



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIOS DE INMUNOQUÍMICA DE PROTEÍNAS DEL
CITOESQUELETO DE CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps* CEPA
ORF

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**

PRESENTA

YAZMIN MOMPALA GARCÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2016





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Gutiérrez Ramos Abel
VOCAL: García Camacho Gerardo
SECRETARIO: Dr. Ambrosio Hernández Javier Rolando
1er. SUPLENTE: Cordero Hernández José
2º SUPLENTE: Tovar Palacio Claudia Teresa

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:


LABORATORIO DE BIOLOGÍA DEL CITOESQUELETO DE PARÁSITOS, DEPTO. DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA. EDIFICIO A, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:



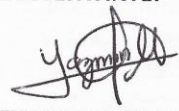
Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández

SUPERVISOR TECNICO:



Bióloga Olivia Alicia Reynoso Ducoing

SUSTENTANTE:



Yazmin Mompala García

ii. INDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	7
I.1. ANTECEDENTES	7
<i>El citoesqueleto</i>	12
I.2. MARCO TEÓRICO	14
<i>Anexinas</i>	14
<i>Vimentina</i>	15
I.3. JUSTIFICACIÓN	17
II. HIPÓTESIS	19
III. OBJETIVOS	19
III.1. OBJETIVO GENERAL	19
III.2. OBJETIVOS PARTICULARES	19
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	21
IV.1. <i>Diagrama de flujo general</i>	21
IV.2. <i>Modelo de infección experimental en ratones BALB/c</i>	22
IV.3. <i>Obtención de cisticercos de T. crassiceps cepa ORF</i>	22
IV.4. <i>Obtención de extractos de T. crassiceps</i>	22
IV.5. <i>Separación electroforética (SDS-PAGE)</i>	23
IV.6. <i>Inmunoelectrotransferencia</i>	24
IV.7. <i>Inclusión de cisticercos y criocortes</i>	25
IV.8. <i>Inmunohistoquímica</i>	26
<i>Inmunodetección de anexina.</i>	26
<i>Inmunodetección de vimentina</i>	26
<i>Inmunodetección de actina filamentosa</i>	27
IV.9. <i>Reconstrucción tridimensional (3D) y visualización</i>	28
IV.10. <i>Análisis bioinformático</i>	29
V. RESULTADOS	31
V.1. INMUNOQUÍMICA	31
V.1.1 <i>Separación electroforética de extractos de T.crassiceps.</i>	31
V.1.2. <i>Inmunoelectrotransferencia</i>	32
V.1.2.1. <i>Identificación de anexina</i>	32
V.2. INMUNOHISTOQUÍMICA	34
V.2.1. <i>Detección de anexina</i>	34
V.2.1.1 <i>Microscopia de epifluorescencia</i>	34

V.2.1.2 Microscopia confocal	36
V.2.2. <i>Detección de vimentina</i>	42
V.2.2.1 Microscopia de epifluorescencia	42
V.2.2.2 Microscopia confocal	44
V.3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	45
VI. DISCUSIÓN	47
VI.1. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANEXINA	49
VI.2. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VIMENTINA	53
VII. CONCLUSIONES	56
VIII. PERSPECTIVAS	57
IX. REFERENCIAS.....	58

iii. INDICE DE FIGURAS Y VIDEO

Figura 1. . Pared vesicular de cisticerco de <i>T.crassiceps</i> cepa ORF	7
Figura 2. . Pared vesicular de cisticerco de <i>T.crassiceps</i> cepa ORF	8
Figura 3. . Esquema representativo de la composición tisular de cestodos.....	11
Figura 4. . Evaluación electroforética de extractos proteicos de cisticercos.	32
Figura 5. . Evaluación inmunoquímica de extractos de cisticercos.	33
Figura 6. Análisis inmunohistoquímico por microscopia de epifluorescencia de localización de anexina, actina y DNA en cisticerco.	35
Figura 7. Análisis inmunohistoquímico por microscopia confocal de la localización de anexina, actina y DNA en cisticerco.	37
Figura 8. Análisis inmunohistoquímico por microscopia confocal de anexina a nivel de parénquima tisular.	38
Figura 9. Análisis inmunohistoquímico por microscopia confocal de anexina a nivel de parénquima tisular	40
Figura 10. Reconstrucción 3D con programa computacional ImageJ (Panel Superior) y Amira (Panel Inferior). Distribución de anexina en ducto protonefridal y células flama	42
Figura 11. . Análisis inmunohistoquímico por microscopia de epifluorescencia de la localización de vimentina, actina y DNA en cisticerco.	43
Figura 12. Análisis inmunohistoquímico por microscopia confocal de la localización de vimentina, actina y DNA en cisticerco.	44

iv. ABREVIATURAS

AcM	Anticuerpo Monoclonal
AcP	Anticuerpo Policlonal
AcPr	Anticuerpo Primario
AcPx	Anticuerpo Policlonal conjugado a Peroxidasas
AcSec	Anticuerpo Secundario
Actina F	Actina Filamentosa
AF	Alexa Fluor 594 Faloidina
ASB	Albumina Sérica Bovina
ATC	Ácido Tricloroacético
CF	Célula Flama
CG	Capa Germinal
DAB	3-3' Diaminobencidina de tetrahidrocloruro (del inglés: 3-3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride)
DAPI	4',6-Diamidino-2-Fenilindol (del inglés: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole)
DIC	Contraste de Interferencia Diferencial (del inglés Differential Interference Contrast)
DM	Densidad Media
DTT	Ditiotreitol
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (del inglés: Fluorescein Isothiocyanate)
FV	Fluido Vesicular
GelPol	Gel de Poliacrilamida

MC	Microscopia Confocal
MF	Microscopio de Fluorescencia
PM	Pesos Moleculares
PT	Parénquima Tisular
PV	Pared Vesicular
PVDF	Difluoruro de Polivinilideno (del inglés: Polyvinylidene Difluoride)
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico (del inglés: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
SSAF	Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos
T	Tegumento
TA	Temperatura Ambiente

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Antecedentes

Los parásitos de los humanos se clasifican en seis grupos principales, estos incluyen a los protozoarios, nematodos, platelmintos, acantocéfalos, pentastómidos y artrópodos (García,1993). Los platelmintos de la clase Cestoda son parásitos internos obligados de vertebrados y demuestran un amplio rango de asociaciones con los hospederos. La clase cestoda se divide en dos subclases: Cestodaria y Eucestoda (Olson et al., 2001); a esta última subclase pertenece *Taenia crassiceps* organismo utilizado en la presente tesis y el cual es considerado un modelo murino de cisticercosis (Willms & Zurabian, 2010)(Fig.1) producido por cisticercos de *Taenia solium*, que es un cestodo de importancia médica que produce dos enfermedades infecciosas: la cisticercosis y la teniasis. Debido a que la cisticercosis por *T. solium* no es fácil de estudiar, el modelo de cisticercosis por *T. crassiceps* es una opción ideal de estudio.

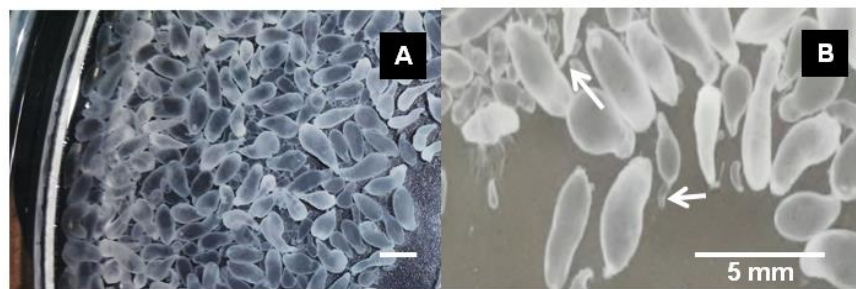


Figura 1. Cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF. Los parásitos recuperados de la cavidad peritoneal de los ratones BALB/c se muestran

como vesículas translúcidas, que en su interior contienen fluido vesicular. (A) Cisticercos recién colectados. (B) Amplificación de la observación de los cisticercos en donde se muestran (cabeza de flecha) sus gemaciones. Las barras de escala corresponden a 5mm.

T. crassiceps, en estado larvario o de cisticerco, es una vesícula ovoide, llena de fluido vesicular que consiste de una capa interna o parénquima celular y una capa externa o tegumento (Fig.2).

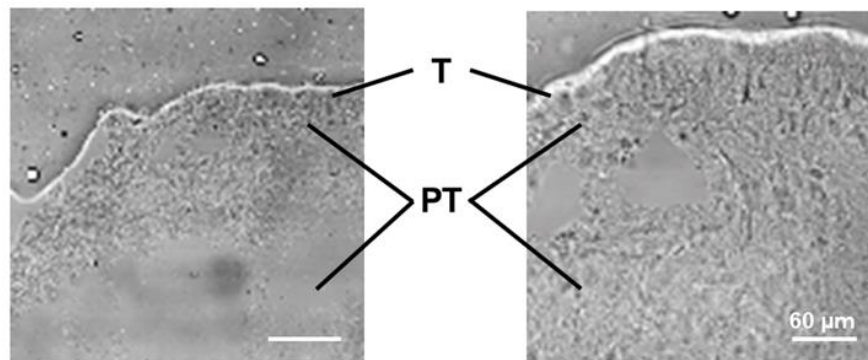


Figura 2. Pared vesicular de cisticerco de *T.crassiceps* cepa ORF. Los cisticercos recuperados como se muestran en la Fig. 1 fueron incluidos en Tissue tek, congelados, segmentados en un criostato (10μm) y observados al microscopio confocal a diferentes aumentos. Los cortes se observaron bajo la técnica de DIC. T=Tegumento, PT= Parénquima Tisular.

En la superficie externa del tegumento (Fig.3), se observan a través de microscopia electrónica de transmisión (con la magnificación de 1,000-250,000 aumentos) la presencia de una membrana plasmática y las proyecciones citoplásmicas llamadas microtricas (o microvellosidades como en el caso de *T. solium*) (Ambrosio et al., 2011) las cuales aumentan la superficie celular de los parásitos y hacen

más eficiente la obtención de nutrientes mediante mecanismos de internalización de micro y macromoléculas (Smyth et al., 1989).

En la membrana basal que da al interior del parásito se conecta una capa muscular en donde se localizan los citones o células subtegumentales, las células flama, los depósitos de glucógeno y de lípidos. Dentro de esta región celular, el tejido y las células están conectados por canales o ductos que corresponden al sistema protonefridial. A su vez, la membrana basal sufre procesos de interdigitación hacia la región celular con lo que se establecen puentes citoplásmicos que comunican al tegumento con las células subtegumentales y a través de los puentes, se realiza el transporte interno de microvesículas.

En la región tegumental localizada entre el espacio de las membranas plasmática y basal, hay una gran cantidad de microvesículas y mitocondrias. Lo cual es una muestra de la gran dinámica que se presenta en la región. El Parénquima tisular, localizado abajo del tegumento, está formado por seis sistemas celulares diferentes (Ramírez-Bon et al., 1982) como:

1. Células subtegumentarias. De núcleos esféricos u ovoides con cromatina, de las cuales nacen extensiones de citoplasma o puentes citoplásmicos que unen al tegumento con ellas. Estas son las

encargadas de elaborar componentes que permiten la constitución de las membranas y el tegumento.

2. Células de almacenaje. Contienen grandes cantidades de glucógeno alfa y gotas de lípidos. Su citoplasma está en contacto con las membranas plasmáticas de otros tipos celulares.

3. Células flama. Se conectan directamente a ductos protonefridiales y así conforman al sistema excretor. Estas células son conformadas por un número variable de cilios ordenados de forma hexagonal los cuales tienen orientación hacia la luz de los ductos colectores. A nivel de microscopia electrónica de transmisión, los cilios están formados por filamentos constituidos por microtúbulos en disposición (9+2) y que es una muestra de la dinámica de este tipo de células (Valverde-Islas et al., 2011).

4. Las células ducto. Se encuentran unidas entre sí y cada una está conectada a tubos colectores diferentes. Los ductos, a los cuales se unen las células ducto y en donde las células flama presentan sus cilios, son túbulos largos y distribuidos en la superficie externa de la pared vesicular.

5. Los miocitones. Son células musculares productoras de fibras. Las cuales se comunican entre ellas a través de puentes citoplásmicos a los grupos de miofibrillas que corren entre la

membrana basal del tegumento, los citones tegumentarios y las células de almacenamiento como se muestra en la Fig.3.

