizada o actina F) se forma por la adición de monómeros de actina globular o actina G en un proceso dependiente de energía producida por el ATP, mientras que en la interacción de monómeros de tubulina alfa y beta se favorece en presencia del GTP. A diferencia de los

polímeros de actina y tubulina, los filamentos intermedios requieren que las subunidades que los componen se integren en función de regulaciones por fosforilación de las subunidades que los componen [2]

1.2 Variabilidad en la expresión de proteínas.

Aún cuando las proteínas del citoesqueleto son ubicuas en todas las especies y presentan características semejantes, existen diferencias importantes entre todas ellas y que dependen del desarrollo celular, del crecimiento tisular, del tipo de organelos o tejidos en los que se encuentren y del efecto que sufran por la acción de sustancias químicas o compuestos farmacéuticos. Esto hace necesario que se requieran de proteínas con funciones semejantes y específicas de acuerdo a las necesidades que quieran cubrir [1, 2].

Las proteínas del citoesqueleto están codificadas en el genoma de los organismos por familias multigénicas de gran complejidad y cuando se expresan, lo hacen con una gran variabilidad. Sumado a las diferencias con las que se expresan las proteínas como resultado de las codificaciones de los genes, existe la variación de su expresión inducida por fenómenos como modificaciones de tipo postranduccional tales como acetilaciones, arginilizaciones, detirosinaciones, fosforilaciones y poliglutamilaciones [3-5]. Este tipo de modificaciones son la base de la producción de las isoformas, en las que este tipo de proteínas producen acciones similares a diferentes velocidades, bajo el empleo del mismo sustrato, y que generan productos idénticos como lo que se ha establecido para el caso de la actina [4]. Ejemplos de la variabilidad con la que se expresan las proteínas están representados por la miosina, un motor biológico de la actina, la actina misma y la tubulina.

La miosina es el motor biológico mas estudiado; mediante análisis filogenético, basado en la comparación de las secuencia de aminoácidos de su dominio motor, se le han encontrado hasta 18 clases. Las células de mamíferos pueden llegar a tener hasta 28 genes que son capaces de codificar a 9 clases distintas de miosina como I, II, III, V, VI, VII, IX, X y XV [3].

La actina se presenta con varias isoformas catalogadas con base a su secuencia de aminoácidos y su expresión específica tisular. Se pueden

encontrar actinas musculares alfa con cuatro isoformas; dos en músculo estriado (tanto esquelético como cardíaco) y dos en el músculo liso (tanto entérico como vascular). Actinas no musculares o actinas del citoplasma presentes en todas las células, las cuales se expresan con dos isoformas distintas como la beta y la gama [4].

La tubulina es también otra de las proteínas del citoesqueleto que se expresa con una gran variabilidad de isoformas como se describe mas adelante.

1.3 Microtúbulos y tubulina.

Los microtúbulos (MT) son polímeros de tubulina y constituyen los elementos poliméricos del citoesqueleto de mayor tamaño, su diámetro aproximado es de 25 nm, son tubos huecos cuyas paredes están constituidas por la asociación aproximada de 13 protofilamentos (Figura 1), aunque este número varía dependiendo de la especie en la cual se encuentren presentes. Cada protofilamento está constituido como un polímero largo en el que se alternan las subunidades de tubulina alfa y beta (Figura 1A) las cuales se arreglan de tal manera que forman una malla [1]. La forma en que se alterna la asociación de las tubulina alfa y beta determina que los MT tengan una polaridad; el extremo de mayor dinámica (en donde se encuentran asociando continuamente las tubulinas y termina en una tubulina beta) se denomina el extremo más, mientras que el de menor dinámica (de donde se dio origen a los MT e inicia con una tubulina alfa) se denomina el extremo menos. La polaridad se presenta a lo largo de los MT y no es solo dependiente de los extremos indicados. Ello brinda las condiciones para que los motores biológicos específicos de estas proteínas polimerizadas; las cinecinas (que se dirigen hacia el extremos mas o en dirección anterógrada) y las dineínas (que se dirigen hacia el extremo menos o en dirección retrógrada) lleven su carga de organelos o vesículas de un extremo a otro de la célula [1].

La estructura tridimensional de los MT se determinó por medio de difracción de Rayos X de cristales obtenidos de las proteínas bajo una resolución de 18 Å, mientras que por medio de microscopía electrónica de transmisión se determinó la estructura de la tubulina con una resolución de 3.7

Å (Figura 1B). Los resultados de estos análisis muestran que los MT están formados por protofilamentos, tienen un centro hueco y están formados por subunidades; en el caso de la tubulina, por cristalografía, se encontró que cada uno de los monómeros tiene dominios específicos y que la asociación de ellos dá origen a otro [6, 7] . Cuando se forma el dímero existen 3 dominios funcionales: en el dominio amino terminal se encuentra el sitio de unión de GTP, en el dominio intermedio está localizado el sitio de unión a taxol (únicamente expresado en tubulina beta) y en el extremo carboxilo terminal se presenta la región de unión tanto de proteínas asociadas a microtúbulos (MAP's) como de las proteínas motoras [8]. Según la cristalografía, los monómeros contienen en su interior estructuras de alfa hélice y beta plegada que permiten la conformación de los monómeros, su interacción y la formación de los dominios mencionados. La asociación de todos los monómeros permite que los polímeros de tubulina se estabilicen y produzcan las conformaciones típicas de los protofilamentos y su asociación para la formación de los MT.

Las tubulinas son ejemplo de ser GTPasas por la habilidad que tienen para hidrolizar al GTP y dar origen al GDP. En el caso de la tubulina, el GTP se une a la subunidad de la tubulina beta (en un dímero libre) y sufre el intercambio de su estado libre de GTP a GDP, mientras que ello no sucede si llega a unirse a la tubulina alfa [1].

1.3.1 Genes y evolución.

La familia génica de tubulinas consiste de seis subfamilias distintas pero altamente conservadas: la de tubulinas alfa, beta y gama. De estas, las tubulinas alfa y la beta son las más abundantes en los eucariontes y son las que más se han estudiado. La tubulina gama se encuentra en centriolos. Hay tres familias adicionales que han sido menos estudiadas: las tubulinas delta encontradas en *Caenorhabditis elegans*, las tubulinas epsilon encontradas en *Saccharomyces cerevisiae* y las tubulinas zeta encontradas en *Trypanosoma cruzi* [9, 10].

Se ha encontrado que la mayor parte de las secuencias de aminoácidos inferidos de los genes de tubulina están conservadas en las proteínas y que son importantes para definir la función de las proteínas; por ejemplo, el sitio de

unión del GTP se ha localizado entre los residuos de las posiciones 70-73 y corresponden a las secuencias LEPG en tubulina beta y a LEPT en la tubulina alfa. En tubulina alfa hay una lisina en la posición 40 que puede ser acetilable. Sin embargo, estos sitios pueden variar en función de las especies en las que se estudien [9]. La homología a nivel de aminoácidos entre las dos cadenas alfa y beta es de 36-42%. Tanto la tubulina alfa como la beta surgen de la duplicación de un gen ancestral, cada ortólogo de tubulina es único en los eucariontes, aunque parece ser que la familia completa de las tubulinas tiene un ancestro procarionte que se ubicó al mismo tiempo que la proteína FtsZ, el cual es un componente del sistema de citocinesis de las eubacterias. Según lo estudiado al momento la proteína FtsZ tiene una estructura semejante al ser compuesta de protofilamentos. Aunque éstos están formados de monómeros y no de dímeros [11-13]. Se desconoce el momento en que se llevó al cabo la triplicación de los genes con lo que se produjeron los diferentes parálogos.

Se ha establecido que existen múltiples isotipos o variantes de genes de tubulina alfa y beta entre los eucariontes, las plantas, los hongos y los protistas. Las variaciones entre los isotipos de tubulinas en un mismo organismo pueden deberse a cambios puntuales de posición. Para los mamíferos parece existir 6 isoformas de tubulina alfa y 7 de beta [14], en helmintos como los adultos de *Fasciola hepática* se ha establecido que hay por lo menos 5 isotipos de tubulina alfa y 6 de tubulina beta, los cuales parecen los mismos en número de los encontrados en otro tremátodo estudiado como es el *Schistosoma mansoni* [15]. En el céstodo, *Echinococcus multilocularis*, se ha establecido que hay tres genes de tubulina beta, los cuales se expresan de forma diferencial dependiente del estadio parasitario [16].

1.3.2 Expresión de las proteínas.

Debido a la diversidad de papeles biológicos que desempeñan los MT, su distribución intracelular es amplia. Se les encuentra expresados como proteínas en citoplasma, axones, husos acromáticos, cilios, flagelos de diferentes tipos celulares. La importancia de los MT en el dinamismo del citoesqueleto es porque se estructuran para formar los rieles sobre los que se desplazan los organelos y las vesículas durante el

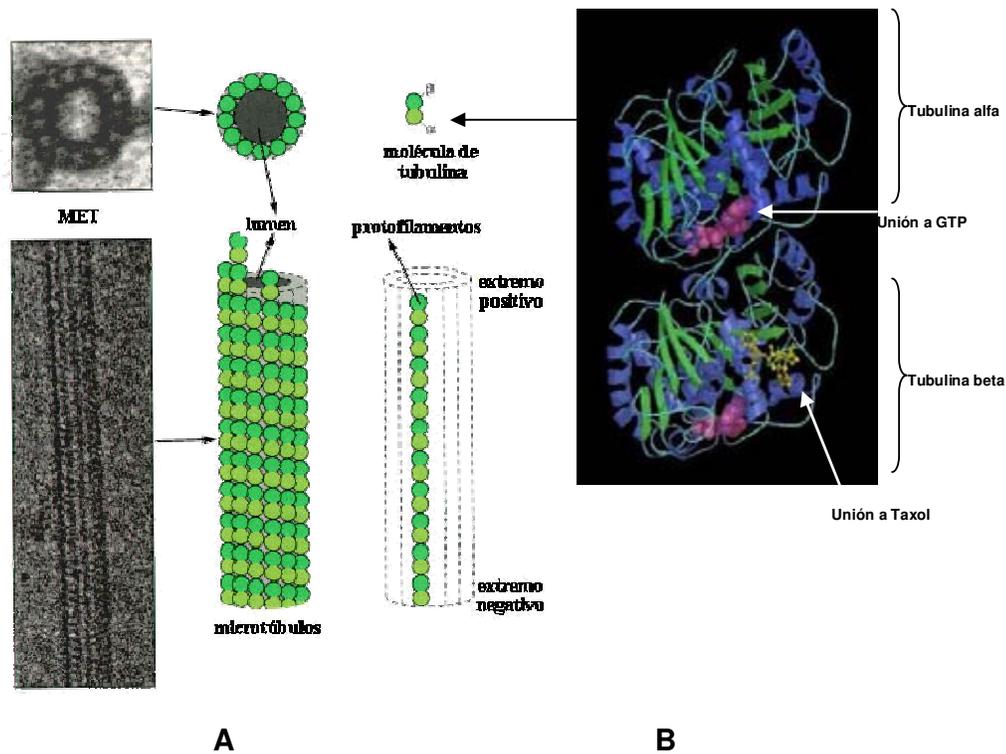


Figura 1. Microtúbulos y tubulina. A. Microtúbulos vistos al microscopio electrónico de transmisión tanto en su forma alargada como en un corte transversal. Se muestran diagramas de la disposición de los protofilamentos y las tubulinas alfa y beta. B. Diagrama de estructura del dímero de tubulina generada del análisis cristalográfico de la proteína, en donde se indican los dominios de unión a GTP y a taxol. Tomada de Beese et al. 1987 [6, 7].

tráfico vesicular o los cromosomas durante la división celular. Su constitución favorece que las células ciliadas o flageladas tengan movimientos que les permita su desplazamiento de un lugar a otro ó que impulsen o muevan los fluidos a través de la superficie celular [17].

No todos los genes se expresan como proteínas en los tejidos, se estima que del total de genes, sólo se expresan 2 o 3, mientras que las secuencias restantes son pseudogenes. Cuando se expresan los genes como proteínas tienen una gran variabilidad que determina su función. Dicha función depende de las condiciones en que se les induce su expresión. A nivel de la composición de aminoácidos, las isoformas tienen una gran semejanza lo que determina su actividad biológica similar. La expresión diferencial depende de factores como el desarrollo celular y tisular, el tipo de organelo o tejido en el que se encuentren y el contacto con sustancias químicas o fármacos. En virtud de que las isoformas tienen distintas propiedades de utilización de sustratos

idénticos, llegan a tener diferentes velocidades de transformación de productos y son susceptibles de ser evaluadas mediante diversas estrategias experimentales tanto de tipo bioquímico como inmunoquímico [18-20]. Debido a que las variaciones en su composición de aminoácidos están definidas (en muchas de las ocasiones sólo son de uno o varios aminoácidos) ello puede ser empleado estratégicamente para hacer la preparación de anticuerpos específicos en contra de esas regiones [19].