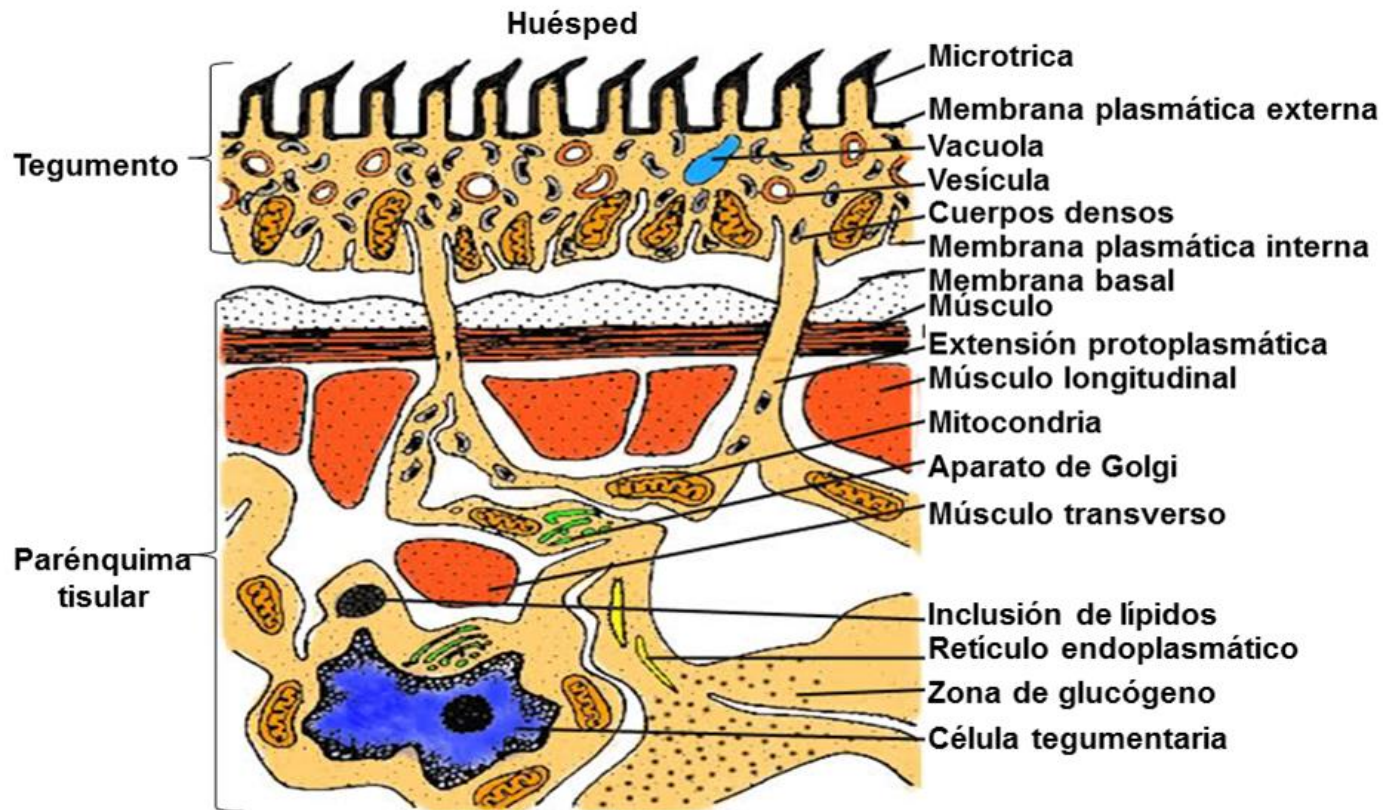


Figura 3. Esquema representativo de la composición tisular de cestodos. La porción más externa del tejido está asociada al tegumento: en donde se observan la presencia de microtricas o microvellosidades y el citoplasma en donde se encuentran embebidos las vesículas, las mitocondrias y vacuolas. Mientras que en el parénquima tisular se observan diferentes tipos de células (subtegumentales, musculares y de glucógeno), así como las extensiones citoplasmáticas que unen a estas células con el tegumento sincicial continuo. El esquema corresponde a una imagen tomada por microscopía electrónica de transmisión a aproximadamente 20,000 aumentos (tomado de <http://biodidac.bio.uottawa.ca/>).

El citoesqueleto

El citoesqueleto en todas las células eucariotas está organizado principalmente por una red de filamentos de proteínas de actina, microtúbulos, filamentos intermedios y, también, se postulan a las septinas (Mostowy & Cossart, 2012). Estas estructuras mantienen funciones importantes ya sea individual o en conjunto proporcionando organización celular, así como transporte intracelular y extracelular, permite la secreción, la locomoción celular y la división celular. Aunque el citoesqueleto en células de mamíferos se ha estudiado mucho, poco se ha investigado en parásitos. Por ejemplo, los filamentos intermedios están implicados en muchas actividades fisiológicas de las células incluyendo la motilidad, la forma, la mecánica, el anclaje de organelos, su distribución; así como en la transducción de señales (Lowery et al., 2015). Pero poco de ello se conoce en otros organismos como los cestodos

Se ha demostrado que las proteínas del citoesqueleto de cestodos pueden ser constitutivas, o bien, formar parte de sus productos de excreción/secreción y ello sugiere que podrían participar en otras funciones biológicas en la relación huésped-parásito que no sólo estén relacionadas con aspectos constitutivos (Moxon et al., 2010). Por ejemplo, de las proteínas identificadas por espectrometría de masas, dentro de extractos proteicos enriquecidos en proteínas del

citoesqueleto, se identificaron varias proteínas que tienen actividades biológicas relacionadas con el metabolismo, la desintoxicación, asociación a actividades lipídicas y ello podría tener relación con las necesidades de dinamismo y plasticidad que requieren este tipo de parásitos (Reynoso-Ducoing et al., 2014). Entre las proteínas identificadas se encontraron a la anexina y la vimentina y, dado que, estas proteínas se consideran importantes para el funcionamiento biológico de los parásitos, ello se consideró un motivo importante para llevar a cabo la caracterización de las mismas en el presente trabajo de tesis como se describe a continuación.

I.2. Marco teórico

Anexinas

Las anexinas son proteínas que pertenecen a una familia multigénica conservada evolutivamente a través de los reinos animal y vegetal. Son proteínas citosólicas solubles, se han detectado en fluidos extracelulares y en las membranas de la superficie celular en donde podrían estar involucradas en la hemostasis y funciones antiinflamatorias. Están asociadas con componentes del citoesqueleto o proteínas que permiten la interacción entre la célula y la matriz extracelular (Moss & Morgan, 2004). En mamíferos, se sabe que la anexina A5 extracelular muestra propiedades anticoagulantes que dependen de Ca^{2+} y que está regulada por la unión a fosfolípidos, los cuales están expuestos en la superficie de células endoteliales o plaquetas activadas. Por lo anterior, en presencia de Ca^{2+} , la anexina se une a fosfolípidos y esto altera los complejos de coagulación activados (Gerke & Moss, 2002). En el caso de parásitos como *T. solium*, se ha demostrado que las anexinas B1 y B2 también tienen propiedades anticoagulantes, ya que inhiben la vía extrínseca de la coagulación sanguínea y la agregación plaquetaria (Wang et al., 2006). Asimismo, se ha demostrado que la anexina B1 de *T. solium* tiene actividad inmunomoduladora, ya que puede disminuir la actividad inflamatoria del hospedero (Gao et al., 2007). Por otra parte, la

anexina de *Schistosoma bovis* se ha demostrado que tiene actividad anticoagulante ya que inhibe la vía de coagulación intrínseca. Por lo tanto, no se puede descartar que la anexina B1 de *T. solium* también tenga algún tipo de actividad inmunomoduladora (de la Torre-Escudero et al., 2012).

Vimentina

La vimentina es una proteína que forma filamentos intermedios de tipo III, es un homopolímero, normalmente expresado en fibroblastos pero también encontrada en células endoteliales, el epitelio cristalino del ojo y las células dendríticas de folículos linfoides en mamíferos. Su estructura se conforma de ocho tetrámeros, que se entrecruzan para formar filamentos que se endurecen de extremo a extremo y con ello constituyen filamentos no polares. Esta estructuración es claramente diferente de la de microtúbulos que normalmente están polarizados, así como de los filamentos de actina. La forma en que este tipo de proteínas se estructura le confiere la propiedad elástica que es mucho más flexible que los filamentos de actina y de los microtúbulos (Lowery et al., 2015). En el caso de los cestodos, se ha demostrado que la distribución de filamentos intermedios en *Ascaris lumbricoides* está restringida a su tejido epitelial de hipodermis, intestino, ovario y testículo (Sato & Kamiya, 2000). Por otro lado, estudios realizados en cultivo de células de *Echinococcus*

granulosus (Rubino et al., 1983) han demostrado como es la distribución de microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios, en este tipo de células.

I.3. Justificación

Debido a que la cisticercosis es causada por el metacestodo o forma larvaria de *T. solium* y afecta a diferentes tejidos tanto del ser humano como del cerdo (músculos esqueléticos, sistema nervioso, ojos, tejido graso subcutáneo y corazón)(Larralde & De Aluja , 2006) y dado que es más difícil estudiar estos parásitos en estos hospederos, para la realización de esta tesis, se utilizó el modelo experimental de cisticercosis murina producida por *T. crassiceps* cepa ORF. Esta parasitosis es considerada como un modelo de estudio de la cisticercosis producida por *T. solium* ya que los cisticercosis se pueden reproducir asexualmente y no logran, pasar al estadio de adultos y se localizan en el peritoneo de los ratones (Willms & Zurabian, 2010). El modelo es muy útil para ser estudiado porque tanto los cisticercos de *T. solium* como los de *T. crassiceps* presentan una alta homología (Sciutto et al., 2011) y su genoma podría tener genes en común como aquellos que codifican para proteínas constitutivas como las del citoesqueleto.

Dado que la cisticercosis humana es una enfermedad importante en países en desarrollo, el conocimiento de la fisiología y biología celular de estos parásitos, favorece la búsqueda y encuentro de blancos proteicos. Ejemplo de ello son los bencimidazoles que inhiben el

metabolismo, transporte de glucosa e inhiben la polimerización de la tubulina en los microtúbulos. Esto se debe a que los bencimidazoles se unen a la β -tubulina y con ello inhiben la polimerización de los microtúbulos (MT) con lo que los parásitos se inmovilizan y mueren (Demeler et al., 2013). Con base a esto, es de esperar que la presencia de filamentos intermedios, como la vimentina, sean vitales para que los parásitos se establezcan exitosamente en su hospedero y sobrevivan.

Por ejemplo, se ha descrito que las anexinas están presentes en varios nematodos y helmintos, tienen diferencias entre ellos y los hospederos, por lo que son blancos potenciales para el desarrollo de fármacos. La información biológica y el conocimiento estructural de las anexinas de mamíferos y plantas, permiten predecir su estructura secundaria y se considera, como un epítipo antigénico específico para la realización de algunas vacunas. Por lo que, en el presente trabajo de tesis, dado que en cisticercos de *T. crassiceps* se desconoce el papel de las anexinas y vimentinas se busca identificarlas inmunoquímicamente y determinar su distribución en los tejidos de cisticercos de *T. crassiceps*

II. HIPÓTESIS

Si las proteínas anexina y vimentina son constitutivas de los tejidos de cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF, es posible identificarlas y determinar su expresión mediante el uso de anticuerpos específicos.

III. OBJETIVOS

III.1. Objetivo general

Caracterizar la expresión tisular de las proteínas anexina y vimentina en cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF por medio de técnicas inmunoquímicas e inmunohistoquímicas.

III.2. Objetivos particulares

Obtener cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF en ratones hembras BALB/c mediante infecciones experimentales.

Determinar la expresión de las proteínas anexina y vimentina mediante electroforesis e inmunoelectrotransferencia en extractos de tejidos de cisticercos de *T. crassiceps*.