La variabilidad en la expresión de proteínas en el citoesqueleto es una muestra de la plasticidad con que opera esta estructura celular. La conservación y las variaciones continuas en la expresión entre las especies son garantía de las células puedan obtener los requerimientos necesarios. Por lo anterior, queda de manifiesto que es importante conocer mejor a las proteínas, llevar a cabo una adecuada caracterización molecular de ellas y determinar su variabilidad de expresión de acuerdo al ambiente en el cual se desempeñan.

No hay cambios extensos en la composición de los aminoácidos en las secuencias de las isoformas. Por ejemplo, para las actinas las modificaciones se dan entre uno o dos aminoácidos localizados en el interior de los primeros diez aminoácidos que componen su región amino terminal [21]. Cuando se realizan modificaciones postransduccionales, se incluye la adición de algunos grupos específicos con lo que se producen cambios en las propiedades de las proteínas. Esto ocurre con la arginilización (un proceso en el que se adicionan residuos de arginina) de isoformas de actina, en las que los organismos que lo sufren dejan de tener movimiento de las células [20].

Las isoformas se pueden evaluar mediante estrategias de identificación, aislamiento, secuenciación y determinación de su comportamiento. Para determinar el número de isoformas que se encuentran expresando en los organismos bajo diferentes circunstancias y de reciente introducción en el estudio del citoesqueleto, es el empleo del análisis proteómico. A través de este sistema existe la posibilidad de estimar el número de isoformas que se encuentran expresando en un momento determinado y la influencia en la expresión en ciertas condiciones de estudio y momentos de la vida celular. Por ejemplo los estudios que se han hecho para actinas de *Taenia solium* [22]. Se ha demostrado que la expresión de isoformas de proteínas del citoesqueleto como la actina y la miosina es dependiente del tejido en estudio y del desarrollo

de los organismos; por ejemplo la expresión diferencial de isoformas de miosina es dependiente de las necesidades de contracción muscular y se refleja en diferentes propiedades bioquímicas de las proteínas [23], también como se ha demostrado en *T. solium* [24] y *T. crassiceps*[25].

En el caso de tubulina la variabilidad en la expresión de sus isoformas es más amplia debido a los fenómenos de modificación postransduccional. Lo que ha estudiado entre los genes de las tubulinas alfa y beta es que hay un número amplio de isotipos que son motivo de que se produzcan amplias variedades de isoformas de proteínas [14, 17, 26].

Las tubulinas cuando se expresan como proteínas son globulares que se componen de varios polipéptidos. Pueden ser de distintas subclases correspondientes a las alfa, beta, gama, delta, epsilon y zeta como ya se había indicado. Cuando interaccionan los monómeros de tubulina alfa y beta para formar los heterodímeros la unión es de tipo no-covalente. Los heterodímeros son la unidad funcional que induce al autoensamblaje para formar a los MT, lo cual es un proceso dependiente de la temperatura (a 37°C los MT se polimerizan, mientras que a 4°C se despolimerizan). Cada monómero tiene un peso molecular de 50-55 kDa y en su secuencia primaria de aminoácidos se encuentra que tienen aproximadamente 450 aa [27, 28]. Estudios recientes de las tubulinas gama, delta y epsilon han mostrado que estas proteínas están relacionadas con el huso mitótico y son de localización al nivel de centrosomas [29-33].

Las proteínas asociadas a microtúbulos (MAP) tienen como función darle estabilidad. Son 22 proteínas. Su papel biológico es interactuar con los MT para regular o promover la polimerización de tubulina y cuando se aísla a los MT o la tubulina ellas copurifican cuando se efectúan ciclos de polimerización y despolimerización [34]. La acción de las MAP's es compleja porque tienen múltiples dominios de unión con microtúbulos, a esto se debe el entrecruzamiento entre los filamentos.

2. Proteínas del citoesqueleto en ténidos.

En ténidos se han realizado pocos estudios relacionados con las proteínas del citoesqueleto y se han enfocado básicamente a la caracterización de

proteínas musculares. Se ha estudiado tanto a la actina como a la miosina muscular de diferentes estadios parasitarios de *T. solium* [22, 24, 25], así como a la paramiosina [35]. En el caso de la actina y la miosina se ha encontrado la expresión diferencial de isoformas. Por ejemplo, la miosina convencional tipo II caracterizada en cisticercos se encontró que tiene varias isoformas dependientes del estadio de desarrollo de los parásitos [25] mientras que para la actina se encontraron 7 isoformas expresadas en los cisticercos [22]. La cantidad de proteína expresada, o la expresión de algunas de ellas, parece ser dependiente del estadio de desarrollo de los parásitos (Reynoso-Ducoing O, comunicación personal).

Ante esta variabilidad en la expresión de algunas de las proteínas del citoesqueleto en *T. solium* mencionadas y sabiendo que existe una cantidad de proteínas relacionadas las cuales se expresan en los organismos eucariontes. Cabe la posibilidad de que para la tubulina se encontraran similitudes en su expresión y por ello tiene que ser estudiado. En otros parásitos como los helmintos, se sabe que la variabilidad es tan precisa en las tubulinas beta que los hace blancos específicos de fármacos antihelmínticos. Esta variación puede producir el desarrollo de la resistencia a fármacos antihelmínticos como en el caso del bencimidazol. La explicación de porque se genera resistencia ante un fármaco podría ser uno de los ejemplos mas claros de inducción de expresión diferencial de las tubulinas ante la presencia continua de un sustancia hacia la cual se modifica el sitio blanco [36]. Se han realizado estudios relacionados con la caracterización de tubulina alfa en cisticercos de *T. solium* y de *T. crassiceps*[37, 38]. El motivo de la caracterización de esta proteína se debe a que se cuenta con una gama de anticuerpos comerciales anti- tubulina alfa que han mostrado ser reactivos en contra de esta proteína en los parásitos. Esto ha permitido la caracterización de ella desde diferentes enfoques relacionados con su distribución celular, su análisis proteómico y la evaluación del efecto de sustancias derivados de los bencimidazoles.

En cisticercos de *T. solium* se ha encontrado que la tubulina alfa está al nivel del tegumento de la pared vesicular, así como en células flama localizadas en el parénquima tisular de los gusanos invaginados. La tubulina alfa no co-localiza con la red de filamentos de actina polimerizada, ni con la miosina tipo II distribuida en las fibras musculares de los cisticercos. Se ha

observado su expresión en los penachos ciliares de las células flama. Esto parece indicar que el papel de la tubulina en estos sitios es para favorecer los movimientos de fluidos que deben realizar estas células para la eliminación hacia los ductos protonefridiales en un fenómeno de eliminación de lo que ya no necesitan [37]. El efecto de derivados de los bencimidazoles ocasiona la alteración del penacho ciliar de las células flama y la alteración en la función de estas células, lo cual ocasiona la muerte de los parásitos [38, 39].

3. Infecciones parasitarias producidas por ténidos

3.1 Enfermedades producidas por *T. solium* y tratamiento.

La cisticercosis y teniosis son enfermedades parasitarias causadas por el cestodo *T. solium*. Afectan a seres humanos, es en especial la cisticercosis un problema de salud pública en México y otros países del mundo que padecen de estas enfermedades. La cisticercosis también es un problema sanitario porque afecta al cerdo. Como es una zoonosis su presencia es más importante porque afecta el sistema nervioso central (neurocisticercosis) de los seres humanos infectados al ingerir alimentos contaminados. Al ser humano le produce enfermedades incapacitantes, costosas y complejas para su tratamiento médico [40]. En ambos tipos de enfermedades parasitarias, los fármacos cestocidas de elección son el albendazol un derivado del bencimidazol y el prazicuantel una quinolina.

El tratamiento quimioterapéutico de elección para la neurocisticercosis es el albendazol [41] y su uso se ha recomendado por ser una mejores maneras de controlar de forma inmediata y a menor costo este tipo de enfermedad. Por la importancia clínica de la teniosis y cisticercosis producidas por *T. solium*, se han llevado a cabo diversos estudios relacionados con el conocimiento del ciclo de vida de estos parásitos, la epidemiología de las enfermedades, las formas de transmisión, las medidas de intervención y se han establecido como posibles formas de control de las parasitosis el futuro empleo de métodos de vacunación [42]. Sin embargo, a pesar de los estudios poco es lo que se ha hecho en relación a la biología celular y la fisiología de los parásitos y mucho menos en lo que se refiere al estudio del citoesqueleto.

Los estudios que se han realizado han sido pocos debido a que es difícil

contar con los parásitos bajo condiciones semejantes y en cantidad suficiente para efectuar los análisis. Por esta causa se han utilizado modelos experimentales como el de la cisticercosis murina producida con *T. crassiceps* de la cepa ORF.

3.2 Modelo de cisticercosis murina producida por *T. crassiceps* y el desarrollo de fármacos cestocidas.

Los cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF son parásitos fáciles de obtener en el laboratorio, se reproducen asexualmente por gemación, sólo se mantienen en el estadio de cisticerco porque no tienen escólex invaginado y se recuperan en grandes cantidades de la cavidad peritoneal de ratones [43]. Los parásitos miden entre 3 y 5 mm, son translúcidos y pueden ser mantenidos en cultivo *in vitro* durante el tiempo suficiente para evaluar el efecto de diferentes condiciones a los que sean sometidos los parásitos [44]

Debido a que los cisticercos de *T. crassiceps* y los de *T. solium* comparten características morfológicas con respecto a su pared vesicular y a que las condiciones de cultivo *in vitro* a las que se les ha sometido son simples, se les ha considerado como un modelo útil para la evaluación de la actividad cestocida de diversos compuestos derivados del bencimidazol y praziquantel [39, 44-46], así como para el estudio de diferentes aspectos de su biología celular [25, 47].

3.4 Tubulina como blanco de fármacos antihelmínticos.

La molécula de bencimidazol, como base de muchos antihelmínticos se han utilizado en la terapia farmacológica antiparasitaria desde hace mas de 40 años. El blanco de estos parásitos es la tubulina beta, algunos parásitos han generado resistencia y por ello se han generado otros derivados bencimidazólicos como el mebendazol, febendazol y albendazol [48]. Un derivado del bencimidazol, el triclabendazol, ha mostrado ser específico en el tratamiento de la infecciones parasitarias producidas por *F. hepatica* porque estos parásitos tienen una expresión de tubulinas beta distintas de los otros helmintos [49]. El uso indiscriminado de estos compuestos químicos sobre todo en la medicina veterinaria, ha ocasionado el desarrollo de resistencia a los tratamientos basados los derivados de bencimidazoles [48, 50].

En estudios *in vitro* donde se emplearon cisticercos de *T. crassiceps* para evaluar el efecto de la combinación de los fármacos prazicuantel y albendazol, se encontró que los parásitos sufrían alteraciones severas en su superficie, donde se alteró la estructuración de las microvellosidades y por lo cual se consideró que los parásitos tuvieron alteraciones en su capacidad para tomar nutrientes [39]. Mientras que el prazicuantel produjo una parálisis espástica de los parásitos, lo cual favorece su eliminación y destrucción, los cisticercos tratados con el sulfóxido de albendazol (el principio activo del albendazol) tuvieron alteraciones severas al nivel del tegumento y de los penachos ciliares [44]. En estos sitios se ha demostrado que hay expresión de tubulina alfa [37] y en la que al hallarse presente en el tegumento participa al llevar a cabo el tráfico vesicular para la internalización de proteínas y con esto tener la nutrición de los parásitos ya que carecen de sistema digestivo. Las células flama son importantes para mantener la viabilidad de los parásitos por la motilidad de sus cilios que contienen tubulina. Estos resultados pueden estar relacionados con que el albendazol tiene como proteína blanco a la tubulina beta y cuando se une a esta proteína, inhibe su polimerización y bloquea la formación de microtúbulos lo que inicia una cascada de cambios bioquímicos y fisiológicos que dañan a los parásitos. El sitio de unión de la tubulina beta y el albendazol se estima que está localizada en la región amino terminal y la región intermedia de la proteína en *H. contortus* [51].

Debido a que en el grupo de Investigación del Dr. J. Ambrosio se ha trabajado en la identificación y caracterización de tres diferentes proteínas del citoesqueleto de *T. solium* y *T. crassiceps* con enfoques de tipo bioquímico, inmunoquímico, proteómico y de biología celular; en el presente proyecto de tesis se buscó llevar a cabo estudios relacionados con la caracterización inmunoquímica de tubulina alfa en cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF. La tubulina es una proteína que ha sido estudiada en otros organismos pero hasta este proyecto no se han llevado a cabo estudios en estos parásitos. La importancia de conocer más de los MT y la tubulina en estos parásitos podría favorecer el mejorar el conocimiento de la biología celular de ellos, con lo cual se podrían evitar problemas como el desarrollo de resistencia al uso de fármacos antiparasitarios. Para esto es necesario realizar investigaciones relacionadas con la biología celular, bioquímica y fisiología en la que se

empleen técnicas como la genómica, la proteómica, la ecología, la epidemiología y la genética [36, 51].

II. Hipótesis

2. Hipótesis.

Debido a la expresión diferencial de diversas isoformas de proteínas del citoesqueleto como actina y miosina en cisticercos de *T. solium*, existe la posibilidad de que se encuentren distintas isoformas de tubulina alfa en cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF por ser una de las proteínas del citoesqueleto de mayor conservación entre las especies.

III. Objetivos.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

3.1.1 Determinar la presencia de isoformas de tubulina alfa, mediante inmunodetección, en cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF.

3.2 Objetivos particulares

3.2.1 Obtener un enriquecido de tubulina de cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF.

3.2.2 Efectuar separaciones electroforéticas en una y dos dimensiones del enriquecido de tubulina.

3.2.3 Efectuar la identificación de las isoformas de tubulina alfa mediante su detección inmunoquímica con el anticuerpo monoclonal comercial anti- tubulina alfa TU-02.

IV. Materiales y Métodos

4.1. Modelo experimental de cisticercosis murina.

Ratones de la cepa BALB/c, hembras de 5 semanas de edad, se infectaron por vía intraperitoneal con 30 cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF recuperados de la cavidad peritoneal de otros ratones previamente infectados bajo el mismo esquema.

4.2. Obtención de parásitos.

Después de 3 a 4 meses de infección, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y los parásitos se recuperaron de la cavidad peritoneal. Se lavaron con SSAF con la finalidad de eliminar los restos de tejidos del huésped. Se realizó la selección de los parásitos con base a su tamaño para tenerlos homogéneos para los estudios. Finalmente, los parásitos se fraccionaron en lotes y se guardaron en congelación a -20°C hasta su utilización.

4.3 Obtención de fracciones enriquecidas de tubulina y proteínas asociadas a los microtúbulos.

Se probó la técnica descrita por Lubega *et al.* en 2002 [52] esta técnica esta basada en ciclos de polimerización y despolimerización, se utiliza taxol como agente estabilizante de los microtúbulos formados. Para realizar los análisis posteriores se decidió utilizar la técnica descrita por Shelanski *et al* en 1973 [34] con la finalidad de obtener un enriquecido de tubulina mediante ciclos de polimerización y despolimerización. Los parásitos seleccionados se lavaron con una solución amortiguadora PEM (Solución amortiguadora PIPES 100 mM pH 6.6, MgCl₂ 1 mM, EGTA 1 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM, GTP 0.1M) combinada con una mezcla comercial de inhibidores de proteasas libre de EDTA (1 tableta/10 mL, Complete, Roche), así como de DTT 1.0 mM y GTP 0.1 mM a 4 °C. Los parásitos se homogenizaron con un homogenizador Pro modelo 200 bajo condiciones definidas (pulsos de 30 seg, 30 segundos de reposo, 4°C) y el homogenizado obtenido se centrifugó a 28,000 *g* durante 60 min a 2°C. Los sobrenadantes se colectaron a 4°C y se les agregó un volumen equivalente de la solución PEM, a esta solución se le agregó una cantidad

suficiente de GTP y DTT con la finalidad de obtener una concentración final de 1mM de ambas sustancias. El sobrenadante tratado se incubó durante 20-25 min en un baño maría a 37°C. Finalizado el tiempo de incubación, se adicionó una solución al 15% de sacarosa en un volumen equivalente al 10% del volumen total de los sobrenadantes. Se centrifugó a 100,000 g por 30 min a 37°C y los botones resultantes se colectaron y resuspendieron en la solución PEM fría complementada con DTT y GTP como ya se indicó anteriormente (apéndice 1). Las suspensiones se incubaron a 4°C por 30 min y se centrifugaron a 100,000 g por 30 min a 2°C, se recuperó el sobrenadante y se incubó durante 30 min en baño maría a 37°C. Se adicionó una vez mas, la solución de sacarosa y se centrifugó a 100,000 g por 30 min a 37°C. Se recuperó el botón y se trató con PEM complementado con DTT y GTP. Finalmente, las muestras se fraccionaron en alícuotas y se almacenaron a -70°C hasta su utilización.

4.4. Separación electroforética en una dimensión de las fracciones enriquecidas con tubulina y proteínas asociadas.

Se determinó la concentración de proteínas por un método modificado de Lowry por el Estuche comercial Protein Assay DC (Bio-Rad) (apéndice 2). Posteriormente cantidades de las muestras proteicas con 30 µg de proteína por carril, la cual fue mezclada con un volumen equivalente de Buffer de Laemmli (Bio-Rad). Las muestras se hirvieron por 5 minutos, después las muestras se cargaron en los carriles. Se realizó una separación electroforética en geles de poliacrilamida al 10% bajo condiciones reductoras utilizando β- mercaptoetanol. Las muestras se separaron en geles de poliacrilamida que se corrieron a 50V/30 min. Posteriormente a 80V/90 min. Se utilizaron marcadores de peso molecular comerciales Precision Plus Protein Prestained Standards (Bio-Rad). Al concluir la separación electroforética se recuperaron los geles de las cámaras y se tiñieron con Azul de Coomassie utilizando las tabletas Phast Gel Blue R-350 (Pharmacia) (apéndice 4).

4.5. Separación electroforética por isoelectroenfoque y doble dimensión.

El primer paso consistió en la separación de las proteínas mediante su punto isoeléctrico a través de una separación por isoelectroenfoque. Para ello se utilizaron 2 tiras comerciales de gradiente inmovilizado de pH (Tiras IPG Amersham Biosciences) (apéndice 5) con intervalos no lineales de pH de 3 a 10 y lineal de 4 a 7.

Para la separación de las proteínas por su peso molecular se realizó el la separación en una electroforesis en doble dimensión mediante el empleo de electroforesis convencional en geles de poliacrilamida prehechos comerciales. Se utilizaron 2 diferentes formatos de acuerdo al tamaño de la tira: para tiras de 7 cm los geles verticales Zoom de gradiente de 4-12% (Invitrogen) y para las tiras de 18 cm los geles horizontales Excel Gel SDS en gradiente de 8-18% (Amersham Biosciences). Las condiciones de separación electroforética se describen en el apéndice 8.

4.6. Inmunodetección de la tubulina alfa.

Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF. La detección de tubulina se efectuó con el anticuerpo primario anti- tubulina TU-02 y con el anticuerpo secundario anti- IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (apéndice 7). La unión inespecífica de los anticuerpos se evitó por bloqueo de las membranas de PVDF con BSA y el lavado de las membranas (apéndice 7). En revelado de las proteínas se hizo con DAB y peróxido de hidrógeno como sustratos, mientras que la quimioluminiscencia se hizo con un estuche comercial. Las imágenes obtenidas se registraron y analizaron como se indica en el apéndice 8.

Anticuerpo utilizado

Nombre del anticuerpo	Marca	Isoforma que reconoce	Tipo de anticuerpo	Anticuerpo secundario a usar	Especie en la que se produjo
TU-02	Santa Cruz	Tubulina alfa	Monoclonal	IgG- HPR- raton Santa Cruz IgG-HR	Ratón

V. Resultados

5.1 Obtención de cisticercos y extracción de tubulina.

Los parásitos obtenidos de la cavidad peritoneal tenían un tamaño uniforme de aproximadamente 3 y 4 mm de diámetro, eran translúcidos y presentaban movilidad al ser observados al microscopio de disección. En el caso de las gemas que se encontraron en varios de ellos, éstas se separaron fácilmente al lavar a los parásitos. Luego de su procesamiento, para la extracción de tubulina, se encontró que el homogenizado era una suspensión blanquecina, la cual cambió de tonalidad a un color rosado durante algunas fases de la extracción y ello se asoció a los cambios debidos a la polimerización de la tubulina. A lo largo de pasos de extracción, se logró hacer la cuantificación del contenido de proteína y se corroboró después de la electrotransferencia de las proteínas a membranas de PVDF y su revelado con los anticuerpos anti- tubulina alfa.

5.2. Separación del enriquecido de tubulina.

Se efectuó una extracción la cual es específica para tubulinas como la descrita por Lubega *et al.* en 1993 [53] y que estaba basada en la estabilización de los MT por medio del taxol. También se probó el método descrito por Shelanski *et al.* en 1973 [34].

Según las evaluaciones electroforéticas, como la que se muestra en el gel presentado en la figura 2, para cada uno de los pasos de extracción se presentó un patrón electroforético distinto (Figura 2, carriles 2-10); En el carril 2, correspondiente al extracto inicial, se observó la presencia de una banda de alrededor de los 50 kDa (indicada con un asterisco). En el carril 3 y 4 se observó que hubo desaparición de varias bandas localizadas entre los 37 y 25 kDa y las situadas entre los 75 a 37 kDa se enriquecieron. Después de 17 pasos de procesamiento de las muestras (Figura 2, carril 5), en el intervalo de 75 a los 50 kDa hubo enriquecimiento de varias proteínas situadas en los pesos moleculares de 150, 75, 50 y 40 kDa. En todos los carriles se trabaja con concentraciones semejantes de proteína (30 µg) en los carriles 3 y 4 se observa un ensanchamiento del carril ya que se tuvo que aumentar la cantidad

de volúmen para conseguir la concentración deseada.

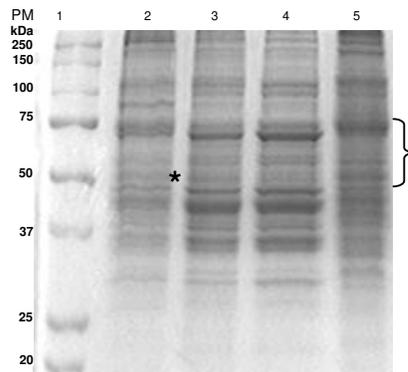


Figura 2. Separación electroforética del enriquecimiento de tubulina en muestras de cisticercos. Después de la homogenización de los tejidos parasitarios en solución amortiguadora de PIPES pH 6.6 se procedió a enriquecer la fracción de tubulina mediante polimerización y despolimerización inducida por alteraciones de la temperatura de procesamiento de muestras. Carriles 2-5 pasos del proceso de enriquecimiento para su separación electroforética (30 µg de proteína/carril). En el carril 1 se muestran los marcadores comerciales de peso molecular. El gel de poliacrilamida se tiñó con azul de Coomassie y la imagen se obtuvo mediante el fotodocumentador UVP y el paquete computacional Labworks.

En la figura 3 se muestra la comparación de la separación electroforética, el proceso de enriquecimiento de la tubulina bajo las dos técnicas de enriquecimiento empleadas: Lubega (Figura 3A, carriles 2 y 3) y Shelanski (Figura 3A, carriles 4 y 5) y el reconocimiento del anticuerpo TU-02 contra tubulina alfa. En ambos casos hay un enriquecimiento de proteínas localizadas al nivel de los 50 kDa (zona indicada en las figuras correspondientes). Con ambas técnicas los extractos iniciales parecen ser semejantes, en el caso de los enriquecimientos es la de Shelanski en donde hay un mayor número de bandas localizadas entre los 37 y 100 kDa y al nivel de los 50 kDa se observa una banda. Esta banda se observa ligeramente bajo la técnica de Lubega.

El análisis del reconocimiento del anticuerpo TU-02 por DAB, mostró que en todos los casos hubo detección de tubulina alfa, en la de Lubega se reconocieron dos bandas localizadas entre los 25 y los 37 kDa, mientras que en el caso de Shelanski hubo a una banda localizada en los 50kDa. Hubo otras bandas reconocidas en las muestras evaluadas, pero la reactividad del anticuerpo fue menor para ellas.

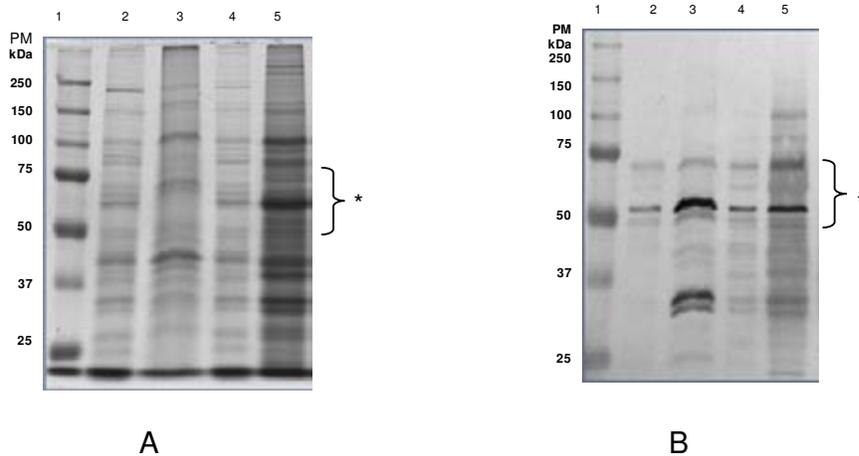


Figura 3. Evaluación electroforética y de inmunoquímica del enriquecimiento de tubulina. Para todos los casos se utilizaron 30 μ g de proteína/carril. Figura A gel teñido con Azul de Coomassie. Figura B. Reactividad de las proteínas después de su transferencia a membrana de PVDF y revelada con el anticuerpo TU-02 en presencia de DAB. En el carril 1 se observan marcadores comerciales de peso molecular. En los carriles 2 y 3 se muestra el tratamiento con la técnica de Lubega y en los carriles 4 y 5 con la técnica de Shelanski. En los carriles 2 y 4 están los extractos iniciales y en los 3 y 5, los enriquecidos.