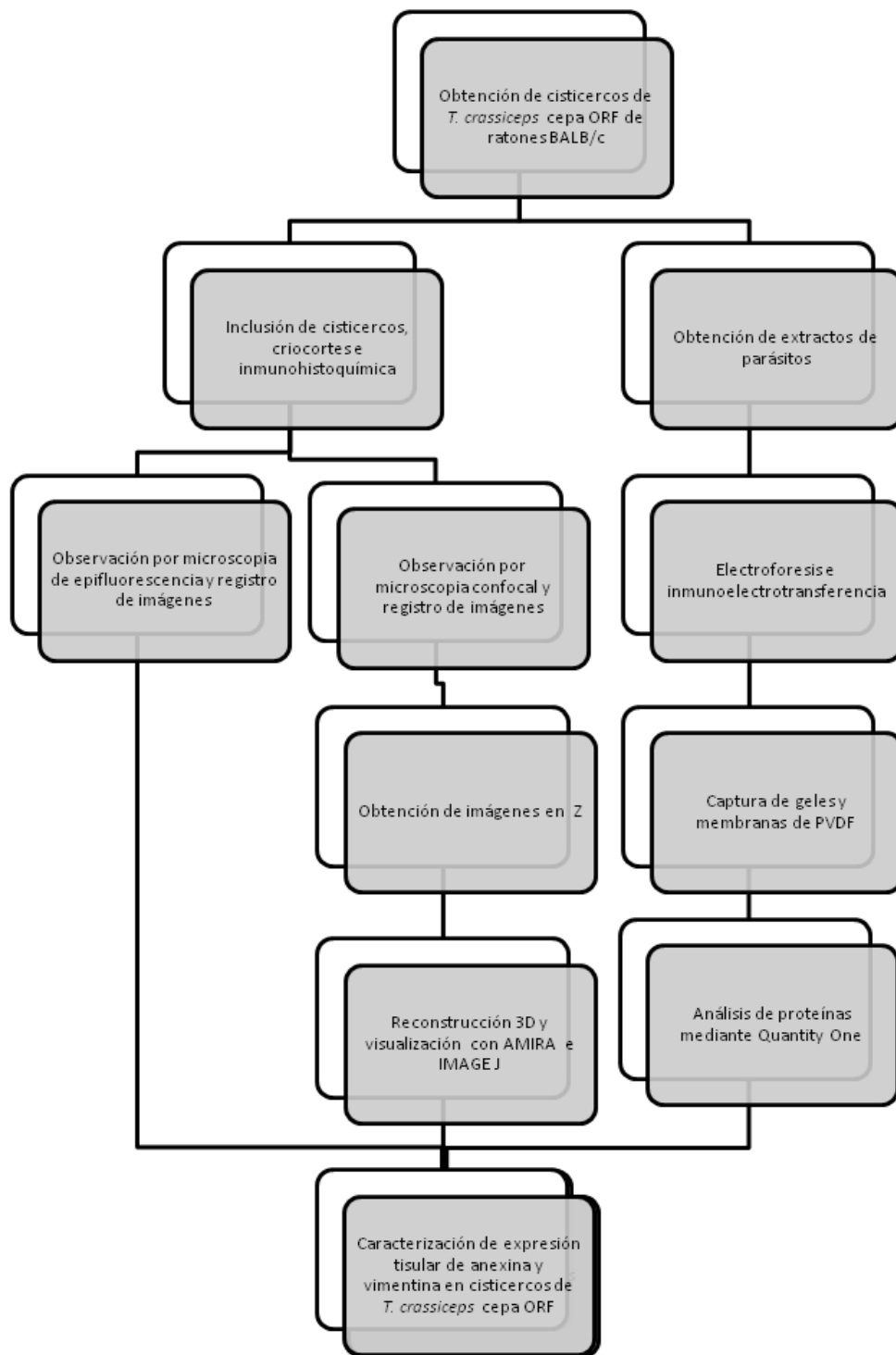
Determinar la distribución tisular por microscopia de fluorescencia de las proteínas anexina y vimentina en criocortes de cisticercos de *T. crassiceps*.

Llevar a cabo la reconstrucción en tercera dimensión de la localización de las proteínas anexina y vimentina obtenidas por

microscopia confocal, para establecer su localización espacial en los tejidos de cisticercos de *T. crassiceps*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Diagrama de flujo general



IV.2. Modelo de infección experimental en ratones BALB/c

Ratones hembras de la cepa BALB/c de cinco semanas de edad, se infectaron por vía intraperitoneal con 15 cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF (por ratón) y las infecciones se mantuvieron por cuatro meses hasta la recuperación de los parásitos. Los animales se sacrificaron de acuerdo a lo autorizado por los comités de investigación y bioética de la Facultad de Medicina de la UNAM (FMED/CI 082-2012).

IV.3. Obtención de cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF

Los animales, previo a la obtención de los parásitos, se sacrificaron por dislocación cervical, luego se recuperaron los cisticercos de su cavidad peritoneal, se lavaron con SSAF para eliminar los restos de tejidos del huésped y se seleccionaron para formar los diferentes grupos de estudio.

IV.4. Obtención de extractos de *T. crassiceps*

Se realizó de acuerdo a lo ya publicado en nuestro grupo de investigación (Reynoso-Ducoing et al., 2014). Para ello, se realizó la selección de cisticercos de *T. crassiceps*, estos se homogenizaron con un homogeneizador (PRO200, Pro Scientific Inc.) posteriormente las suspensiones se sonicaron tres veces a una amplitud de 25 mA con un

sonicador (Vibra-cell 75185, Sonics and Materials Inc.) y se precipitaron con ATC al 10% y DTT 20 mM en acetona absoluta a -20°C. Se centrifugó (9,503 *ges*; 15 min; 4°C). Se eliminó el sobrenadante y adicionó 1ml de solución de DTT 20 mM en acetona (-20°C). Se agitó en vórtex y se centrifugo (9,503 *ges*; 15 min; 4°C). Se quitó el sobrenadante y al botón se le agrego solución A (Fosfato de sodio monobásico 0.2 M, Fosfato de sodio dibásico 0.2 M, pH 7.4) y con inhibidores de proteasas (Complete Protease Inhibitor Cocktail tablets, Roche).

IV.5. Separación electroforética (SDS-PAGE)

La concentración de proteínas en los extractos de cisticercos se llevó a cabo por un método modificado de Lowry mediante el Kit comercial Protein Assay DC (Bio-Rad). Luego, 30 µg de proteína se mezclaron con un volumen equivalente de Buffer de Laemmli (Bio-Rad) y la mezcla resultante se hirvió durante 5 min y se depositaron en los carriles; se usó como control, la actina de músculo de conejo (Worthington). En la electroforesis en GelPol, los reactivos y el gel se prepararon en condiciones reductoras con 2-β mercaptoetanol al 2.5%, en geles de acrilamida/bis-acrilamida al 10% y se separaron las muestras con el sistema comercial (Bio-Rad) a 80 V para concentrar y 120 V para separar, usando una fuente de alimentación Power pac

3000 (Bio-Rad). Se usaron marcadores de PM de amplio rango (Precision Plus Protein Prestained Standards, Bio-Rad). Una vez obtenido el gel se tiñó con azul de Coomassie (Phastgel™ Blue G&E Healthcare) y posteriormente se capturó por medio del fotodocumentador ChemiDoc (BioRad), se analizó con el paquete computacional Quantity One V4.6.9 (Bio-Rad) y se obtuvieron los densitogramas, con los que se evaluó la concentración de proteína por su intensidad, su PM y su movilidad.

IV.6. Inmunoelectrotransferencia

Posterior a la electroforesis, las proteínas de los geles se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore®) mediante una cámara semi húmeda (Immobilion-P Transfer Membrane, BioRad) a 13V durante 35 min en presencia del buffer de transferencia. Una vez que la membrana se transfirió, se dejó secar a TA y se guardó a -20°C hasta su posterior uso.

El inmunoreconocimiento de anexina y vimentina, se hizo con los AcPr's: AcP anti-anexina (1:500) y el AcM comercial anti-vimentina (1:800) (Sigma, V6389). Como AcSec's se utilizaron anti-IgG de conejo (H+L) conjugado a HRP en cabra (Zymed, 81-6520) y anti-IgG de ratón (H+L) conjugado a HRP en cabra (Zymed, 62-6120) respectivamente. Ambos AcSec's se utilizaron a una dilución de 1:

1,000. Para su preparación tanto el AcPr, como el AcSec se diluyeron en solución de bloqueo que contenía ASB al 0.25% en SSAF y Tween 20 (Sigma, P9416) al 0.15%. Los ensayos de inmunoreconocimiento indirecto se hicieron con la incubación de las proteínas absorbidas a las membranas, primero se incubaron con el AcPr (60 min) y luego con AcSec (30 min). La reacción antígeno-anticuerpo fue visualizada utilizando H₂O₂ al 0.01% y DAB (Sigma, D-5637) a 0.5 mg/mL. Todas las reacciones se llevaron a cabo en agitación constante a TA. Como proteína control se usó el AcM comercial anti-actina (1:1000) (Millipore, MAB1501) y como AcSec anti-IgG de ratón.

Posterior a la inmunoelectrotransferencia, las proteínas reveladas se capturaron y analizaron como se describió para los geles teñidos con azul de Coomassie (sección IV.5).

IV.7. Inclusión de cisticercos y criocortes

Obtenidos los cisticercos se lavaron con SSAF fría y en presencia de un baño de hielo, luego en una cápsula BEEM®, se colocaron tres cisticercos, se embebieron en Tissue tek® (Sakura, 4583) y se llevaron a congelación a -20° C. Después, para la obtención de los criocortes (10 µm de espesor) se utilizó el criostato Leica CM1100 ajustado a un rango de temperatura de -20 a -25° C y los criocortes se colocaron en

portaobjetos previamente cubiertos con poli-L-lisina (Biocare Medical, SH1103A) para proporcionar una mejor adhesión de los tejidos.

IV.8. Inmunohistoquímica

Los criocortes se fijaron con acetona fría (-20°C) por 10 min, se lavaron primero con SSAF y posteriormente con SSAF-Tween 20 (Sigma, P9416) al 0.3%. Cada corte se bloqueó durante 60 min a TA con ASB (Sigma, 9048-46-8) al 2% y SSAF-Tween al 0.3%, en una cámara húmeda. Se lavaron las muestras con SSAF y SSAF-Tween 20, se incubó con los AcPr's vimentina o anexina (60 min, TA, cámara húmeda).

Inmunodetección de anexina.

Se utilizó el AcP anti-anexina producido en conejos. Este anticuerpo se generó y caracterizó en el grupo de la Dra. Ana Oleaga (de la Torre-Escudero et al., 2012). Y quien gentilmente hizo donación de los anticuerpos para evaluarlos. El AcP se utilizó como AcPr (1:10) y como AcSec anti-IgG de conejo conjugado a FITC (1:30) (Zymed ,81-6111).

Inmunodetección de vimentina.

Se utilizó el AcM comercial clona V9 1:100 (Sigma, V6389) como AcPr y como AcSec, anti IgG de ratón (1:30) conjugado a FITC (Zymed ,85-6511).

Inmunodetección de actina filamentosa.

Se realizó un marcaje directo con Alexa Flúor 594 Faloidina (1:40) (Invitrogen, A12381).

Para el revelado y montaje de las muestras se incubaron con el AcSec conjugado, bajo condiciones de oscuridad a TA. A su vez, los controles fueron cortes incubados en presencia de AcSec a la misma dilución empleada en los experimentales. Los portaobjetos se lavaron, como se indicó anteriormente y se montaron en una solución comercial Vectashield® (Vector, H-1200) sellándolos con un cubreobjetos y barniz transparente comercial. Se almacenaron a -20°C en oscuridad hasta su análisis en microscopia de epifluorescencia y confocal. Para las observaciones experimentales de los ensayos inmunohistoquímicos, se utilizaron dos microscopios:

1. Microscopio Nikon Eclipse TS100 F equipado con los objetivos Plan Fluor de 10x (A.N 0.25, WD 6.2); 20x (0.50 W- DIC; WD 2.0); 40x (ELWD, 0.60, WD 3.6-2.8, DIC) y con filtros para la observación de fluorescencia UV-2E/C (DAPI), B-2A (fluoresceína) y G-2A (rodamina). Las imágenes se obtuvieron mediante una cámara fotográfica digital Nikon modelo DS-Fi1-U2 y se registraron y guardaron a través de un paquete computacional NIS Elements F V 4.0.

2. Microscopio confocal Leica TCS SP5 equipado con los objetivos 20x (HC PL APO 20x, 0.70, IMM CORR λ BL); 40x (HCX PL APO, 1.25-0.75); 63x (HCX PL APO, 1.40-0.60 λ BL); equipado con los láseres de diodo ultravioleta con frecuencia de 405 nm (DAPI); Argón con una frecuencia de 488 (FITC), HeNe con una frecuencia de 633 nm (TRITC). Las imágenes se registraron a través de un paquete computacional LAS AF Lite, Leica.

Con este microscopio se obtuvieron 35 imágenes de cortes seriales (0.22 mm) en "Z" las cuales se guardaron en formato TIFF para su posterior análisis.