El revelado del reconocimiento del anticuerpo TU-02 mediante quimioluminiscencia se muestra en la figura 4. A diferencia de lo observado en la figura 3, en lo referente al revelado en presencia de la DAB, se encontró que la reactividad del anticuerpo es intensa hacia la tubulina localizada en aproximadamente los 50 kDa de las muestras de los parásitos, sin embargo para el caso de la muestra inicial hubo reactividad hacia otras bandas localizadas al nivel de los 75 kDa y 30 kDa. En el enriquecido, carril 2, sólo hubo reactividad a una banda de aproximadamente 50 kDa y una ligera reactividad en una banda en 30 kDa. Según las estimaciones del PM basada en los marcadores el peso molecular obtenido es de 53 kDa. En el carril 4 se muestra la reactividad a tubulina contenida en la muestra de testículo de ratón utilizado como control de reacción.

La detección de las posibles isoformas reconocidas por el anticuerpo TU-02, se muestra en la figura 5. Hubo reactividad positiva del anticuerpo TU-02 y revelada por quimioluminiscencia varios puntos situados en los 50kDa. Estos puntos se contaron en total de 11 y se localizaron dentro del intervalo de pH de 5.37 y 6.26 después de haber sido separados en tiras IPG NL de 3-10. Debido a que bajo este sistema de separación

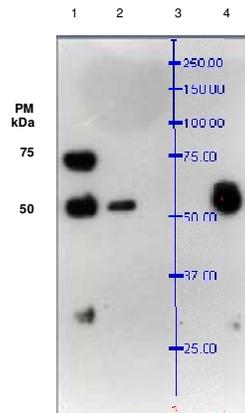


Figura 4. Evaluación inmunoquímica de la tubulina alfa utilizando AcM TU-02. Revelado mediante quimiluminiscencia. Carril 1, extracto inicial. Carril 2, extracto final. Carril 3, marcadores de pesos moleculares. Carril 4, testículo de ratón. 30 μ g de proteína/carril.

no se lograba distinguir la separación de algunos puntos, y dado que ya se sabía en que intervalo de pH estaban siendo detectadas con el AcM TU-02, se intentó su separación en tiras de IPG de 7 cm con un intervalo de pH que abarca los puntos encontrados y que se estimó debía ser de intervalo lineal de 4 a 7. Se encontró que este procedimiento logró la mejor separación de las isoformas de tubulina alfa y se contabilizaron alrededor de 15 que se estimaron con un intervalo de pH entre 4.84 y 6.69 como se muestra en la figura 6.

Todos los ensayos de isoelectroenfoque y separación electroforética en doble dimensión se realizaron al menos 3 réplicas por cada experimento y la estimación del número de isoformas se hizo en todos los experimentos. Las figuras presentadas corresponden a geles y membranas de PVDF seleccionadas de todos los experimentos.

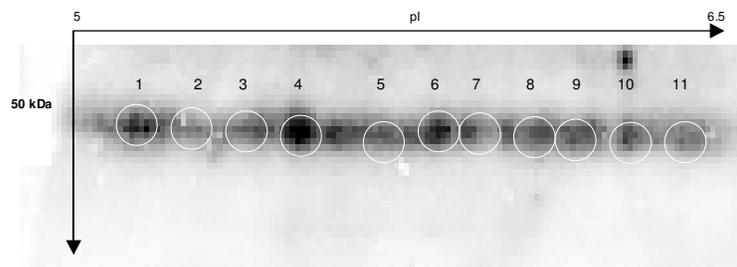


Figura 5. Evaluación inmunoquímica de isoformas de tubulina reconocidas con AcM Tu-02 en tiras IPG 3-10NL. Revelado mediante quimioluminiscencia de una muestra de fracción enriquecida separada por isoelectroenfoque en tiras IPG 3-10 NL de 18 cm con el anticuerpo TU-02.

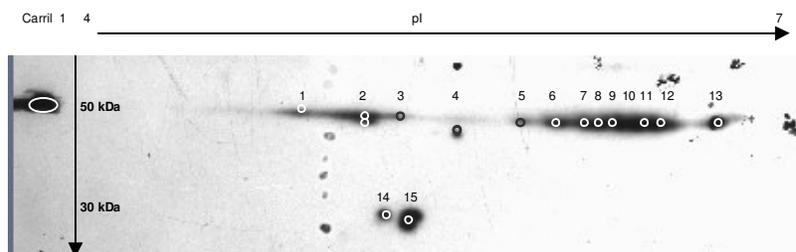


Figura 6. Evaluación inmunoquímica de isoformas de tubulina reconocidas con AcM TU-02 en tiras IPG 4-7 L. Revelado mediante quimioluminiscencia de una muestra de fracción enriquecida separada por isoelectroenfoque en tiras IPG 4-7 L de 7 cm con el anticuerpo TU-02. En el carril 1 se muestra la reactividad del anticuerpo a la tubulina de testículo de ratón utilizada como control positivo.

Los resultados obtenidos con la estimación de los pI y el número de isoformas obtenidas en los experimentos se muestran en la tabla I. Para estos fines se efectuaron cálculos manuales de los valores de los puntos isoelectrónicos, con base a los nomogramas presentados en apéndice 8, de acuerdo a lo indicado por el proveedor de las tiras IPG.

	Tiras IPG 3-10 NL	PM	Tiras IPG 4-7 L	PM
--	------------------------------	-----------	----------------------------	-----------

1	5.37	53	4.84	53.68
2	5.49	54	5.06	54 y 52
3	5.60	54	5.26	53.5
4	5.66	53	5.41	54
5	5.75	53	5.54	53.5
6	5.80	53	5.81	53.5
7	5.93	53	5.85	53.5
8	5.97	53	5.99	53.5
9	6.03	53	6.07	53.5
10	6.09	53	6.16	53.5
11	6.26	53	6.25	53.5
12			6.32	53.5
13			6.69	54
14			5.25	34.6
15			5.41	34

Tabla 1. Isoformas de tubulina alfa de cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF. Se muestran los puntos isoeléctricos calculados para las isoformas de tubulina reconocidas por el AcM TU-02 mostradas en las figuras 5 y 6.

VI. Discusión de Resultados

Aunque las tubulinas han sido ampliamente estudiadas en organismos eucariontes, poco se ha hecho al respecto en los céstodos y específicamente en ténidos. Esto resulta contradictorio como se describió en la introducción en relación al tratamiento de la neurocisticercosis, porque las tubulinas son consideradas como blancos de fármacos cestocidas y los efectos positivos de éstos fármacos son claros [44, 54] y al menos en *T. solium* no se conoce nada de esta proteína.

En la presente tesis, debido a los problemas de la obtención de material suficiente para estudio de tubulinas y a la variabilidad con la que los parásitos son obtenidos cuando existen infecciones naturales, se decidió utilizar el modelo experimental de cisticercosis murina por *T. crassiceps* de la cepa ORF. Se enlistan las ventajas encontradas en el modelo: Los parásitos en estudio únicamente se encuentran en la fase larvaria como cisticercos. Como no tienen escólex, no existe riesgo de que alcancen otro estadio parasitario intermedio que pueda afectar los resultados de caracterización de tubulina para el estadio en estudio. Al reproducirse asexualmente por gemación son una fuente para obtener cantidad suficiente de proteína e incluso es factible sincronizar la infección.

El principal objetivo de la presente tesis, fue la identificación de la tubulina en extractos parasitarios, obedece a varias circunstancias: 1. La caracterización bioquímica e inmunoquímica de las proteínas musculares actina y miosina tipo II en los mismos tipos de cisticercos, mostraron que los parásitos expresan varias isoformas y en el caso de *T. solium*, parecen ser expresadas diferencialmente dependiendo del estadio de desarrollo de los parásitos [22, 24, 25, 55]. Por lo cual si se utilizaban estrategias similares de caracterización se obtendrían resultados equivalentes. Al día de hoy no hay estudios relacionados con tubulina en ténidos y se pensó que los resultados serían novedosos para conocer más acerca de la biología celular de los parásitos. 2. Mediante la técnica de inmunohistoquímica se ha caracterizado la tubulina alfa con el uso de anticuerpos monoclonales comerciales anti tubulina en tejidos de cisticercos de *T. solium* y en los de *T. crassiceps* de la cepa ORF

[37, 38, 56] por ello se decidió utilizar el anticuerpo monoclonal TU-02, ya que este anticuerpo reconocía a la tubulina alfa en el parásito a estudiar. Se probó este anticuerpo contra extractos recuperados de los parásitos con el objetivo de detectar la proteína. Con la experiencia adquirida en la aplicación del isoelectroenfoque y la doble dimensión en geles de poliacrilamida para identificación de las isoformas de actina [22], podrían detectarse isoformas de tubulina alfa reconocidas en los tejidos. 3. Los sitios reconocidos por el anticuerpo a utilizar en los tejidos de los parásitos según marcajes fluorescentes son a nivel del tegumento sincicial continuo y a nivel de los penachos ciliares dentro de las células flama de gusanos invaginados. La expresión intensa de tubulina en estos sitios se debe a que es donde se lleva el proceso de internalización de los nutrientes [47], este proceso de endocitosis requiere que las vesículas con los nutrientes se desplacen a lo largo del MT [1]. 4. Al ser la tubulina una de las proteínas más complejas de aislar porque los polímeros son inestables y requieren condiciones especiales durante su obtención [34]. Se planteó utilizar el modelo experimental de cisticercosis murina montado en el laboratorio para contar con una cantidad suficiente de proteína para los experimentos. 5. Los cisticercos del modelo murino se han considerado como un modelo adecuado para el estudio de fármacos que podrían dañar a los cisticercos de *T. solium* [44, 57] y en los que se demostró que con el tratamiento *in vitro* de albendazol los cisticercos resultan dañados en las estructuras tisulares [44] en las que hay una elevada expresión de tubulina alfa y lo cual puede ser evidencia indirecta de que los MT resultan alterados por el tratamiento de derivados de el bencimidazol como ya había sido establecido desde hace tiempo [48, 58] y como se estableció para los cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF [57].

El primer paso consistió en la evaluación electroforética de los extractos obtenidos bajo los ciclos de polimerización y despolimerización con base a la temperatura [52] como se muestra en la figura 2. Los pasos incluidos es cuando la proteína se encuentra polimerizada. En la cita original se establece que bajo las condiciones de inducción a la despolimerización a 4°C, su polimerización a 37°C y estabilización de los polímeros por la adición de taxol (un agente estabilizador de MT el cual tiene la propiedad de unirse específicamente a tubulina beta [6, 7]) se permiten el enriquecimiento de los

MT y la tubulina. En los resultados que se obtuvieron se consideró que debido al enriquecimiento aparente de las proteínas situadas entre los 75 y 50 kDa, dentro de las ellas podría estar la tubulina. Esto se confirmó con la inmunodetección de la tubulina con el AcM TU-02 y se mostró en la figura 3B en los carriles 2 y 3. Sin embargo, al comparar bajo el mismo tipo de ensayo a la tubulina enriquecida bajo las condiciones de la técnica de Shelanski, se encontró que aparentemente hubo una mejor recuperación de la tubulina bajo esta última técnica. En la figura 3B (carriles 4 y 5), bajo las condiciones descritas por Shelanski, la cual es una estrategia en la que se evita el uso del taxol y hace uso de un mayor número de ciclos de polimerización y despolimerización dependientes de temperatura, así como el empleo de sacarosa [34], estas condiciones preservan mejor a la tubulina y por ello disminuye la reactividad con otras bandas de menor peso molecular.

De acuerdo a la figura 4, el proceso de extracción permitió la obtención de un enriquecido de tubulina. Aún cuando se obtiene tubulina bajo la técnica de Lubega, la forma de extracción podría haber generado condiciones que favorecieron la degradación de la tubulina, por lo cual se detectaron bandas situadas alrededor de los 35 kDa. En la identificación de tubulinas de *Leishmania mexicana* mediante espectrometría de masas posterior a la separación electroforética por geles bidimensionales, se mostró que además de la tubulina completa es posible encontrar fragmentos de tubulina, tanto alfa (28 kDa) como tubulina beta (27 y 18 kDa) [59]. Es posible que el tipo de tratamiento de las muestras favorezca que las tubulinas (por ser proteínas muy lábiles) se autodegraden y se les encuentre con pesos moleculares menores. En estudios realizados por Mandelkow *et al.* en 1985 [60] se demostró que la tubulina de cerebro de cerdo, obtenida por ciclos de polimerización y despolimerización en presencia de temperatura, es susceptible de autodegradarse en función del tiempo. Después de 120 min, se generan fragmentos de 42, 36, 31, 23, 19, 17 y 13 kDa como se pudo haber dado en la tubulina de cisticercos de *T. crassiceps* y que se mostró en la figura 2, 3 y 4.

La confirmación de que es tubulina alfa lo reconocido por TU-02 en los extractos enriquecidos mostrados en la figura 3B, se observa por la comparación con lo detectado en la muestra de testículo de ratón considerada como un control positivo para la tubulina y que se muestra en la figura 4. Se

utilizó testículo de ratón porque se sabe que hay una alta cantidad de tubulina en estos tejidos en donde se observa el reconocimiento del AcM TU-02 como se mostró en la figura 4 en el carril 4 [61]. El PM calculado para la tubulina alfa de los cisticercos de *T. crassiceps* es de 53 kDa y aparentemente la cantidad de tubulina es menor que la que estaba presente en la muestra control o bien dado que el AcM se preparó contra tubulina de ratón, hay un mayor número de determinantes antigénicos en esta especie que en la de los parásitos.