IV.9. Reconstrucción tridimensional (3D) y visualización

Con el objetivo de localizar y determinar su distribución tisular, solo para la proteína anexina presente en tejidos de cisticerco de *T. crassiceps*, se utilizaron dos paquetes computacionales distintos con los cuales se buscó hacer las reconstrucciones 3D:

1. Paquete computacional ImageJ V1.49. Para efectuar reconstrucciones de volumen y de superficie a partir de imágenes seriales en Z (35 series), mediante el accesorio "Volume viewer". Las imágenes obtenidas se guardaron en un formato TIFF, 108 MB.

2. Paquete computacional Amira V5.3.2. Se realizaron reconstrucciones de volumen y de superficie a partir de las imágenes seriales en Z obtenidas (35 series) en el formato LEI (Leica). Se usó la técnica de reconstrucción de la superficie mediante el módulo de "Isosurface". Así como los módulos, "Orthoslice" (muestra secciones ópticas z del microscopio confocal). El valor umbral de las reconstrucciones se asignó en base a las imágenes obtenidas del microscopio confocal (módulo "Orthoslice"). Luego, de estas reconstrucciones, se obtuvieron imágenes, así como animaciones de las observaciones. Las imágenes fueron guardadas en formato JPG, 147 KB. La animación se guardó en formato MPEG.

IV.10. Análisis bioinformático

Con la finalidad de determinar los posibles epítomos reconocidos en anexina y vimentina por los anticuerpos utilizados y, con base a la disposición de los genes respectivos obtenidos del genoma de *T. solium* (asumiendo que trece genes para anexina y un gen para vimentina son semejantes en el genoma de *T. crassiceps*, dado que no hay información relacionada al respecto); se obtuvieron las secuencias de aminoácidos

predichas (<http://www.taeniasolium.unam.mx/taenia/>) . Luego, para identificar en estas proteínas las posibles secuencias de aminoácidos involucradas y tomando como base lo reportado por los fabricantes (De la Torre, 2012) y (Sigma), se consultaron las bases de datos de Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) y GeneDB (<http://www.genedb.org/Homepage>).

Posteriormente dichas secuencias se compararon con las secuencias respectivas de cerdo: vimentina *Sus scrofa* (Q6EEI0_PIG), vimentina *Sus scrofa* P02543 (VIME_PIG), vimentina *Sus scrofa domesticus* (A0A0B8RVD8_PIG), vimentina *Sus scrofa domesticus* (*domestic pig*) (Q3HWE5_PIG), de ratón (*Mus musculus*) (P20152), del cestodo *Echinococcus granulosus* (EgG_000496600genedb) y del trematodo *Schistosoma mansoni* (Smp_07445800) para el caso de anexina.

V. RESULTADOS

V.1. Inmunoquímica

V.1.1 Separación electroforética de extractos de *T.crassiceps*.

Con la finalidad de detectar todas las proteínas que pudieran estar presentes en los extractos, se llevaron las muestras a una separación electroforética en GelPol, bajo condiciones reductoras y posterior tinción con azul de Coomassie (Fig.4). Con la idea de encontrar la mejor concentración de proteínas para su separación electroforética se analizaron diferentes concentraciones de proteína (10, 15, 20, 25, 30,35 ,40 μg) como se muestra en la Fig.4A. Debido a que a 30 μg de proteína (carril 4 de la Fig. 4A) se evidenciaron mejor las diferentes proteínas involucradas en el extracto, se llevó a cabo una electroforesis preparativa a esta concentración bajo condiciones reductoras. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas PVDF. Con la finalidad de evaluar la calidad de la transferencia el gel resultante se tiño con azul de Coomassie y las proteínas no transferidas se revelaron como se muestra en la Fig. 4B. Como se observa las proteínas que no se transfirieron, estuvieron localizadas en el intervalo de 250 a 150 KDa.

V.1.2. Inmunoelectrotransferencia

V.1.2.1. Identificación de anexina

La identificación de anexina en los extractos de parásitos se logró como se muestra en Fig.5: El AcP anti-anexina, que reconoce anexinas de *S. mansoni*, *S. bovis*, B1 y B2 de *T. solium*, reacciono con seis bandas (68.54, 47.87, 39.42, 37.29, 34.25, 24.64 KDa) de los extractos de *T. crassiceps* (carril 5, Fig.5A). Las proteínas reconocidas con mayor intensidad, se localizaron en los PM 68.54, 37.29 y 34.25. Como se muestra en la Fig.5B, con la finalidad de visualizar mejor la reactividad de los anticuerpos frente a las proteínas, las membranas se sometieron a un análisis densitométrico tanto para vimentina (Fig.5B) como para anexina (Fig.5C).

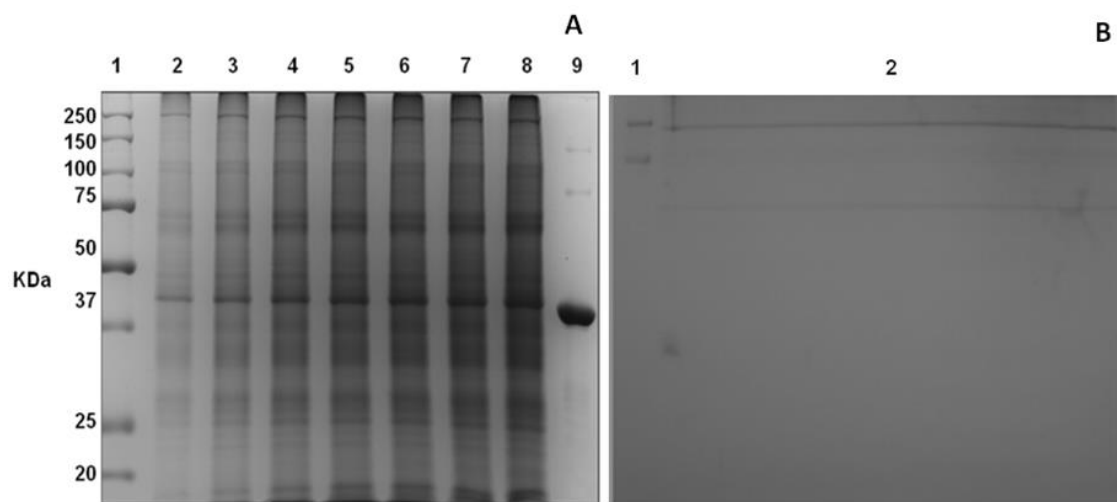


Figura 4. Evaluación electroforética de extractos proteicos de cisticercos. Separaciones electroforéticas en geles de poliacrilamida al 10%, bajo condiciones reductoras y posterior tinción con azul de Coomassie. A. Comparación de diferentes concentraciones: Marcadores de PM de amplio rango (Carril 1). Extractos parasitarios (Carriles 2-8; concentraciones de 10, 15, 20, 25, 30,35 ,40 µg); Actina comercial de

músculo de conejo (Carril 9, 4 μ l). B. Separación por electroforesis preparativa. Marcadores de PM (Carril 1). Extracto parasitario (Carril 2; 300 μ g).

V.1.2.2. Identificación de vimentina

La identificación de vimentina en los extractos de parásito se muestra en Fig.5: El AcM anti-vimentina, que reconoce vimentina de células de mamíferos, reaccionó con tres bandas (52.83, 45.65 y 25.55 KDa). Las cuales son distintas a las reconocidas por los anticuerpos: anti-anexina (carril 3) y anti-actina C4 (carril 4).

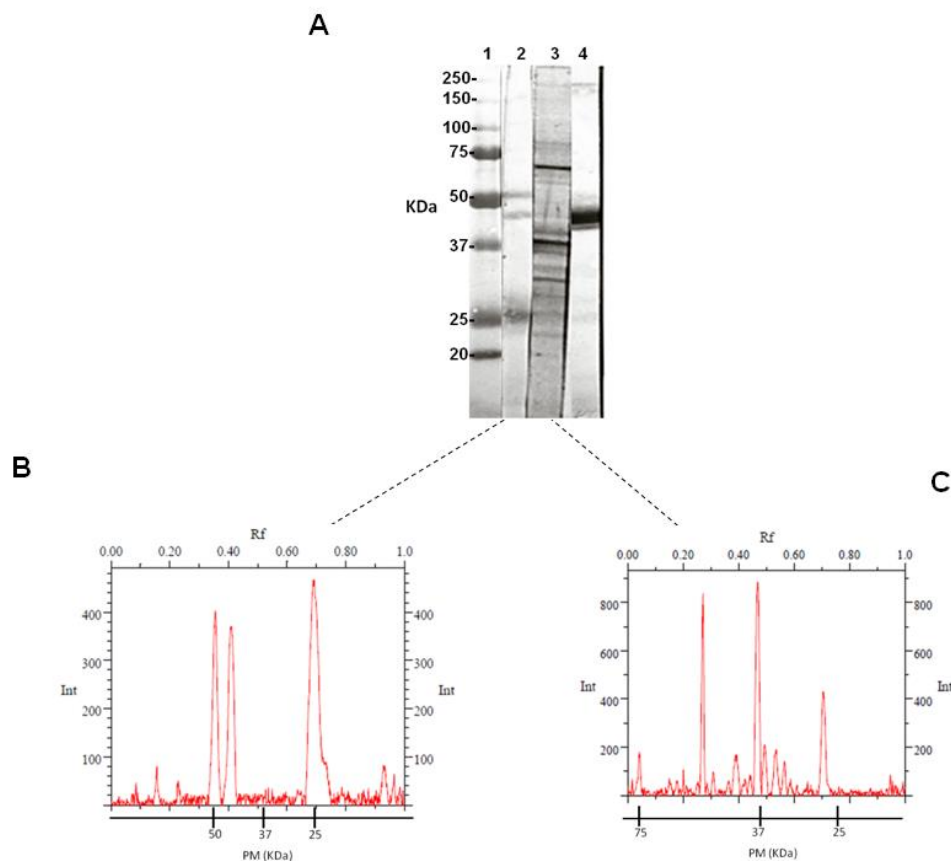


Figura 5. Evaluación inmunoquímica de extractos de cisticercos. Posterior a su separación electroforética, las proteínas (30 μ g/carril) se electrotransfirieron a membranas de PVDF. A: El revelado de las proteínas se hizo mediante AcM anti-vimentina (Carril 2; 1:800) y anti-

actina (Carril 4; 1:1000), AcP anti-anexina (Carril 3; 1:500). Como AcSec's se utilizaron anti-IgG de ratón (1:1000) y anti-IgG de conejo (1:1000) respectivamente. El revelado se realizó en presencia de H₂O₂ y DAB. Se realizó un análisis densitométrico de la vimentina (B) y anexina (C). En las imágenes B y C se muestra la separación electroforética como valores de Rf en el eje de las abscisas, mientras que el eje de las ordenadas se muestra la intensidad (Int) de las fracciones detectadas en intensidad de los pixeles. A su vez, en la parte inferior de la gráfica se muestra el intervalo de PM en KDa.

V.2. Inmunohistoquímica

V.2.1. Detección de anexina

V.2.1.1 Microscopia de epifluorescencia

Con base a lo que se observa en la Fig.6 en los cortes de los cisticercos, la inmunolocalización de anexina (fluorescencia verde), se presentó principalmente al nivel del tegumento por encima de la capa germinal del tejido parasitario (núcleos de células visualizados por DAPI en color azul) y otras zonas lejanas como las correspondientes a las células flama. Estas células se distinguen por que se revelaron por la distribución de actina F (fluorescencia roja). Aparentemente, la distribución tisular de anexina es de localización superficial, a lo largo y ancho de la PV. En ausencia del anticuerpo anti-anexina no se detectó reactividad alguna en los tejidos parasitarios.