El uso de anticuerpos con fines de reconocimiento de isoformas de proteínas del citoesqueleto no es nuevo [62, 63], en el grupo de investigación en el que se llevó a cabo la presente tesis se ha utilizado esta estrategia para detectar diferentes isoformas de actina separadas mediante geles bidimensionales [22]. El que los anticuerpos reconozcan varias formas de una misma proteína está relacionado con el hecho de que en todas ellas existe un epítipo común con el anticuerpo que reacciona; TU-02, según el fabricante, es una clona murina producida en contra de los aminoácidos 1-451 que representan a toda la longitud de la tubulina alfa de origen porcina y la cual se recomienda para detectar a esta tubulina en ratón, rata, humano y cerdos. Se considera como un anticuerpo control para la detección de RNA mensajeros de tubulina alfa en diferentes tipos de lisados celulares. No existe descripción del fabricante acerca de cuál es la composición exacta de aminoácidos reconocidos por el TU-02. Por la reactividad del AcM TU-02 hacia la tubulina de cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF (Figuras 3B y 4) y lo que describe el fabricante, debe existir una secuencia de aminoácidos semejante con la correspondiente en la tubulina de testículo de ratón.

Desde que se implementó el uso de los geles bidimensionales como una técnica que permite caracterizar todas las proteínas desde una mezcla compleja, se estableció su utilidad para separación de isoformas de proteínas con base a las diferencias en sus puntos isoeléctricos [64]. Esto se debe a que se apoya en 2 herramientas para la separación de las proteínas como es el isoelectroenfoco y la separación electroforética en geles de poliacrilamida. Estas técnicas se consideran parte del análisis proteómico. El isoelectroenfoco de las proteínas con base a su punto isoeléctrico, es una propiedad exclusiva de cada proteína por su composición de aminoácidos. Se debe a que las proteínas se mueven de forma distinta en gradientes de pH

definidos [63-65]), también se asocian estos movimientos al PM de la proteína y se convierte en una característica exclusiva de las proteínas. Por esto es una forma de lograr su identificación antes de que se llegue a la determinación de su secuencia completa de aminoácidos [66]. Se puede distinguir una isoforma que tenga una variación de un sólo aminoácido con respecto a otra por esta técnica y si las isoformas tienen determinantes antigénicos comunes, éstos pueden ser hechos reaccionar con anticuerpos específicos [63].

La electroforesis bidimensional se ha utilizado de manera frecuente para el estudio de proteínas en diferentes parásitos como *S. mansoni*, en donde se han hecho comparaciones de los proteomas entre etapas de desarrollo del parásito [67]; en *Schistosoma bovis* se han comparados los proteomas del tegumento de hembras y machos, así como de productos de secreción y proteínas del tegumento [68]; en *Plasmodium falciparum* se ha logrado diferenciar la presencia de proteínas de diferentes etapas del parásito dentro del vector [69] y se han establecido diferencias entre las proteínas del huésped y las del parásito [70, 71] y en el caso de *Leishmania donovani* se han logrado hacer detección de modificaciones postranduccionales durante la diferenciación de los parásitos por espectrometría de masas [72].

En lo que se refiere a la caracterización de tubulina, se ha estudiado ampliamente en nematodos y trematodos; pos estudio se han hecho en algunos cestodos como *Hymenolepis diminuta*, *E. granulosus* y *E. multilocularis* [16, 73, 74]. En estos parásitos se ha intentado el abordaje de aspectos genómicos, bioquímicos, histoquímicos e incluso, en el caso de *E. granulosus* y *E. multilocularis*, se ha buscado evaluar a la tubulina como proteína blanco de bencimidazoles [16, 75]. A través de estudios proteómicos se ha identificado tubulina en diversos parásitos como *Leishmania*, *T. cruzi*, *T. brucei* y *Giardia lamblia* [76-80] y en todos los casos se ha identificado una mayor cantidad de proteínas a las esperadas. En el presente trabajo de investigación, mediante IEF en tiras de IPG y separaciones electroforéticas en segunda dimensión en geles de poliacrilamida, combinadas con inmunoelectrotransferencia, se logró la identificación de varias isoformas de tubulina alfa como se muestra en las figuras 5, 6 y se presentan los puntos isoeléctricos en la tabla I. El AcM TU-02 mostró tener capacidad de reconocimiento de la tubulina alfa y sus isoformas en los parásitos de estudio.

Con base a las figuras 5 y 6 se identificaron 15 isoformas, cuando la separación de las proteínas se hizo con tiras IPG de 3-10 NL se encontraron 11, mientras que al emplear tiras IPG 4-7 L se encontraron 15 y lo cual debe estar relacionado con la capacidad de resolución al utilizar este último tipo de tiras. Aún siendo tiras de menor tamaño (7 cm) se logró incrementar la resolución de la separación de las proteínas debido a que se amplió la ventana de pH y se obtuvieron 13 isoformas de PM de 53 kDa, mientras que se observó, usando estas mismas tiras, dos isoformas de PM menor de 37 kDa. Estas últimas, de acuerdo a lo descrito anteriormente, podrían tratarse de isoformas producto de la degradación de la tubulina alfa por el tratamiento seguido y las cuales fueron reveladas por el tiempo de exposición durante el revelado de las placas utilizadas. La identificación de las isoformas se logró por el empleo del paquete computacional PDQuest. El calculo del pI de las isoformas presentada en la tabla I, se realizó manualmente considerando los parámetros que el fabricante indicó.

La determinación de los valores experimentales de pI de las isoformas de tubulina de los cisticercos que se situó en el intervalo de 4.84 y 6.69 bajo el análisis con tiras IPG 4-7 L (ver tabla I) aparentemente corresponden con lo calculado teóricamente. Los pI se encuentran en el intervalo de 4.92 a 5.18 y se calcularon con el programa PM/pI Tool (http://au.expasy.org/tools/pi_tool.html). Para el nematodo *C. elegans* y lo cual se pudo efectuar porque existe apertura al genoma del parásito. Los valores experimentales obtenidos en la presente tesis se encuentren dentro de los intervalos de pI esperados para las tubulinas, sin tomar en cuenta que varias de las tubulinas alfa identificadas podrían haber sufrido algún tipo de modificación postransduccional. Según los resultados cabe esperar la posibilidad de que existan mas de cinco genes que codifiquen para las tubulinas alfa en los cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF y sólo hasta que se haya establecido el genoma respectivo podrá aclararse. Una alternativa a ello podría contar con el genoma de *T. solium*, en el que mediante el uso de secuencias marcadas y expresadas (del ingles “expressed sequence target reads” o EST’s) [81]. Se han identificado regiones de genes que codifican para proteínas del citoesqueleto y dentro de ellas se encuentran los genes de tubulina de los cuales aún se desconocen las secuencias génicas, el número

de genes y las posibles isoformas de los mismos que codifiquen para estas proteínas. En *F. hepatica* un helminto cercano a los céstodos, se conoce que existen por lo menos 4 genes de tubulina alfa y 3 de tubulina beta mediante la estrategia de análisis por EST's, se encontró una quinta isoforma de tubulina alfa, así como 3 isoformas más de tubulina beta [15].

El número de isoformas de tubulina encontradas en el presente proyecto de tesis parece correlacionarse con lo reportado para el nematodo *Caenorhabditis elegans* en el que se encontraron 9 genes que pueden codificar a la proteína, aunque en otros parásitos como *Onchocerca volvulus* y *H. contortus* sólo se ha descrito una isoforma [82, 83]. En tremátodos, como *S. mansoni* se han identificado 2 isoformas, mientras que en *F. hepatica* se han propuesto que podrían existir entre 5 y 6 isoformas, correspondientes a los genes de tubulinas alfa y beta [15] los cuales aún quedan por ser demostrados. En céstodos, sólo se ha identificado una forma de tubulina tanto en *Hymenolepis diminuta* como en *Spirometra erinaceieuropaei*.

La contribución importante de la presente tesis, es que por primera vez se demuestra que hay un número mayor de isoformas para la tubulina alfa de cisticercos de *T. crassiceps*. No es extraño que exista un número tan amplio de isoformas de un solo tipo de tubulina, como se describió anteriormente. Se ha establecido que hay varias isoformas tanto para la tubulina alfa como para la beta como lo encontrado en cerebro de cerdo para el que se demostrado la existencia de alrededor de 20 isoformas [14, 17, 26]. Una de las causas por las que en los metazoarios exista una amplia cantidad de isoformas, se podría deber a que en los organismos hay más de un gen con capacidad de codificación para la proteína [10, 14, 84, 85] para cada una de las proteínas que se expresen podría existir un proceso de alteración de su expresión debido a cambios inducidos por modificaciones postransduccionales con lo cual aumentaría la cantidad de proteínas expresadas [86, 87]. Estas modificaciones que sufren las proteínas pueden dar lugar a que desempeñen funciones específicas [88] y pueden ser condicionantes para que se diversifiquen las tubulinas; en el caso de la tubulina alfa se ha propuesto que las modificaciones que sufre la proteína puede permitir una dinámica diferente entre el ensamble de los microtúbulos y la morfogénesis. Una de las mas grandes ventajas de que las proteínas hayan sufrido modificaciones de tipo postransduccional es el

hecho de que estos cambios pueden ser empleados para generar anticuerpos específicos en contra de las proteínas y con ello se puede lograr la identificación de diferentes formas modificadas de las tubulinas. Recientemente, la introducción del análisis de la determinación de la secuencia de aminoácidos mediante espectrometría de masas ha permitido establecer otra forma de determinar si una proteína ha sufrido alguna modificación postransduccional [62, 89].

Para tubulina alfa se ha demostrado que los cambios significativos se deben a modificaciones postransduccionales [26]. Entre ellos destacan las tirosinaciones y las acetilaciones: Tirosinaciones. Se deben a la adición de residuos de tirosina en los extremos carboxi-terminales lo cual produce microtúbulos estables para la formación de flagelos, cilios primarios, centriolos y bandas marginales. Acetilaciones. Este tipo de modificaciones producen cambios en la morfogénesis de los flagelos de *Chlamydomonas*, así como la formación de MT morfológicamente distintos y que se han detectado en el citoplasma de células diversas. Este tipo de modificaciones en tubulinas parecen generar mayor estabilidad de los MT frente a procesos de despolimerización inducida por fármacos pero no por temperatura fría. De acuerdo a esto, cabría la posibilidad de que por los resultados observados en la presente tesis, en la que bajo el enriquecimiento con la técnica de Lubega (que incluye taxol y un menor número de eventos de polimerización y despolimerización) se haya inducido a una mayor degradación de la tubulina alfa de cisticercos de *T. crassiceps*, en comparación con lo obtenido bajo la técnica de Shelanski, y lo cual pueda estar relacionado con características específicas de los MT formados por la tubulina alfa de estos parásitos.

Recientemente, para las tubulinas, se han establecido que existen más variaciones de las proteínas por modificaciones postransduccionales como las palmitoilaciones, fosforilaciones, poliglutamilaciones y poliglicilaciones, lo cual es un claro ejemplo de la gran variedad de isoformas de proteínas que se están expresando en los parásitos.

El efecto de fármacos cestocidas, basados en las moléculas del bencimidazol y en las cuales su blanco farmacológico son las tubulinas únicamente tienen efecto sobre las tubulinas de los parásitos y no en la de sus hospederos. Dependiendo del tipo de tubulina de los parásitos, el efecto de

este tipo de fármacos es distinto como lo muestra el triclabendazol que sólo es efectivo en contra del tremátodo *F. hepatica* [90].

Las isoformas de tubulina alfa encontradas para los cisticercos de *T. crassiceps* podrían tener actividades específicas en función de los sitios en las que se les encuentre; aunque como se comentó hay evidencias de que el AcM TU-02 reacciona con tubulinas alfa que se encuentran en el tegumento sincicial y en las células flama. Con los presentes resultados no hay evidencia alguna de que tipo de isoformas se encuentren en que región de los parásitos y cabría la posibilidad de que ello pudiera ser aclarado luego de que se hiciera un aislamiento e identificación de las mismas isoformas, con el mismo anticuerpo, en las que se hayan analizado diferentes partes de los tejidos de los parásitos. Una de las alternativas al respecto podría ser la obtención de células flama de los cisticercos, la identificación y la cuantificación de los niveles de expresión de las isoformas de las tubulinas de estas células mediante el análisis proteómico empleado en el presente trabajo de tesis.

Como resultado de lo obtenido aquí se vislumbran nuevas vías para el desarrollo de fármacos selectivos con base a lo que se conoce. Por ejemplo, el conocimiento de expresión diferencial de isoformas de tubulina podría tener aplicación tanto en el rediseño o diseño de fármacos antiparasitarios que se usan en contra de estos parásitos. Como se ha indicado, la tubulina es un blanco para el tratamiento de las enfermedades producidas por *T. solium*, pero la selectividad de los fármacos en contra de esta proteína podrían estar en función de la expresión diferencial de isoformas dependiente del estadio de desarrollo de los parásitos y de los sitios de ataque por dichas sustancias. Se ha planteado que el uso no controlado de este tipo de fármacos, como en el caso de la cisticercosis cerebral debida a *T. solium*, es posible que se complique por la resistencia que los parásitos presentan al uso del albendazol [45] y con esto se disminuye la efectividad de su uso. Por esta razón, es necesario encontrar alternativas para el tratamiento terapéutico que incluya el desarrollo de fármacos cestocidas con base al diseño racional de fármacos, el uso de combinaciones de fármacos o nuevas formulaciones [45] y en las que las tubulinas, sean el blanco de ataque. Posterior a esto, será posible optimizar la dosis, eficacia y especificidad de las moléculas contra los parásitos. Una de las alternativas para lograr estos fines sería el empleo de la química medicinal

para el diseño o rediseño de sustancias farmacológicas, la cual en conjunto con los conocimientos de la biología celular y fisiología de los parásitos permitiría, asociados a la parasitología la genómica y la proteómica, el desarrollo de nuevos o mejores fármacos cestocidas como ha sido establecido para el control de las enfermedades producidas por helmintos [49].

Para aprovechar lo que se ha descrito para las estrategias planteadas para el desarrollo de fármacos antiparasitarios, es clara la necesidad de conocer la estructura, la composición y la expresión de las proteínas consideradas como blancos farmacológicos. Las tubulinas forman parte de familias multigénicas que codifican a varias proteínas, lo cual implica la expresión de múltiples isoformas en las que están incluidas las modificaciones postransduccionales. Si estas modificaciones otorgan especificidad a las proteínas involucradas, las cuales pueden ser modificadas por el medio en el que se encuentren o por otras proteínas con las que interaccionen, ello debe de ser considerado al momento de evaluar la interacción proteína-fármaco.

VII. Conclusiones

La cisticercosis experimental murina es un modelo adecuado para estudiar la expresión de tubulinas en la fase larvaria de estos parásitos. Debido a que este tipo de cisticercos son muy semejantes a los de *T. solium*, ello representa una oportunidad de explorar lo que podría tener en la importancia biológica de estos parásitos y que ello incida en el conocimiento de su biología celular y su fisiología.

La obtención de enriquecidos de tubulina de cisticercos mediante ciclos de polimerización y despolimerización muestra que es posible enriquecer la proteína desde los tejidos parasitarios, pero que las proteínas presentan ciertas características biológicas que pueden producir que se degrade durante su tratamiento.

El anticuerpo monoclonal comercial TU-02, en combinación con el análisis electroforético bidimensional y la inmunoquímica, mostró ser adecuado para lograr la identificación y determinación del punto isoeléctrico de las isoformas de tubulina alfa de cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF.

Los cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF, recuperados a los 4 meses de infección, presentan 13 isoformas completas y 2 fragmentos de isoformas de tubulina alfa reconocidas por los AcM TU-02. Estas isoformas tienen valores de pI calculados experimentalmente semejantes a las obtenidas teóricamente para nemátodos.

Cabría la posibilidad de que existan mas de 5 genes que codifiquen para isoformas distintas de tubulina alfa de cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF y que otras mas se expresen debido a modificaciones postransduccionales que se puedan dar en los parásitos.

Cabría la posibilidad de que el efecto del albendazol, sobre la polimerización de tubulinas de cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF, esté relacionado con alguna de las isoformas tubulinas alfa detectadas en el presente proyecto de tesis.

VIII. Perspectivas

Es necesario continuar con el análisis de las características bioquímicas, inmunoquímicas y genómicas de las tubulinas de los parásitos en estudio para definir sus propiedades biológicas en los parásitos, así como continuar con los estudios proteómicos que permitan establecer los valores reales de su punto isoeléctrico, peso molecular, composición de aminoácidos y de modificación postransduccional que hayan sufrido durante su expresión. Con la identificación de que existen varias isoformas de tubulinas alfa es necesario establecer el número de genes que las codifican, así como determinar cuáles de ellas pueden sufrir modificaciones postransduccionales, la importancia podría tener ello para la fisiología de los parásitos y la importancia de ello en la relación huésped-parásito

La evaluación por análisis proteómico de la expresión de isoformas de tubulinas en función del tratamiento con fármacos como los derivados de bencimidazoles, entre los que se incluye al sulfóxido de albendazol y sustancias con potencial antiparasitario, permitirá definir cuáles de ellas resultan afectadas por el tratamiento. Comprobar que el blanco de las moléculas derivadas de los bencimidazoles es una de las isoformas de la tubulina y lo cual sería adicional a lo reportado desde hace más de 20 años.

IX. Referencias

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002), The cytoskeleton: Molecular Motors. *Molecular Biology of the Cell*. 4 edición. New York. 949-53.
2. Bray D (2001), Myosin. *Cell Movements. From molecules to motility*. . 2 edición. Garland Publishing, Taylor & Francis Group. New York. 103-17.
3. Sellers J.R. (1999), Myosins. 2 edición. *Protein Profile*. Oxford: Oxford University Press. 237.
4. Sheterline P, Clayton J, Sparrow J C (1998), Actin. 4 edición. *Protein Profile*. Oxford: Oxford University Press. 24-54.
5. Tuszynski J A, Carpenter E J, Huzil J T, Malinski W, Luchko T, Luduena R F (2006). The evolution of the structure of tubulin and its potential consequences for the role and function of microtubules in cells and embryos. *The International Journal of Developmental Biology*. 50(2-3): 341-58.
6. Beese L, Stubbs G, Cohen C (1987). Microtubule structure at 18 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. 194(2): 257-64.
7. Beese L, Stubbs G, Thomas J, Cohen C (1987). Structure of microtubules with reduced hydration. Comparison of results from X-ray diffraction and electron microscopy. *Journal of Molecular Biology*. 196(3): 575-80.
8. Nogales E, Wolf SG, Downing K H (1998). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography *Nature*. 391(6663): 199-203.
9. Keeling PJ, Doolittle WF (1996). Alpha-tubulin from early-diverging eukaryotic lineages and the evolution of the tubulin family *Molecular Biology and Evolution*. 13(10): 1297-305.
10. McKean P G, Vaughan S, Gull K (2001). The extended tubulin superfamily. *Journal of Cell Science*. 114(Pt 15): 2723-33.
11. Lowe J, Amos LA (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ *Nature*. 391(6663): 203-6.
12. Nogales E, Downing KH, Amos LA, Lowe J (1998). Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases *Nature Structural Biology*. 5(6): 451-8.
13. Van Den Ent F, Amos L, Lowe J (2001). Bacterial ancestry of actin and

- tubulin *Current Opinion in Microbiology*. 4(6): 634-8.
14. Luduena RF (1998). Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications *International Review of Cytology*. 178: 207-75.
 15. Ryan LA, Hoey E, Trudgett A, Fairweather I, Fuchs M, Robinson MW, Chambers E, Timson DJ, Ryan E, Feltwell T, Ivens A, Bentley G, Johnston D (2008). *Fasciola hepatica* expresses multiple alpha- and beta-tubulin isoforms *Molecular and Biochemical Parasitology*. 159(1): 73-8.
 16. Brehm K, Kronthaler K, Jura H, Frosch M (2000). Cloning and characterization of beta-tubulin genes from *Echinococcus multilocularis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 107(2): 297-302.
 17. Dutcher SK (2001). Motile organelles: the importance of specific tubulin isoforms. *Current Biology*. 11(11): R419-22.
 18. Hooper SL TJ (2005). Invertebrate muscles: muscle specific genes and proteins. *Physiological Reviews*. 85(3): 1001-60.
 19. Kimura A TT, 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(1): 59-69.
 20. Karakozova M, Kozak M, Wong CC, Bailey AO, Yates JR 3rd, Mogilner A, Zebroski H, A. K (2006). Arginylation of beta-actin regulates actin cytoskeleton and cell motility. *Science*. 313(5784): 192-6.
 21. Herman IM (1993). Actin isoforms. *Current Opinion in Cell Biology*. 5(1): 48-55.
 22. Ambrosio JR, 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(9): 727-33.
 23. Pette D SR (2000). Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy Research and Technique*. 50: 500-9.
 24. Gonzalez-Malerva L C-RM, Reynoso-Ducoing O, Retamal C, Flisser A,, JR. A (2004). Muscular myosin isoforms of *Taenia solium* (Cestoda). *Cell Biology International*. 28(12): 885-94.
 25. Cruz-Rivera M, Reyes-Torres A, Reynoso-Ducoing O, Flisser A, Ambrosio JR (2006). Comparison of biochemical and immunochemical properties of

- myosin II in taeniid parasites. *Cell Biology International*. 30(7): 598-602.
26. Sullivan KF (1988). Structure and utilization of tubulin isotypes. *Annual Review of Cell Biology*. 4: 687-716.
 27. Krauhs E, Little M, Kempf T, Hofer-Warbinek R, Ade W, Ponstingl H (1981). Complete amino acid sequence of beta-tubulin from porcine brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 78(7): 4156-60.
 28. Ponstingl H, Krauhs E, Little M, Kempf T (1981). Complete amino acid sequence of alpha-tubulin from porcine brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 78(5): 2757-61.
 29. Oakley BR, Oakley CE, Yoon Y, Jung MK (1990). Gamma-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans* *Cell*. 61(7): 1289-301.
 30. Oakley CE, Oakley BR (1989). Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans* *Nature*. 338(6217): 662-4.
 31. Dutcher SK, Morrissette NS, Preble AM, Rackley C, Stanga J (2002). Epsilon-tubulin is an essential component of the centriole. *Molecular Biology of the Cell*. 13(11): 3859-69.
 32. Dutcher SK, Trabuco EC (1998). The UNI3 gene is required for assembly of basal bodies of *Chlamydomonas* and encodes delta-tubulin, a new member of the tubulin superfamily. *Molecular Biology of the Cell*. 9(6): 1293-308.
 33. Zheng Y, Jung MK, Oakley BR (1991). Gamma-tubulin is present in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* and is associated with the centrosome *Cell*. 65(5): 817-23.
 34. Shelanski ML, Gaskin F, Cantor CR (1973). Microtubule Assembly in the Absence of Added Nucleotides *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 70(3): 765-8.
 35. Laclette JP, Skelly PJ, Merchant MT, Shoemaker CB (1995). Aldehyde Fixation Dramatically Alters the Immunolocalization Pattern of Paramyosin in Platyhelminth Parasites. *Experimental Parasitology*. 81(1): 140-3.
 36. Wolstenholme AJ FI, Prichard R, von Samson-Himmelstjerna G, Sangster, NC. (2004). Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*. 20(10): 469-76.

37. Valverde L (2007). Distribución de proteínas del citoesqueleto en células flama de cisticercos de *Taenia solium*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. .
38. Pérez-Reyes A (2008). Efecto de derivados del bencimidazol en la morfología y en la expresión de proteínas del citoesqueleto de cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina. UNAM.
39. Palomares F., Palencia G., Ambrosio J. R., Ortiz A., Jung-Cook H. (2006). Evaluation of the efficacy of albendazole sulphoxide and praziquantel in combination on *Taenia crassiceps* cysts: in vitro studies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 57(3): 482-8.
40. Flisser A. (1994). Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium* *Progress in Clinical Parasitology*. 4: 77-116.
41. Cook GC (1998). Taeniasis and cysticercosis *Journal of the Royal Society of Medicine*. 91(10): 534-5.
42. Flisser A, Rodriguez-Canul R., Willingham A.L. (2006). Control of the taeniosis/cysticercosis complex: Future developments. *Veterinary parasitology*. 139(4): 283-92.
43. Freeman R.S. (1962). Studies in the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology*. 40: 969-90.
44. Palomares F., Palencia G., Perez R., Gonzalez-Esquivel D., Castro N., Cook H. J. (2004). In vitro effects of albendazole sulfoxide and praziquantel against *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48(6): 2302-4.
45. Palomares-Alonso F, Jung-Cook H, Perez-Villanueva J, Piliado JC, Rodriguez-Morales S, Palencia-Hernandez G, Lopez-Balbiaux N, Hernandez-Campos A, Castillo R, Hernandez-Luis F (2008). Synthesis and in vitro cysticidal activity of new benzimidazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*.
46. Palomares-Alonso F, Piliado JC, Palencia G, Ortiz-Plata A, Jung-Cook H (2007). Efficacy of nitazoxanide, tizoxanide and tizoxanide/albendazole sulphoxide combination against *Taenia crassiceps* cysts. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 59(2): 212-8.
47. Ambrosio JR, Landa A, Laclette JP (1995). Internalization of