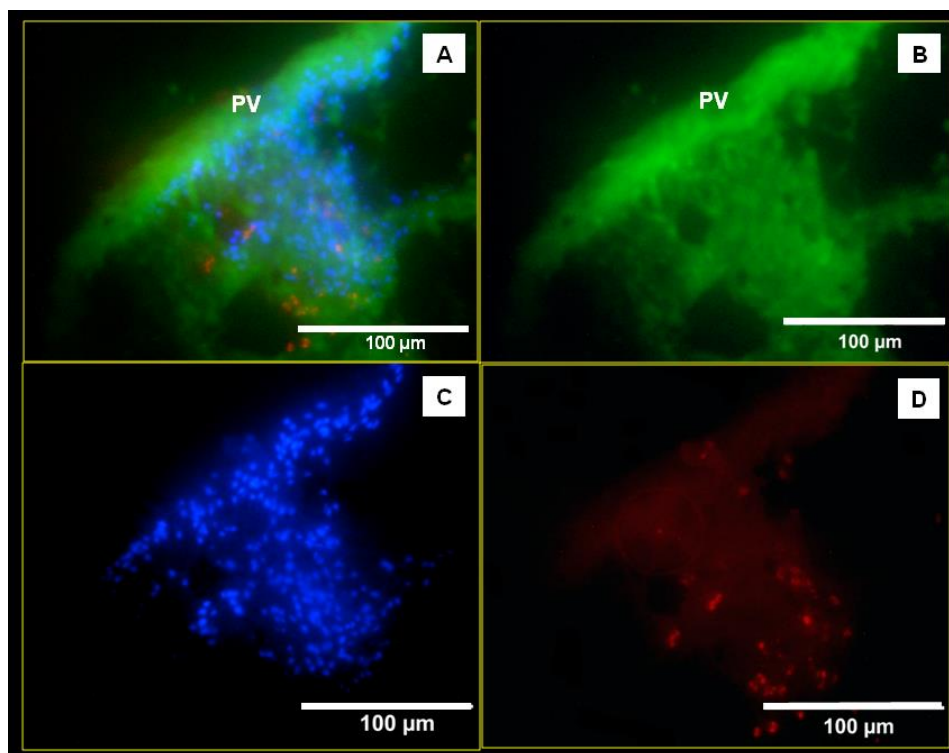
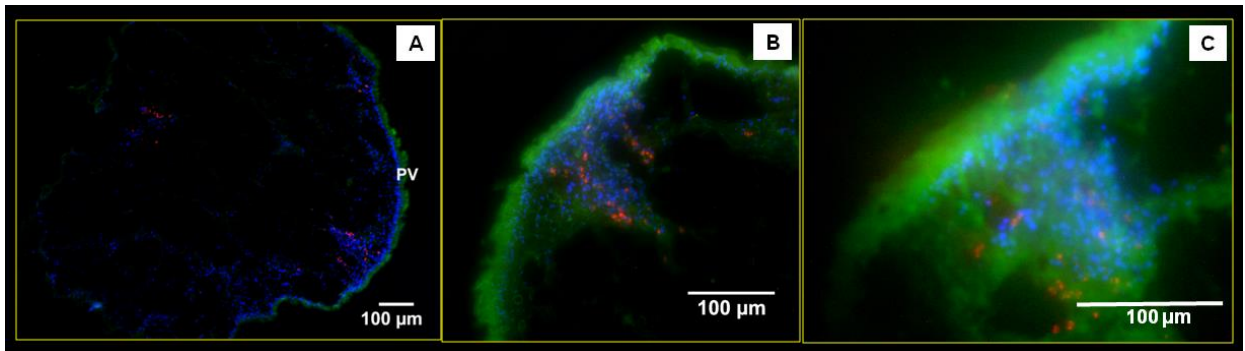


Figura 6. Análisis inmunohistoquímico por microscopia de epifluorescencia de localización de anexina, actina y DNA en cisticerco. Reactividad del AcP anti-anexina conjugado a FITC (verde), Alexa Flúor 594 Faloidina que reconoce a actina F (rojo) y DAPI que reacciona con el DNA nuclear (azul). Pared Vesicular: PV. Panel Superior: Las imágenes se obtuvieron a aumento 10x, 20x, 40x. A: actina F; B: DNA nuclear; C: anexina y D: todas. Panel Inferior: Imágenes a 20x; A: todas, B: anexina; C: DNA nuclear, D: Actina F.

V.2.1.2 Microscopia confocal

La localización tisular de anexina, mediante microscopia confocal, se mostró con un patrón semejante de marcaje fluorescente (Fig. 7) a lo observado mediante microscopia de epifluorescencia. Sin embargo, es con este tipo de microscopia con lo que se logró una mejor definición del marcaje fluorescente en las diferentes estructuras celulares de los parásitos.

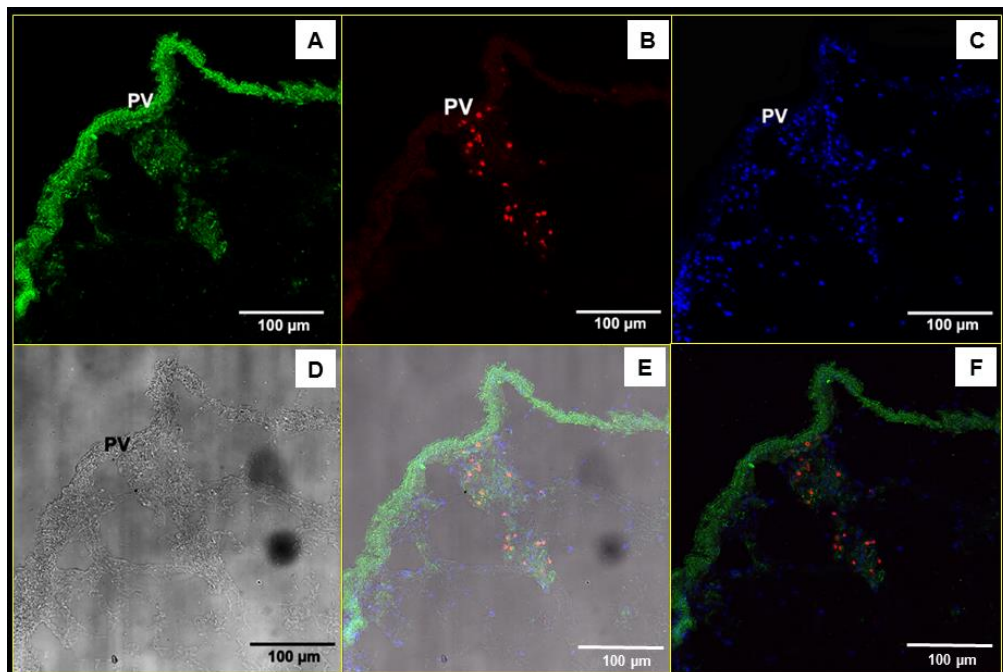
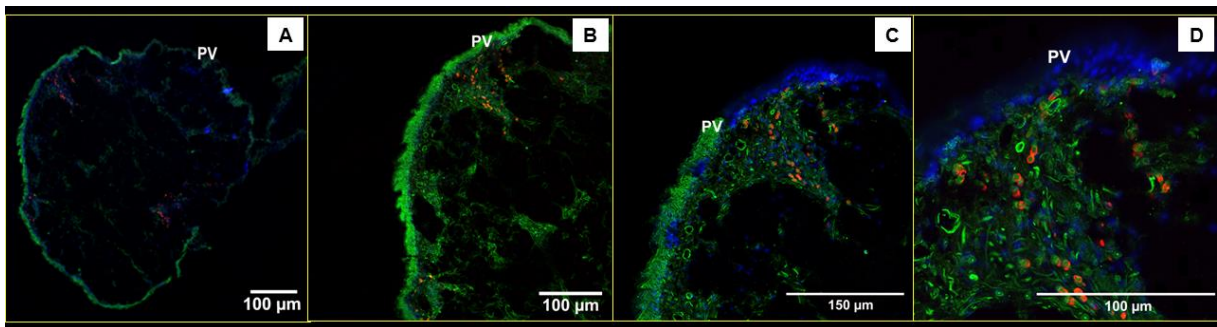


Figura 7. Análisis inmunohistoquímico por microscopia confocal de la localización de anexina, actina y DNA en cisticerco. Reactividad del AcP anti-anexina conjugado a FITC (verde), AF 594 que reconoce a actina F (rojo) y DAPI que reacciona con el DNA nuclear (azul). Panel superior: Imágenes a aumentos 10x (A), 20x (B), 40x(C) y 63x (D). Panel inferior: Imágenes a 20x; A: anexina, B: actina F; C: DNA nuclear, D: DIC, E: todas y F: anexina, actina F y DNA nuclear.

Como se observa en el panel superior, de menor a mayor aumento, el marcaje fluorescente estuvo localizado principalmente a nivel de tegumento y se concentró, principalmente, a nivel de zona germinal en los ductos protonefridiales y las células flama (imágenes A y B). En la imagen A (mismo panel superior), el marcaje fluorescente con actina F (fluorescencia roja) se asoció al marcaje de las células flama: en estas células, la anexina está localizada en las zonas ciliares de las células flama, mientras que la actina se encuentra en forma de anillo (como también se puede observar en la Fig.8).

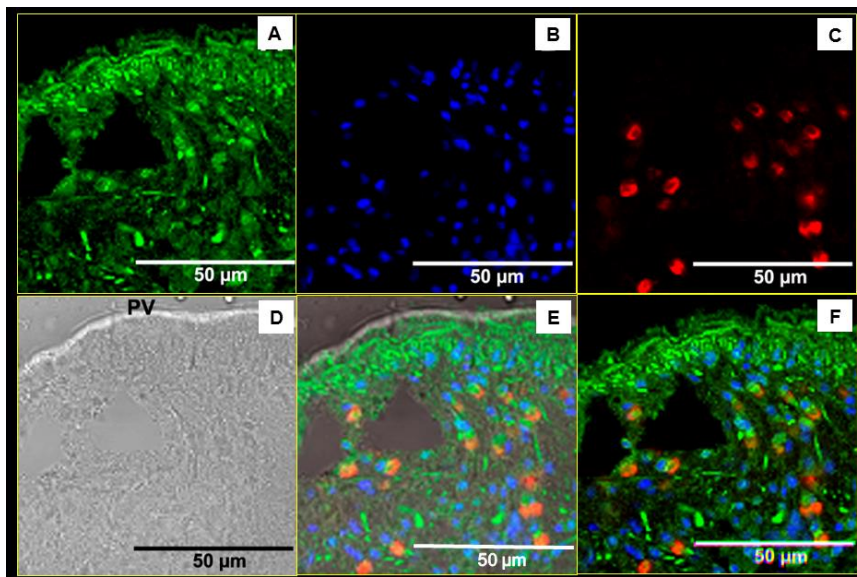
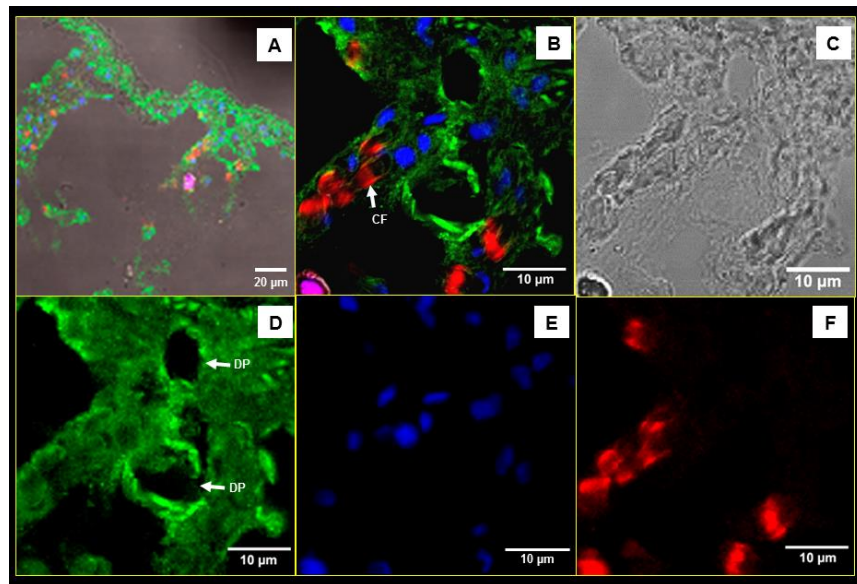
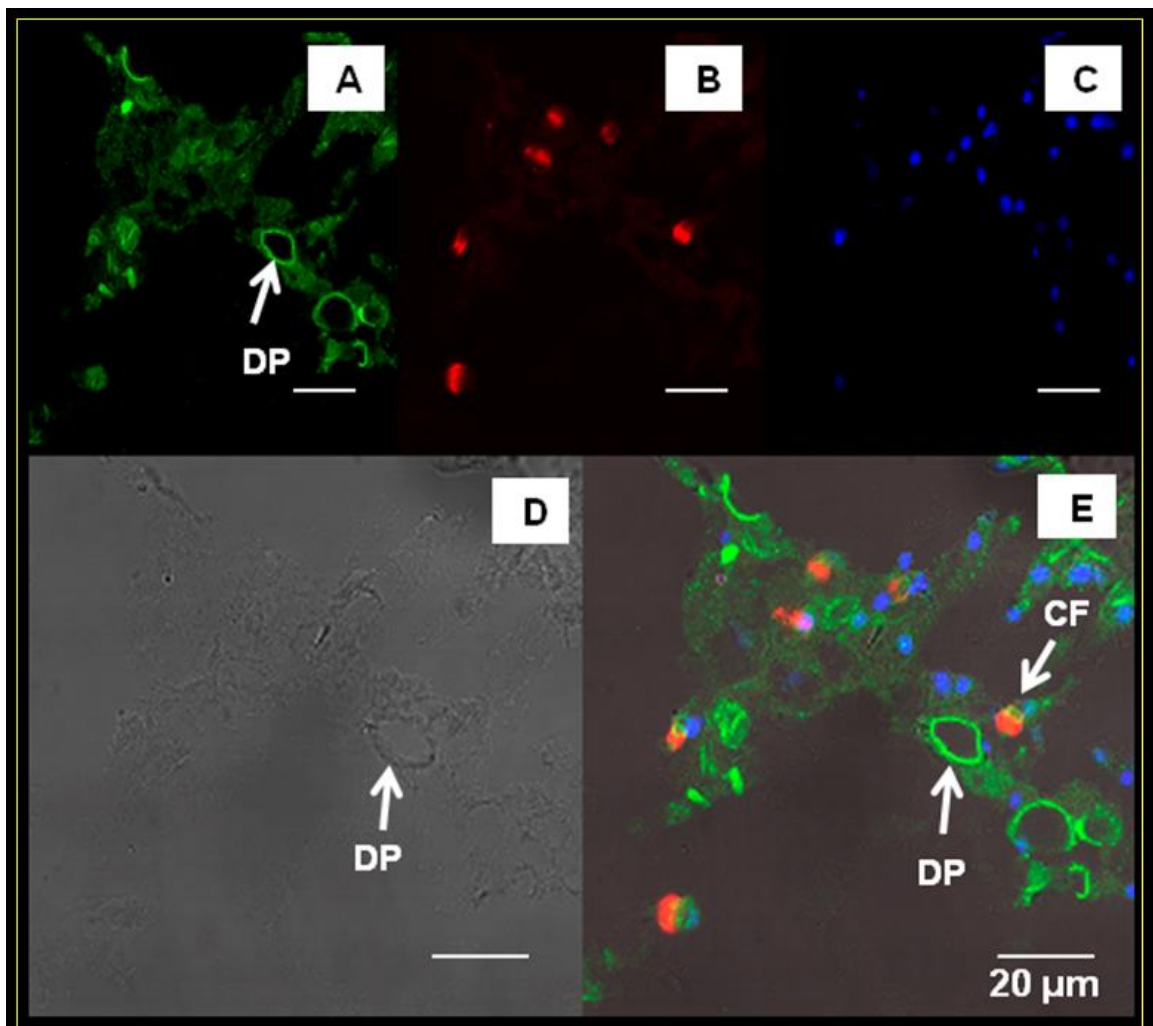


Figura 8. Análisis inmunohistoquímico por microscopia confocal de anexina a nivel de parénquima tisular. Reactividad del AcP anti-anexina conjugado a FITC (verde), AF 594 que reconoce a actina F (rojo) y DAPI que reacciona con el DNA nuclear (azul). Panel superior: Imágenes a aumentos 63x; A: nivel subtegumentario, B: acercamiento de la imagen A, C: DIC, D: anexina, E: DNA nuclear y F: actina F. Panel inferior: Imágenes a 40x; A: anexina, B: DNA nuclear; C: actina F, D: DIC, E: todas y F: anexina, DNA nuclear y actina F.

A mayor aumento (40x) (Fig.8, Panel inferior) se hizo más evidente y destaco mejor la distribución de la anexina en los tejidos de los parásitos, así como el marcaje de las células flama, las cuales se observan completas en los tejidos de los parásitos mediante DIC (Fig. 9, Panel superior, Fig. D) o su combinación con fluorescencia (Fig. 9, panel inferior). Las células flama y los ductos protonefridiales, a aumentos de 40x y 63x, claramente están asociadas y la anexina se encontró localizada y concentrada en la luz de tales ductos.



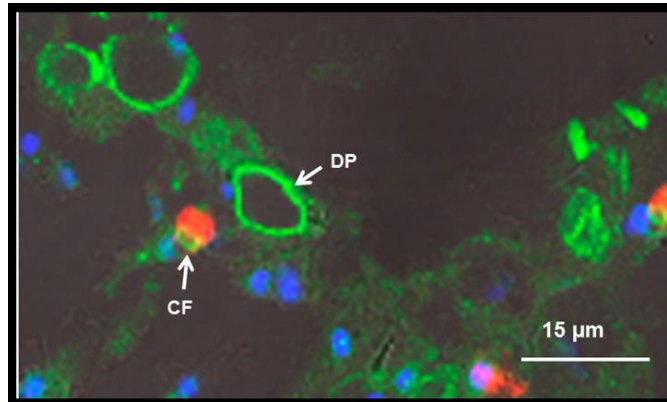


Figura 9. Análisis inmunohistoquímico por microscopía confocal de anexina a nivel de parénquima tisular. Las observaciones se enfocaron al nivel del sistema protonefridial. Reactividad del AcP anti-anexina conjugado a FITC (verde), AF 594 que reconoce a actina F (rojo) y DAPI que reacciona con el DNA nuclear (azul). Panel superior: Imágenes a aumentos 63x. A: nivel subtegumentario, B: actina F, C: DNA nuclear, D: DIC; E: todas. Panel inferior: acercamiento de la imagen E. DP: Ducto Protonefridial. CF: Célula Flama.

V.2.1.3 Reconstrucción 3D y Visualización.

Ya con la localización de la anexina en los tejidos de los parásitos y, con la finalidad de tener una mejor visualización de la distribución, en ductos protonefridiales y células flama; las imágenes en "Z" obtenidas por microscopía confocal se procesaron mediante los paquetes computacionales ImageJ y Amira y se observaron por la visualización 3D. Como se observa en las imágenes de la Fig. 10, hay una alta concentración de anexina en la luz interna de los ductos, esto al grado de que el marcaje con anexina define la estructura interna de los ductos (Fig. 10, panel inferior). En el caso de la actina su localización es distinta y se visualizó como un anillo (en color rojo) y el núcleo (en color

azul) de la célula flama. De esta reconstrucción se generó un video en el cual se puede observar el ducto protonefridial (en verde) y la luz interna de este ducto (Video 1).

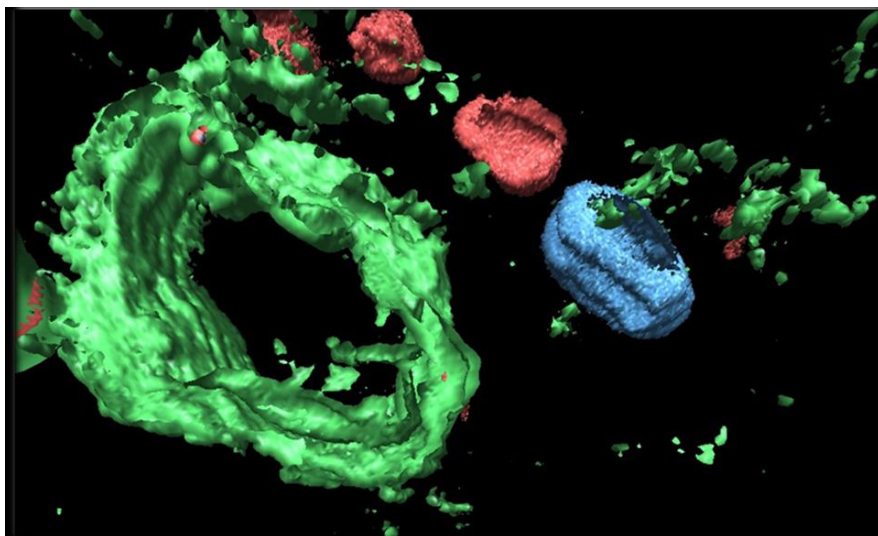
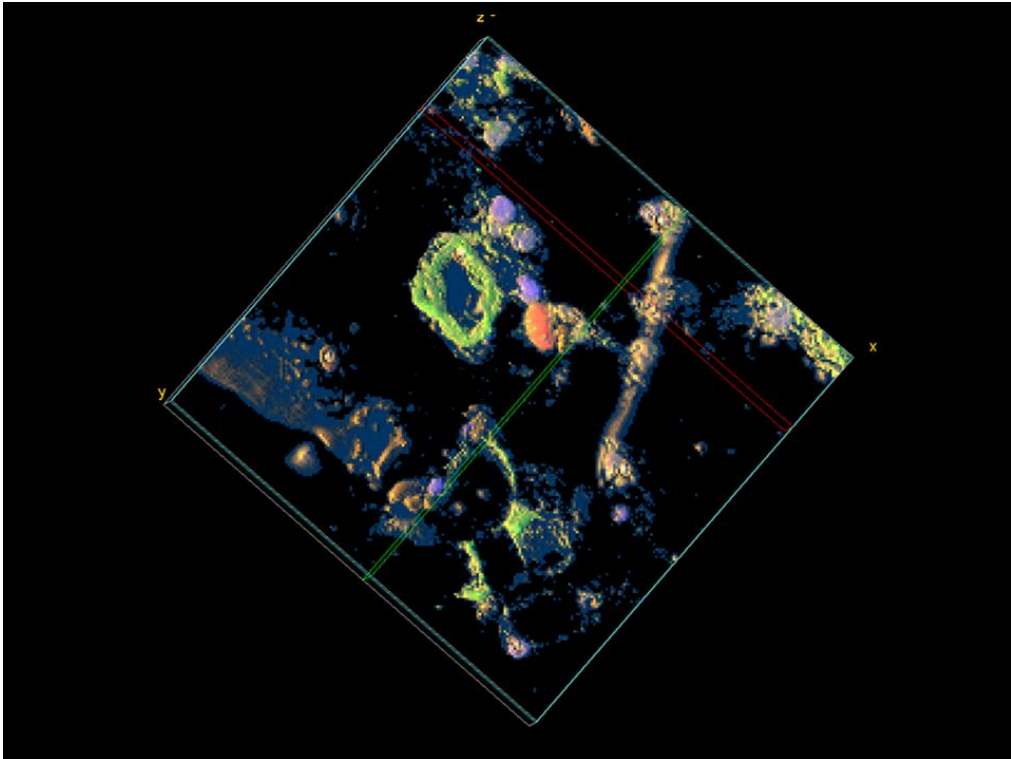


Figura 10. Reconstrucción 3D con programa computacional ImageJ (Panel Superior) y Amira (Panel Inferior). Distribución de anexina en ducto protonefridial y células flama. Con base a las imágenes obtenidas en z del panel inferior de la figura 9, se mantuvieron los colores originales: AcP anti-anexina (verde), actina F (rojo), DNA nuclear (azul). Panel superior: ducto protonefridial (verde), anillo de actina F de célula flama (rojo) y DNA nuclear (azul). Panel inferior: Reconstrucción del ducto protonefridial a mayor aumento, anillos de actina F de células flama y DNA nuclear (azul).

V.2.2. Detección de vimentina

V.2.2.1 Microscopia de epifluorescencia

La localización tisular de la vimentina, mediante epifluorescencia, en los criocortes de los cisticercos se encontró asociada a la superficie de los parásitos (Fig.11). La fluorescencia más intensa se encontró asociada a lo largo del tegumento y, aparentemente, algo de marcaje fluorescente se encontró a nivel de la capa germinal (Fig. 11, panel superior e inferior, en C y B respectivamente). Aunque la intensidad de la fluorescencia se sitúa en el tegumento, hay zonas con mayor intensidad por lo que la distribución no es uniforme (Panel superior, Fig.11, C). En los controles no hubo marcaje fluorescente. Además de la inmunolocalización de los tejidos y con la finalidad de localizar otras estructuras celulares se usó DAPI para marcar DNA nuclear ya que este compuesto se intercala en el DNA emitiendo una fluorescencia de color azul y AF para marcar actina F en color rojo. Una gran cantidad de células reveladas por DAPI se visualizan en color azul y algunas de ellas

están asociadas con el marcaje de actina F (fluorescencia roja). Como se observa en el panel superior en la imagen B, y el panel inferior en las imágenes A y D. El marcaje de los núcleos por DAPI y de actina F por AF mostro que es semejante a lo observado luego del marcaje con anexina.

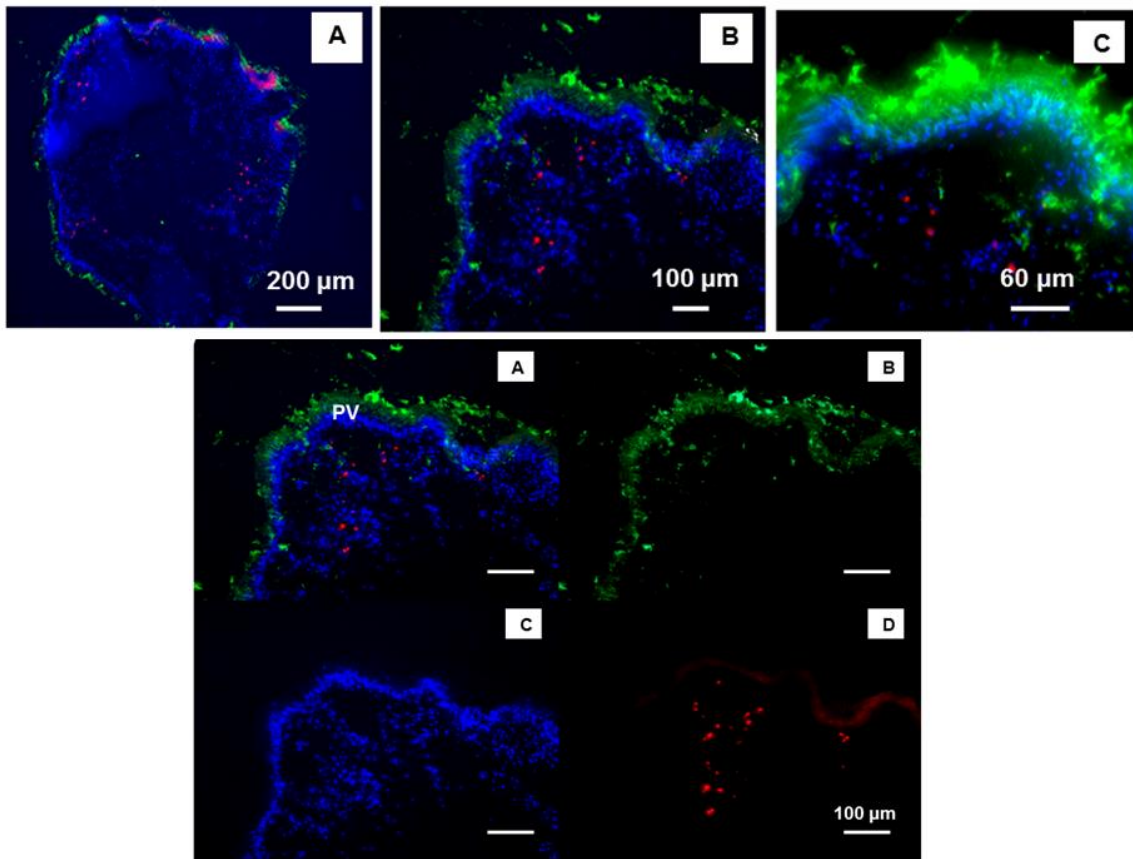


Figura 11. Análisis inmunohistoquímico por microscopia de epifluorescencia de la localización de vimentina, actina y DNA en cisticerco. Reactividad del AcM anti-vimentina conjugado a FITC (verde), Alexa Fluor 594 Faloidina que reconoce a actina F (rojo) y DAPI que reacciona con el DNA nuclear (azul). Panel superior: las imágenes se obtuvieron a aumentos 10x(A), 20X (B) y 40X(C). Panel inferior las imágenes se obtuvieron a 20x.

V.2.2.2 Microscopia confocal

En el caso de las imágenes obtenidas por microscopia confocal, al igual que con el microscopio de epifluorescencia, se hicieron observaciones en la PV (Fig.12) a diferentes aumentos (10x, 20x y 40x). A mayor aumento, la distribución en el tegumento de la vimentina (Fig.12 B y C) presentó un patrón regular de estructuras fibrosas cortas, con una orientación que se distribuyó desde la membrana basal hasta la membrana apical del tegumento y que se presentó otorgando volumen al tegumento. A nivel de estructuras de la capa germinal se encontró que el marcaje es escaso (Fig.12.C), pero no se encontró asociado a las células flama las cuales se identificaron por los anillos de actina (fluorescencia roja) y los núcleos teñidos por DAPI (fluorescencia azul).

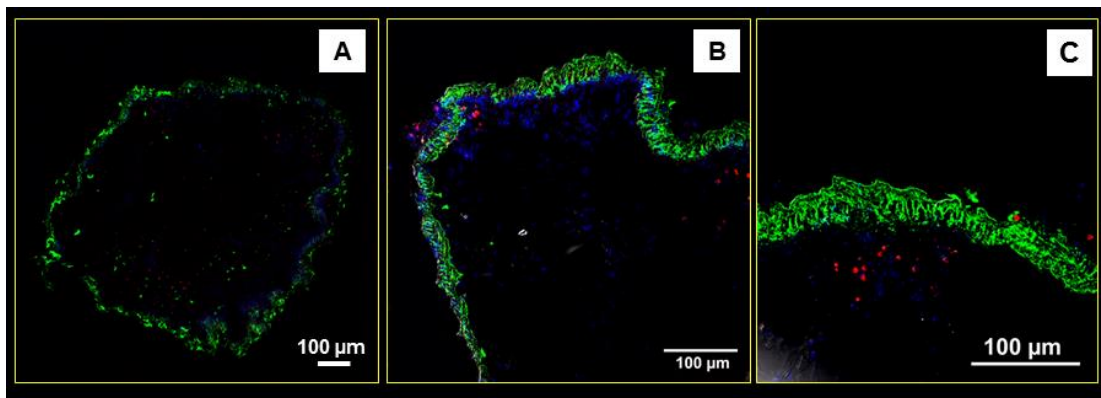


Figura 12. Análisis inmunohistoquímico por microscopia confocal de la localización de vimentina, actina y DNA en cisticerco. Reactividad del AcM anti-vimentina conjugado a FITC (verde), Alexa Fluor 594 Faloidina que reconoce a actina F (rojo) y DAPI que reacciona con el DNA nuclear (azul). Pared Vesicular: PV. Las imágenes se obtuvieron por a aumentos 10x(A), 20X (B) y 40X(C).

V.3. Análisis bioinformático

Para conocer los posibles epítomos que reconocen los anticuerpos anti-anexina y anti-vimentina, se realizaron alineamientos de secuencias tomadas del genoma de *T. solium* considerando la similitud entre este parásito y *T. crassiceps* (de la cual su genoma no ha sido secuenciado) y se dedujeron las secuencias de aminoácidos para estas proteínas.

Las secuencias de anexina B1 (TsM_000745800) y B2 (TsM_000024300), encontradas en *T. solium*, se compararon con las de anexina B1 de *S. mansoni* (Smp_07445800) (debido a que el genoma de *S. bovis* no se encuentra secuenciado) mediante un alineamiento; esto se hizo debido a que el anticuerpo utilizado para el reconocimiento de anexinas se obtuvo utilizando la secuencia de anexina de *S. bovis*. Por lo que, según la comparación, la secuencia de anexina B1 de *S. mansoni* (Smp_07445800) tiene una identidad del 44.76% con anexina B1 de *T. solium*. Mientras que, en el caso de anexina B1 de *S. mansoni* y anexina B2 de *T. solium*, se encontró que tenían una identidad del 34.48%.

En el caso de la proteína vimentina se compararon las secuencias de aminoácidos de diferentes especies de cerdos (debido a que el AcM producido en ratón, se usó como inmunógeno vimentina purificada de ojo de lente de cerdo) y, en este caso, no se encontraron regiones de

aminoácidos que coincidieran con la secuencia de vimentina para *T. solium*. Pero, al ser comparadas las diferentes especies de cerdo con la secuencia de vimentina de ratón (P20152), si se encontraron secuencias muy similares que varían por pocos aminoácidos. Pero no hubo aminoácidos comparables en el caso de *E. granulosus* (EgG_000496600genedb) o de otros cestodos, con la secuencia de aminoácidos de vimentina de mamíferos. Mientras que la comparación de la secuencia de aminoácidos entre los cestodos *E. granulosus* y *T. solium* si hubo aminoácidos continuos similares.

VI. DISCUSIÓN

Con base a las 19 proteínas identificadas en el proteoma del citoesqueleto (Reynoso-Ducoing et al., 2014) que se hizo para los cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF (Willms & Zurabian, 2010), se consideró necesario el ampliar y mejorar el conocimiento y caracterización de algunas proteínas identificadas, sobre todo de aquellas consideradas como proteínas no clásicas del citoesqueleto, ya que hasta el momento se han estudiado en estos parásitos a la actina (Ambrosio et al., 2003), miosina tipo II (Ambrosio et al., 1997) y tubulina (Valverde-Islas et al., 2011). Luego, gracias a la donación de anticuerpos policlonales anti-anexina del trematodo *S. bovis* (de la Torre-Escudero et al., 2012), con la posibilidad de sumarle análisis bioinformático de las proteínas codificadas por los genes respectivos a partir del genoma de *T. solium* (Tsai et al., 2013), en conjunto con lo hecho para *S. bovis*; se consideró la factibilidad de caracterizar a la anexina en los cisticercos de *T. crassiceps*. De la misma manera, al contar con anticuerpos monoclonales comerciales anti-vimentina y con la posibilidad de iniciar la caracterización de esta proteína en cisticercos de *T. crassiceps*, se decidió también abordar la identificación y caracterización de dichas proteínas. Se consideró que la anexina y

vimentina podrían ser estudiadas por inferencias a partir de análisis bioinformático relacionados con el genoma de *T. solium* ya que no existe al momento alguna base de datos del genoma de *T. crassiceps*. Sin embargo, estos cisticercos de *T. crassiceps* son considerados como modelo de cisticercos de *T. solium* y se considera que los respectivos genes de las proteínas que se estudian en el presente proyecto de tesis podrían tener una composición semejante. Por lo tanto, las proteínas codificadas podrían tener secuencias de aminoácidos semejantes y los anticuerpos, producidos para las mismas proteínas en otros modelos, podrían tener reconocimiento de epítomos semejantes en la anexina y vimentina de cisticercos de *T. crassiceps*. Por lo que, con el reconocimiento que presentaron los anticuerpos se llevó a cabo la identificación y localización de las proteínas. Los resultados obtenidos hasta el momento cotejan con lo que se sabe de estas proteínas: la anexina es una proteína que se encuentra asociada al citoesqueleto (Moss & Morgan, 2004) y se ha detectado en el proteoma del citoesqueleto de *T. crassiceps* de la cepa ORF (Reynoso-Ducoing et al., 2014), mientras que, la vimentina es una proteína perteneciente al grupo de filamentos intermedios (Lowery et al., 2015), la cual se ha encontrado asociada también al citoesqueleto (Sato & Kamiya, 2000). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran, por vez primera, como se da la expresión y distribución tisular de las proteínas

anexina y vimentina en los tejidos de cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF.

VI.1. Identificación y caracterización de anexina

Los anticuerpos contra anexina del trematodo *S. bovis* reconocieron posibles anexinas de cisticercos de *T. crassiceps*, como se muestra en la Fig.5. Las bandas se localizaron con diferentes pesos moleculares como: 68.5, 47.9, 39.4, 37.3, 34.2, 24.6 KDa. La razón del reconocimiento de varias bandas podría deberse a varios factores:

1. Los anticuerpos utilizados, aunque específicos para anexina de *S. bovis*, son policlonales y podrían estar reconociendo epítomos semejantes en proteínas distintas a la anexina.
2. Según los análisis de los genes contenidos en el genoma de *T. solium*, algunas variantes de la anexina (13) podrían estar siendo reconocidas en los cisticercos de *T. crassiceps* lo cual aún es una suposición por el desconocimiento del genoma de este parásito.
3. Los anticuerpos reconocieron preferentemente a tres bandas (68.5, 37.3 y 34.2 kDa), lo que según reportado al respecto (de la Torre-Escudero et al., 2012), estas proteínas reconocidas podrían corresponder a la de semejante PM reconocida en *S. bovis* que se sabe corresponde a una banda de aproximadamente 37 KDa.

En lo referente a su localización tisular, el análisis de microscopía de epifluorescencia mostró que los anticuerpos anti-anexina reconocen a la proteína en la superficie de los cisticercos de *T. crassiceps* Fig.8.