- macromolecules by cysticerci of *Taenia crassiceps*. Archives of Medical Research. 25(3): 325-30.
48. Lacey E (1988). The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles International Journal of Parasitology. 18(7): 885-936.
49. Robinson M, McFerran N, Trudgett A, Hoey L, Fairweather I (2004). A possible model of benzimidazole binding to beta-tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement Journal of Molecular Graphics & Modelling. 23(3): 275-84.
50. Lacey E, Gill JH (1994). Biochemistry of benzimidazole resistance Acta Tropica. 56(2-3): 245-62.
51. Fairweather I., Robinson M.W., Vial H.J. (2003). A possible model of benzimidazole binding to beta-tubulin disclose invoking and inter-domain movement. Journal of Molecular Graphics and Modelling. 23(3): 275-84.
52. Lubega GW, Byarugaba DK, Prichard RK (2002). Immunization with a tubulin-rich preparation from *Trypanosoma brucei* confers broad protection against African trypanosomiasis Experimental Parasitology 102(1): 9-22.
53. Lubega GW, Geary TG, Klein RD, Prichard RK (1993). Expression of cloned beta-tubulin genes of *Haemonchus contortus* in *Escherichia coli*: interaction of recombinant beta-tubulin with native tubulin and mebendazole Molecular and Biochemical Parasitology. 62(2): 281-92.
54. Dayan AD (2003). Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. Acta Tropica. 86(2-3): 141-59.
55. Ambrosio JR Cruz-Rivera M, Allan J, Moran E, Ersfeld E, 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: 545-53.
56. Villanueva R (2008). Evaluación del efecto de nitazoxanida en la distribución de proteínas del cito esqueleto del céstodo *Taenia solium*. Reporte de Investigación. Facultad de Ciencias. UNAM.
57. García-Vilchis D (2007). Determinación del Potencial Antihelmíntico de Derivados del Bencimidazol en Cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

58. Lacey E (1990). Mode of action of benzimidazoles *Parasitol Today*. 6(4): 112-5.
59. Nugent PG, Karsani SA, Wait R, Tempero J, Smith DF (2004). Proteomic analysis of *Leishmania mexicana* differentiation. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 136(1): 51-62.
60. Mandelkow EM, Herrmann M, Ruhl U (1985). Tubulin domains probed by limited proteolysis and subunit-specific antibodies *Journal of Molecular Biology*. 185(2): 311-27.
61. Mussali-Galante P, Rodriguez-Lara V, Hernandez-Tellez B, Avila-Costa MR, Colin-Barenque L, Bizarro-Nevarez P, Martinez-Levy G, Rojas-Lemus M, Pinon-Zarate G, Saldivar-Osorio L, Diaz-Beck P, Herrera-Enriquez MA, Tovar-Sanchez E, Fortoul TI (2005). Inhaled vanadium pentoxide decrease gamma-tubulin of mouse testes at different exposure times *Toxicology and Industrial Health*. 21(9): 215-22.
62. Westermann S, Weber K (2003). Post-translational modifications regulate microtubule function *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 4(12): 938-47.
63. Liebler DC (2002), *Introduction to Proteomics. Tools for the new biology*. USA: Human Press Inc. 1-30.
64. O'Farrell P H (1985). Separation Techniques Based on the Opposition of Two Counteracting Forces to Produce a Dynamic Equilibrium. *Science*. 227(4694): 1586-9.
65. Bjellqvist B, Righetti P G, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R, Postel W (1982). Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 6(4): 317-39.
66. David L N, Michael M C (2000), *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3era edición.
67. Curwen RS, Ashton PD, Johnston DA, Wilson RA (2004). The *Schistosoma mansoni* soluble proteome: a comparison across four life-cycle stages *Molecular and Biochemical Parasitology*. 138(1): 57-66.
68. Perez-Sanchez R, Valero ML, Ramajo-Hernandez A, Siles-Lucas M, Ramajo-Martin V, Oleaga A (2008). A proteomic approach to the identification of tegumental proteins of male and female *Schistosoma bovis* worms *Molecular and Biochemical Parasitology*. 161(2): 112-23.

69. Lasonder E, Janse CJ, van Gemert GJ, Mair GR, Vermunt AM, Douradinha BG, van Noort V, Huynen MA, Luty AJ, Kroeze H, Khan SM, Sauerwein RW, Waters AP, Mann M, Stunnenberg HG (2008). Proteomic profiling of Plasmodium sporozoite maturation identifies new proteins essential for parasite development and infectivity PLoS Pathogens. 4(10): e1000195.
70. Kiel M, Josh P, Jones A, Windon R, Hunt P, Kongsuwan K (2007). Identification of immuno-reactive proteins from a sheep gastrointestinal nematode, Trichostrongylus colubriformis, using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry International Journal for Parasitology. 37(13): 1419-29.
71. Geddes J, Eudes F, Laroche A, Selinger LB (2008). Differential expression of proteins in response to the interaction between the pathogen Fusarium graminearum and its host, Hordeum vulgare Proteomics. 8(3): 545-54.
72. Rosenzweig D, Smith D, Myler PJ, Olafson RW, Zilberstein D (2008). Post-translational modification of cellular proteins during Leishmania donovani differentiation Proteomics. 8(9): 1843-50.
73. Watts SD (1981). Colchicine binding in the rat tapeworm, Hymenolepis diminuta Biochimica et Biophysica Acta. 667(1): 59-69.
74. Watts SD (1980). The preparation of a fraction with tubulin-like properties from the rat tapeworm, Hymenolepis diminuta [proceedings] Biochemical Society Transactions. 8(1): 71-2.
75. Perez-Serrano J, Denegri G, Casado N, Bodega G, Rodriguez-Caabeiro F (1995). Anti-tubulin immunohistochemistry study of Echinococcus granulosus protoscolices incubated with albendazole and albendazole sulphoxide in vitro. Parasitology Research. 81(5): 438-40.
76. Hide M, Ritleng AS, Brizard JP, Monte-Allegre A, Sereno D (2008). Leishmania infantum: tuning digitonin fractionation for comparative proteomic of the mitochondrial protein content Parasitology Research. 103(4): 989-92.
77. Dea-Ayuela MA, Rama-Iniguez S, Bolas-Fernandez F (2006). Proteomic analysis of antigens from Leishmania infantum promastigotes. Proteomics. 6(14): 4187-94.
78. Jones A, Faldas A, Foucher A, Hunt E, Tait A, Wastling JM, Turner CM (2006). Visualisation and analysis of proteomic data from the procyclic form

- of *Trypanosoma brucei* Proteomics. 6(1): 259-67.
79. Parodi-Talice A, Duran R, Arrambide N, Prieto V, Pineyro MD, Pritsch O, Cayota A, Cervenansky C, Robello C (2004). Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. *International Journal for Parasitology*. 34(8): 881-6.
80. Paba J, Santana JM, Teixeira AR, Fontes W, Sousa MV, Ricart CA (2004). Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Proteomics*. 4(4): 1052-9.
81. Aguilar-Diaz H, Bobes RJ, Carrero JC, Camacho-Carranza R, Cervantes C, Cevallos MA, Davila G, Rodriguez-Dorantes M, Escobedo G, Fernandez JL, Fragoso G, Gaytan P, Garciarubio A, Gonzalez VM, Gonzalez L, Jose MV, Jimenez L, Lacleite JP, Landa A, Larralde C, Morales-Montor J, Morett E, Ostoa-Saloma P, Sciutto E, Santamaria RI, Soberon X, de la Torre P, Valdes V, Yanez J (2006). The genome project of *Taenia solium*. *Parasitology International*. 55 Suppl: S127-30.
82. Geary TG, Nulf SC, Alexander-Bowman SJ, Mahmoud BM, Prichard RK, Klein RD (1998). Cloning and characterization of cDNAs encoding beta-tubulin from *Dirofilaria immitis* and *Onchocerca volvulus*. *Journal of Parasitology*. 84(2): 356-60.
83. Geary TG, Nulf SC, Favreau MA, Tang L, Prichard RK, Hatzenbuehler NT, Shea MH, Alexander SJ, Klein RD (1992). Three beta-tubulin cDNAs from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* *Molecular and Biochemical Parasitology* 50(2): 295-306.
84. Wagner W, So M (1990). Genomic variation of *Trypanosoma cruzi*: involvement of multicopy genes. *Infection and immunity*. 58(10): 3217-24.
85. Nagel SD, Boothroyd JC (1988). The alpha- and beta-tubulins of *Toxoplasma gondii* are encoded by single copy genes containing multiple introns *Molecular and Biochemical Parasitology*. 29(2-3): 261-73.
86. MacRae TH (1997). Tubulin post-translational modifications--enzymes and their mechanisms of action. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 244(2): 265-78.
87. Noel C, Gerbod D, Fast NM, Wintjens R, Delgado-Viscogliosi P, Doolittle WF, Viscogliosi E (2001). Tubulins in *Trichomonas vaginalis*: molecular characterization of alpha-tubulin genes, posttranslational modifications, and

-
- homology modeling of the tubulin dimer *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 48(6): 647-54.
88. Poole CA, Zhang ZJ, Ross JM (2001). The differential distribution of acetylated and deetyrosinated alpha-tubulin in the microtubular cytoskeleton and primary cilia of hyaline cartilage chondrocytes. *Journal of Anatomy*. 199(Pt 4): 393-405.
89. Bouchon B, Papon J, Communal Y, Madelmont JC, Degoul F (2007). Alkylation of prohibitin by cyclohexylphenyl-chloroethyl urea on an aspartyl residue is associated with cell cycle G(1) arrest in B16 cells. *British Journal of Pharmacology*. 152(4): 449-55.
90. Robinson MW, Hoey EM, Fairweather I, Dalton JP, McGonigle S, Trudgett A (2001). Characterisation of a beta-tubulin gene from the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *International Journal for Parasitology*. 31(11): 1264-8.
91. Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259): 680-5.

X. Apéndices

Apéndice 1 Soluciones utilizadas

Solución PEM. Solución amortiguadora PIPES 100 mM pH 6.6, MgCl₂ 1 mM, EGTA 1 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM, GTP 0.1M

Solución PIPES. Solución amortiguada PIPES 100 mM. 0.452 g de PIPES en 15 mL de agua 18.2 Ω

SSAF. Solución salina fisiológica amortiguada de fosfatos pH 7.2

MgCl₂ 100 mM. 0.0101g en 0.5 mL de agua 18.2 Ω

EGTA 100 mM. 0.019g en 0.5 mL de agua 18.2 Ω

EDTA 100 mM. 0.018g en 0.5 mL de agua 18.2 Ω

GTP 200 mM (Guanosine-5'triphosphate Sigma). 0.0418g en 0.4 mL de agua 18.2 Ω

DTT 100 mM (Ditiotreitol Amersham Biosciences). 0.0077g en 0.5 mL de agua 18.2 Ω

Apéndice 2. Cuantificación de proteínas.

La técnica empleada se hizo de acuerdo a lo establecido en el Estuche DC (Bio-Rad DC Protein Assay):

La curva patrón se prepara a partir de una solución stock de 10 mg/mL de albúmina sérica bovina fracción V (Sigma) a las siguientes concentraciones 0, 0.5, 1, 2, 3, 5 mg/mL. La albúmina sérica se diluye en el mismo buffer que la muestra a cuantificar.

Se prepara el reactivo de trabajo (A') a razón de 20 μ L del reactivo S por cada mL de reactivo A. Posteriormente, en una placa de 96 pozos se adicionan por duplicado 5 μ L por pozo cada una de las concentraciones de la curva estándar y por triplicado 5 μ L por pozo de cada una de los experimentos a cuantificar. Se agregan 25 μ L de reactivo A' en cada pozo y finalmente, se agregan 200 μ L de reactivo B en cada pozo. La placa se agita para mezclar los reactivos.

La reacción se deja reposar 15 min. Finalmente se mide absorbancia a 750 nm.

El mezclado de los reactivos. Para favorecer la reacción se dejan reposando durante 15 min. Finalmente se miden los valores de absorbancia a 750 nm.

Reactivo A: Solución alcalina de tartrato de cobre.

Reactivo B: Reactivo de Folin diluido (mezcla).

Reactivo S: Detergente SDS.

Reactivo A': 20 μ L reactivo S + 1 mL reactivo A (se debe preparar en el momento de usarse)

Apéndice 3. Electroforesis en una dimensión en gel de poliacrilamida.

Geles de poliacrilamida al 10% con 0.1 % de SDS, de 8 x 5.5 cm cámara Mini Protean 3 Cell fuente Power-Pack 3000 de Bio-Rad.

Preparación de geles

Se prepararon por separado las mezclas del gel separador y concentrador como se indica en al tabla 1.

Se depositó primero el gel separador y al polimerizar la solución con concentradora al 4% se coloca el peine.

Soluciones	Gel concentrador	Gel separador
Concentración del gel	4%	10%
Acrilamida-Bisacrilamida 30%	1.33 mL	10 mL
Tris- HCl 0.5 M pH 6.8	2.5 mL	-----
Tris- HCl 1.5 M pH 8.8	-----	7.5 mL
SDS 10%	100 µL	300 µL
H ₂ O 18.2	6.1 mL	12.05 mL
Adicionar hasta el momento de hacer el gel		
TEMED	10 µL	15 µL
PSA 10%	50 µL	150 µL

Tabla 1. Soluciones requeridas para la preparación de los geles de poliacrilamida (4 mini-geles).

El proceso indicado a continuación está basado en el uso de una cámara para electroforesis Mini Protean 3 Cell (Bio-Rad), una fuente de poder Power-Pack 3000 (Bio-Rad) y los accesorios recomendados por el fabricante. La preparación de geles se realizó de acuerdo a lo descrito por Laemmli 1970 [91].