Esto es semejante a lo descrito para lo reconocido por los mismos anticuerpos en las fases de esquistosomula y de parásito adulto de *S. bovis* (de la Torre-Escudero et al., 2012). Tanto la detección de la proteína en los extractos parasitarios, como la determinación de su localización en los tejidos de los cisticercos (Fig. 5) podría asociarse con su función (Gao et al., 2007); la anexina se encuentra en la superficie de los parásitos con la finalidad de inhibir la función de la fosfolipasa A2, como se ha demostrado en ensayos *in vitro* en mamíferos, con lo que se argumenta que de esta forma podría favorecer la disminución de la respuesta inflamatoria que monte el huésped durante las infecciones. Durante la caracterización de las anexinas B1 y B2 en *T. solium* se ha postulado que la elevada distribución de anexina en el tegumento de PV de los cisticercos su función podría tener relación con su actividad anticoagulante (Wang et al., 2006). A través de la microscopia confocal se mejoró la definición de la distribución del marcaje fluorescente asociado a la anexina y se reconocieron mejor las diferentes estructuras celulares de los cisticercos que se encuentran asociadas con presencia de anexina. En las células flama, según lo observado, la distribución de actina y anexina se presentan de forma

semejante al patrón característico de distribución para actina F y α -tubulina en estas células con base a lo publicado para cisticercos de *T. crassiceps* (Reynoso-Ducoing et al., 2014) y para los de *T. solium* (Valverde-Islas et al., 2011). A su vez, las observaciones mediante microscopia de epifluorescencia y confocal mostraron que hay anexina en los cilios de las células flama y en la periferia de la luz central de los ductos protonefridiales (Fig. 9). Ello podría tener una asociación con la posible secreción de anexina por parte de estos parásitos, pero ello tendría que ser demostrado. Además del marcaje que se encontró en estas partes del tejido parasitario, por primera vez, se encontró anexina en ductos protonefridiales (Fig. 9) y lo cual podría cotejar una vez con la posible secreción de anexina. También por lo descrito para la actividad biológica de la anexina existe la posibilidad de que en estos sitios la proteína tenga una función relevante en la biología de los cisticercos de *T. crassiceps*, tal como lo descrito por (Hofmann et al., 2010) donde sugiere que anexina tiene un papel biológico en el tránsito vesicular (endocitosis y/o exocitosis). Se ha postulado que los cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF tienen una dinámica importante en la internalización de proteínas del hospedero mediante eventos de endocitosis (Ambrosio et al., 1994), además existe una dependencia de esos movimientos por la participación de las proteínas del citoesqueleto (Reynoso-Ducoing et al., 2014) (Márquez-Navarro et al., 2013). Sin

embargo, empleando la estrategia de reconstrucción 3D empleada para la caracterización de las células flama de los cisticercos de *T. solium* (Valverde-Islas et al., 2011), se logró reconstruir lo marcado fluorescentemente y con ello observar que la anexina detectada en los ductos protonefridiales de los cisticercos de *T. crassiceps* presentan una alta concentración en la luz interna de los ductos y que ello, incluso, permite definir exactamente el contorno de la estructura interna de tales ductos (Fig. 10. Panel inferior).

Con la idea de buscar un sustento que apoye el hecho de que los anticuerpos policlonales anti-anexina reconozcan a variantes de anexina mediante la base de datos GenDB y se encontró que en el genoma de *T. solium* hay trece secuencias de genes correspondientes a anexinas. Es interesante que a pesar de hacer el análisis para el genoma de *T. solium*, por lo menos para dos anexinas; una localizada en los 38.6 kDa (correspondiente a Anexina B1) y otra en los 40.6 kDa (correspondiente a Anexina B2) son semejantes a las encontradas por inmunquímica en las membranas de PVDF con las proteínas transferidas. Aún más, con base a lo que se ha caracterizado respecto al sitio reconocimiento de los anticuerpos en la Anexina de *S. bovis*, estos anticuerpos según lo obtenido durante su caracterización *in silico* reconocen una secuencia de aminoácidos KGLGT y que está localizada en el dominio central de la

anexina (de la Torre-Escudero et al., 2012) y que es semejante a lo encontrado para la Anexina B1 ya mencionada.

VI.2. Identificación y caracterización de vimentina

Como se muestra en la Fig.5A, en el carril 2, varias bandas se reconocieron con el anticuerpo anti- vimentina. La localizada en los 25 KDa podría corresponder a lo deducido a partir del genoma de *T. solium* (TsM_0000091600); la cual coincide a una proteína de PM semejante. Mientras que, las otras dos bandas de mayor PM (45.6 y 52.8 KDa), podrían ser otras proteínas con sitios de reconocimiento para el anticuerpo monoclonal que tengan una secuencia de aminoácidos semejante a la de vimentina. Otra posibilidad podría ser que, para estas proteínas, pudieran corresponder a otras variantes de vimentina que no se han reportado, no estén los identificados en el genoma de *T. solium*; lo cual implicaría que *T. crassiceps* exprese vimentinas propias. En este sentido, podría cobrar relevancia lo publicado por Sato & Kamiya, quienes demostraron dos bandas con PM aparente de 64 y 71 KDa reconocidos con el AcM HUSM-9 de mamífero anti-vimentina, y los cuales no reconocieron ninguna proteína en platelmintos. Sin embargo, es necesario continuar con la búsqueda de la expresión definida de vimentina en cisticercos de *T. crassiceps*. Pero con anticuerpos específicos.

En lo referente a la inmunolocalización de la vimentina en los tejidos de los cisticercos, se encontró mediante microscopia de epifluorescencia que la localización de la vimentina esta hacia la superficie de los cisticercos (Fig.11. panel superior). Aunque, como se observa en la figura 11, en el panel inferior, la vimentina podría estar localizada principalmente en lo largo y ancho del tegumento. Lo cual es similar a lo ya publicado para el mismo parásito (Sato & Kamiya, 2000). Con mayores aumentos, con el uso de la microscopia confocal (Fig. 12), se encontró que la vimentina presenta un patrón irregular de estructuras fibrosas cortas distribuidas a lo largo y ancho del tegumento. Sin embargo, para definir la distribución real de dichas fibras y conocer más de su morfología, sería necesario el evaluar la expresión de las proteínas mediante microscopia electrónica de transmisión a través de ensayos de inmuno-oro.

En lo referente al análisis bioinformático que se realizó para comparar la secuencia de aminoácidos de vimentinas, y que arrojó que hay diferencias entre las secuencias de los cerdos, con las de *T. solium*; también se encontraron diferencias entre los cestodos de *E. granulosus* y *T. solium*. A pesar de tales diferencias es bien sabido que para su organización estructural, los filamentos intermedios presentan regiones en donde su dominio central está altamente conservado y caracteriza a las superfamilias de los filamentos intermedios. Mientras que los

dominios terminales helicoidales de las vimentinas no son muy variables y pueden estar en un mismo filamento intermedio (Lowery et al., 2015). Por lo que, cabría la posibilidad que la reactividad del AcM anti-vimentina utilizado en la presente tesis, estuviera asociada al reconocimiento de tal dominio central (Sato & Kamiya, 2000) dentro de la vimentina de los cisticercos de *T. crassiceps*. Con la finalidad de definir el sitio exacto del reconocimiento involucrado en la vimentina de los cisticercos de *T. crassiceps*, tendría que generarse la preparación de anticuerpos monoclonales contra esta proteína en estos parásitos.

VII. CONCLUSIONES

- El AcP anti-anexina producido en *S. bovis* reconoció principalmente tres bandas, en extractos parasitarios de *T. crassiceps*, así como en los tejidos del mismo parásito. Tal reconocimiento se dio tanto en el tegumento como en zona germinal, a nivel de ductos protonefridiales y las células flama.

- El AcM anti-vimentina comercial, reconoció principalmente tres bandas, en extractos parasitarios de *T. crassiceps*, así como en los tejidos de los cisticercos del mismo parásito.

VIII. PERSPECTIVAS

El conocimiento de la distribución de las proteínas anexina y vimentina podría tener relevancia para el desarrollo de compuestos con potencial cestocida o a su vez para ser modelos para la búsqueda de sitios blanco de fármacos. Por lo que también se puede llevar a cabo un análisis proteómico para la caracterización anexina y vimentina para evaluar el efecto de fármacos en la expresión de proteínas. Además de realizar la evaluación del efecto de fármacos o sustancias que actúen sobre anexina y vimentina mediante ensayos *in vitro*.

IX. REFERENCIAS

- Ambrosio J., et.al, 1994. Protein Uptake by Cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Archives of Medical Research*. 25 (3): 325-330.
- Ambrosio, J. et al., 1997. Identification and partial characterization of a myosin-like protein from cysticerci and adults of *Taenia solium* using a monoclonal antibody. *Parasitology*, 114 (Pt 6, pp.545–553.
- Ambrosio, J.R. et al., 2003. Actin expression in *Taenia solium* cysticerci (cestoda): Tisular distribution and detection of isoforms. *Cell Biology International*, 27, pp.727–733.
- Ambrosio, J.R. et al., 2011. Observaciones al Microscopio Electrónico de Barrido del Interior de un Proglótido de un Parásito Adulto de *Taenia solium* Scanning Electron Microscopy Observations of the Cross-Section of a *Taenia solium* Adult Tapeworm **. *Int. J. Morphol*, 29(1), pp.127–132.
- Demeler, J. et al., 2013. Phylogenetic Characterization of β -Tubulins and Development of Pyrosequencing Assays for Benzimidazole Resistance in Cattle Nematodes. *PLoS ONE*.
- Gao, Y.-J. et al., 2007. Annexin B1 at the host-parasite interface of the *Taenia solium* cysticercus: Secreted and associated with inflammatory reaction. *Acta tropica*, 101(3), pp.192–9. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X07000484> [Accessed January 14, 2016].
- Garcia, L., 1993. Classification of Human Parasites Updated (from Garcia, L.S. (1993) Classification of Human Parasites, Vectors, and Similar Organisms. , pp.614–615.
- Hofmann, A. et al., Prospects & Overviews Parasite annexins – New molecules with potential for drug and vaccine development.
- de la Torre-Escudero, E. et al., 2012. Molecular and functional characterization of a *Schistosoma bovis* annexin: fibrinolytic and anticoagulant activity. *Veterinary parasitology*, 184(1), pp.25–36. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401711005589> [Accessed May 6, 2015].
- Larralde, C. & Aluja, A.S. De, 2007. Cisticercosis: Guía para Profesionales de la Salud Editor's Note *Journal of Parasitology*, 93(4), pp.975–976.
- Lowery, J. et al., 2015. Intermediate Filaments Play a Pivotal Role in Regulating Cell Architecture and Function. *Journal of Biological*

-
- Chemistry*, 290(28), pp.17145–17153. Available at:
<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.R115.640359>.
- Márquez-Navarro, A. et al., 2013. RCB20, an experimental benzimidazole derivative, affects tubulin expression and induces gross anatomical changes in *Taenia crassiceps* cysticerci. *Parasitology Research*, 112, pp.2215–2226.
- Moss, S.E. & Morgan, R.O., 2004. The annexins. *Genome biology*, 5(4), p.219.
- Mostowy, S. & Cossart, P., 2012. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(3), pp.183–94. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3284>.
- Moxon, J. V et al., 2010. Proteomic analysis of embryonic *Fasciola hepatica*: characterization and antigenic potential of a developmentally regulated heat shock protein. *Veterinary parasitology*, 169(1-2), pp.62–75. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401709007547> [Accessed February 17, 2016].
- Reynoso-Ducoing, O. et al., 2014. Analysis of the expression of cytoskeletal proteins of *Taenia crassiceps* ORF strain cysticerci (Cestoda). *Parasitology Research*, 113(5), pp.1955–1969.
- Sato, H. & Kamiya, H., 2000. Immunofluorescent localization of intermediate filaments (IFs) in helminths using anti-mammalian IFs monoclonal antibody. *The Journal of parasitology*, 86(4), pp.711–715.
- Sciutto, E., Fragoso, G. & Larralde, C., *Taenia crassiceps* as a model for *Taenia solium* and the S3Pvac vaccine.
- Valverde-Islas, L.E. et al., 2011. Visualization and 3D reconstruction of flame cells of *Taenia solium* (cestoda). *PloS one*.
- Wang, K. et al., 2006. Molecular characterization and anticoagulant activity of a novel annexin derived from the *Taenia solium*. *Acta tropica*, 99(2-3), pp.165–72. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X06001409> [Accessed January 14, 2016].
- Willms, K. & Zurabian, R., 2010. *Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models. *Parasitology*, 137(3), pp.335–346.