Apéndice 4. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida por Azul de Coomassie R-350.

Preparación

Una tableta de Azul de Coomassie Phasta Gel se disuelve en 80 mL de agua destilada en agitación, se agregan 120 mL de metanol, se agita hasta lograr la solubilización total del colorante. Se filtra la solución y se mezcla en proporción 1:1 con una solución de ácido acético al 20% en agua destilada.

Tinción.

El gel se lava con agua destilada durante 1 min y se incuba en el colorante durante 1 hora. Posteriormente se retira la solución del colorante y se procede a quitar el exceso de colorante al desteñir en una solución de metanol al 50% y ácido acético al 10% en agua destilada.

Apéndice 5. Isoelectroenfoque.

El proceso se siguió de acuerdo a las instrucciones recomendadas por el fabricante (2-D Electrophoresis Principles and Methods). Se utilizó el equipo Protean IEF (Bio-Rad).

Primera dimensión

A) Selección de tiras IPG. Se emplearon tiras de Amersham Biosciences de dos tamaños diferentes: de 7 y 18 cm con diferentes intervalos de gradiente de pH: de 3 a 10 no lineal y de 4 a 7 lineal

B) Rehidratación de tiras IPG. La rehidratación se efectuó de la misma manera para ambos tipos de tiras, lo que varía es el volumen final. Para la tira de 7 cm el volumen fue de 125 μ L con 50 μ g de proteína y para la tira de 18 cm el volumen fue de 350 μ L con μ g de proteína. Como primer paso las charolas de rehidratación se lavaron con extrán al 2%, se nivelaron y en ellas se depositó la mezcla de rehidratación. La mezcla contenía la proteína, 8 M de Urea 2% de CHAPS, DTT 1.3 %, el anfolito correspondiente a la tira empleada al 0.2 % y azul de bromofenol al 0.002%.

Posteriormente se colocaron las tiras con la cara y se adicionó 1 mL de aceite mineral por carril para la tira de 7cm y 3 mL para la tira de 18 cm.

Se incubó durante 14 horas a TA.

C) Isoelectroenfoque. En la charola de corrimiento de Isoelectroenfoque se colocaron 2 puentes de papel filtro humedecidos con agua desionizada 18.2 Ω por carril sobre cada uno de los electrodos y se paso la tira a esta charola. El gel quedó en contacto con los puentes húmedos y se cubrió con 1 o 3 mL de aceite minera y se programó el IEF Cell dependiendo del tamaño de las tiras empleadas como se muestra en la tabla siguiente:

Tipo de tira de isoelectroenfoco (IEE) Tira IPG (cm)	Longitud 7 cm de 4-7 pH			Longitud 18 cm de 3-10 NL		
	Voltaje (V/hr)	Tiempo (min)	Pendiente del voltaje	Voltaje (V/hr)	Tiempo (min)	Pendiente del voltaje
Paso 1	250	20	Lineal	250	20	Lineal
Paso 2	4,000	120	Lineal	10,000	150	Lineal
Paso 3	4,000	10,000	Rápido	10,000	40,000 V/Hr	Rápido

Con 50 μ A por tira a una temperatura de 20°C.

Apéndice 6. Electroforesis en doble dimensión en gel de poliacrilamida.

Dado el tamaño de las tiras empleadas, se emplearon dos equipos con sistemas de electroforesis de doble dimensión diferentes: uno vertical y otro horizontal.

Segunda dimensión **Vertical para tiras IPG de 7 cm de largo**. Transcurrido el isoelectroenfoque, las tiras se incubaron 15 min en agitación y a TA en 5 mL de solución amortiguadora de equilibrio compuesta de Urea 6M, glicerol al 30%, SDS 2% solubilizados en Tris-HCl 1.5 M a pH 9.8 y complementada con 50 mg de DTT en 10 mL, transcurrido el tiempo las tiras se colocaron en otro tubo de ensaye que contenía 5 mL de una solución amortiguadora de equilibrio complementada con 125 mg de iodoacetamida (IAA) y se incubaron durante 15 min bajo agitación continua. Finalmente, las tiras se enjuagaron con agua desionizada de 18.2 Ω y éstas se colocaron sobre geles de poliacrilamida en gradiente de 4 a 12% prehechos (NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris 200 M, Invitrogen). Los cuales previamente se colocaron en una cámara de electroforesis XCell Sure Lock Mini-Cell (Invitrogen). La orientación para colocar las tiras se hizo de tal forma que el cátodo estuviera junto al carril utilizado para los marcadores de peso molecular Precision Plus Protein Prestained Standards (Bio-Rad). La tira se fijó con 200 μ L de agarosa al 0.5%. Se utilizaron como controles 3 μ L de marcadores de peso molecular Precision Plus Protein Prestained Standards (Bio-Rad). También se utilizó solución de extracto crudo de testículo de ratón diluida en la solución amortiguadora de corrida.

Posteriormente, la separación electroforética se realizó en presencia de una solución amortiguadora de corrida a 200 V por 40min. Finalmente, los geles se pusieron en contacto directo con membranas de PVDF para electrotransferir las proteínas.

Segunda dimensión **Horizontal para tiras IPG de 18 cm de largo**. El proceso se siguió de la misma manera solamente cambio el volumen de la solución de equilibrio que fue de 10 mL por incubación. El equipo empleado fue un Multiphor II (Amersham Biosciences). Las tiras se colocaron directamente sobre el gel de poliacrilamida descrito

en el apéndice 6. Los geles se encontraban adheridos a placas de acetato, los cuales se habían colocado sobre una placa de enfriamiento de cerámica del equipo con 4.5 mL de aceite mineral. Para cerrar el circuito, por debajo de cada extremo de la tira, se colocaron puentes de papel filtro humedecidos con agua desionizada 18.2Ω . Para separación electroforética, se colocaron las soluciones amortiguadoras en gel y, sobre los carriles libres a los lados de los extremos de las tiras de IPG, se colocaron 7 μL de marcadores de peso molecular preteñidos. La separación electroforética se llevó a cabo en 2 pasos: En el primero se utilizaron condiciones de 125V, 20 mA y 20 W durante 40 min. En el segundo se utilizaron condiciones de 600 V, 40 mA, 40 W durante 105 min, tiempo en el cual el frente de los marcadores teñidos llegó al ánodo. Posteriormente, al finalizar la separación electroforética, los geles con las proteínas se separaron cuidadosamente desde las placas de acetato mediante el accesorio Film remover (Amersham Biosciences).

Apéndice 7 Electrotransferencia e inmunoquímica.

Los geles corridos se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore). Las membranas fueron previamente activadas con metanol y colocadas en el equipo según recomendaciones del fabricante. El equipo que se utilizó fue una cámara de transferencia semiseca Trans-Blot SD (Bio-Rad) a condiciones de 15 V durante 30 minutos. Posteriormente las membranas se incubaron en agitación por 1 hr a TA en una solución amortiguadora de bloqueo constituida por 2% de albúmina sérica bovina en solución salina balanceada con Tween 20 al 0.3%. Se lavó con SSAF y Tween 20 al 0.3% durante 5 minutos cada lavado y se repitió 3 veces. Las membranas se incubaron a TA durante 1 hora en agitación con el anticuerpo primario anti- tubulina alfa comercial (TU-02, Santa Cruz) diluido (1:1000) en solución de bloqueo. Las membranas se lavaron nuevamente en SSAF con Tween 20 al 0.3%. El siguiente paso fue incubar en presencia del anticuerpo secundario anti- IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (Zymed) diluido 1:1000 en solución de bloqueo por 1 hora a TA en agitación. Al terminar se lavó 3 veces con SSAF con Tween 20 y se lavó 3 veces más con SSAF únicamente. El reconocimiento antígeno-anticuerpo se reveló mediante la reacción enzimática de la peroxidasa, se usó 3,3-diaminobencidina tetrahidrocloruro (DAB) como sustrato, en presencia de H₂O₂ al 30%. La reacción de revelado se detuvo por la adición de H₂O destilada. Las membranas reveladas se secaron y se llevaron al equipo fotodocumentador para la obtención de las imágenes y análisis de las mismas.

De proteínas separadas electroforéticamente en geles unidimensionales.

Las proteínas separadas se transfirieron a las membranas de PVDF (Millipore). Las membranas fueron previamente activadas con metanol y colocadas en el equipo según recomendaciones del fabricante. El equipo que se utilizó fue una cámara de transferencia semiseca Trans-Blot SD (Bio-Rad) bajo condiciones definidas (15 V, 30 minutos). Para efectuar los ensayos inmunoquímicos las membranas se incubaron por 1h a TA en una solución amortiguadora de bloqueo. Se utilizó una solución Tween-20 al 0.3%, polvo de bloqueo proporcionado con el estuche de revelado ECL Advanced (Amersham Biosciences). En otras ocasiones para no utilizar el polvo de bloqueo se

empleo albumina sérica bovina al 2%. Todos los reactivos se disolvieron en una solución de Tween-20 al 0.3% disuelto en SSAF y posteriormente, tres veces con SSAF. Las membranas se incubaron a TA durante 1 hora en agitación con el anticuerpo primario anti tubulina alfa comercial (TU-02; Santa Cruz) diluido en solución de bloqueo 1:1000. Las membranas se lavaron nuevamente con SSAF con Tween al 0.3%. El siguiente paso fue incubar en presencia del anticuerpo secundario anti- IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (zymed) diluido en solución de bloqueo 1:1000. Al terminar se lavó 3 veces con SSAF con Tween 0.3% y 3 veces con SSAF. El reconocimiento antígeno-anticuerpo se reveló mediante la reacción enzimática de la peroxidasa. Se usó 3,3-diaminobencidina tetrahidrocloruro (DAB) como sustrato en presencia de H₂O₂ al 30%. La reacción de revelado se detuvo por la adición de H₂O destilada. Las membranas reveladas se secaron y se llevaron al equipo fotodocumentador para la obtención de las imágenes y análisis de las mismas.

De proteínas separadas electroforéticamente en geles bidimensionales. De la misma manera a lo descrito para la IET de geles unidimensionales, se hizo la inmunoelectrotransferencia para los geles bidimensionales. Para el reconocimiento de la tubulina alfa se utilizaron los mismos anticuerpos (primario y secundario), sin embargo el revelado de estas membranas se hizo mediante quimioluminiscencia con el estuche comercial ECL Advanced (Amersham Biosciences) y la exposición de las membranas fue a películas fotográficas (Kodak). El revelado de las películas se realizó por inmersión de estas durante 30 seg. en la solución de revelado comercial (Kodak), se lavaron con agua corriente y se colocaron en el fijador comercial (Kodak) durante aproximadamente 10 min. Finalmente, las películas reveladas se secaron al aire y se capturaron sus imágenes en el fotodocumentador. Con la idea de monitorear el revelado en el equipo fotodocumentador, las películas obtenidas de la exposición a las membranas y hechas reaccionar con el reactivo quimioluminiscentes, se colocaron en el fotodocumentador y registraron a intervalos de tiempos definidos.

Apéndice 8 Captura, registro y análisis de imágenes.

Electroforesis unidimensional. Para estos fines se emplearon dos formas de captura, de registro y análisis de imágenes: una mediante el sistema fotodocumentador de análisis de imágenes UVP con el programa de cómputo Lab Works Analysis Software Versión 3.0.02.00 y, el otro, un equipo fotodocumentador Chemidoc XRS de Bio-Rad con el programa de cómputo Quantity One versión 4.6.036. En el caso del equipo fotodocumentador Chemidoc XRS se ajustaron y se utilizaron condiciones de captura de las imágenes específicas, las cuales se enlistan a continuación: filtro número 3004 62 mm (Ámbar) y el ajuste del programa a una sensibilidad 10, ancho de línea 4.1 mm, filtro de ruido 1.87, tamaño de escala 5.

Posteriormente, ya con las imágenes obtenidas y mediante el programa Quantity One se hicieron estimaciones de los pesos moleculares aparentes de las fracciones proteicas a través del uso del patrón de marcadores de peso molecular.

Electroforesis bidimensional. El análisis, registro y captura de las imágenes para este tipo de electroforesis se hizo mediante el programa PDQuest. Las películas reveladas por quimioluminiscencia se capturaron de acuerdo a las siguientes condiciones del equipo fotodocumentador: sensibilidad 4.39, tamaño de escala 7, pico mínimo 2481, modelo gaussiano, fondo radio 37, suavizador mediano 3x3. Cuando la captura se realizó directamente en el fotodocumentador de acuerdo a las siguientes condiciones: chemiluminescence no Light 2x gain, iris abierto completamente, tiempo de exposición total 1000 seg. tiempo inicial de exposición 400 seg. Posterior a la captura de las imágenes, se hicieron cálculos para ubicar las isoformas de tubulina alfa de acuerdo a la reactividad de los anticuerpos y a los controles utilizados. Los puntos isoeléctricos se calcularon manualmente con base a lo descrito por el proveedor (Amersham Biosciences) de la siguiente forma: como referencia se utilizó el tríptico técnico 'Immobiline Drystrip Visualization of pH gradients' No. 18-1140-60 (ofrecido por el fabricante), se buscó el punto isoeléctrico en las graficas provistas por el proveedor como las que se muestran a continuación:

