

15



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN.

---

" IDENTIFICACIÓN DE ISOFORMAS DE ACTINA EN CISTICERCOS DE  
*Taenia solium.* "

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
P R E S E N T A :  
**DAVID CORREA PIÑA**

Asesor: MIBB Javier R. Ambrosio Hernández

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2000

284187



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



REPUBLICA NACIONAL  
MEXICA  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Identificación de isoformas de actina en cisticercos de Taenia solium"

que presenta el pasante: DAVID CORREA PIÑA  
con número de cuenta: 9109171-8 para obtener el TITULO de.  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

A T E N T A M E N T E.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 21 de Octubre de 199 9.

PRESIDENTE	MVZ. Pablo Martínez Labat	<u>Pablo Martínez Labat 10/XI/99</u>
VOCAL	MVZ. Angel Martínez Sosa	<u>Angel Martínez Sosa 25/XI/99</u>
SECRETARIO	MIBB. Javier Ambrosio Hernández	<u>J. Ambrosio Hernández</u>
PRIMER SUPLENTE	Q.F.B. Gabriela Escalante Reynoso	<u>G. Escalante Reynoso 25/XI/99</u>
SEGUNDO SUPLENTE	MVZ. Gabriela Fuentes Cervantes	<u>G. Fuentes Cervantes 25/XI/99</u>

## AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a mis padres la oportunidad que me dieron de estudiar una carrera, para ellos el mayor de los agradecimientos por ser quienes me educaron para ser lo que hasta ahora soy. Mamá y papá, los quiero, admiro y respeto con todo el corazón.

Agradezco a mis hermanos por ser mis mejores amigos y maestros, compañeros de juegos y de estudios. Gracias por enseñarme un poco de lo que *cada uno sabe* y por ayudarme siempre en cada momento que los he necesitado. Gracias por todo Lety, Julio, Vero, Angie, Gus y Lalis.

A mis sobrinos, que son una alegría constante de todos los días y espero saber guiarlos como mis hermanos hicieron conmigo.

A mis cuñados por ser buenos amigos y por los apoyos recibidos.

A mis amigos y compañeros de la 21 ava. QFB, en especial a Víctor por acompañarme en la consecución de esta meta.

A mis compañeros de laboratorio por su amistad y consejos brindados: Ana Paola, Armando, Cecilia, Elizabeth, Guille, Hugo, Janet, Joel, Laura Aguilar, Laura González, Lydia, Mayra, Olivia, Odelia, Pablo y a la Dra. Rabiela.

A la Dra. Alma Lilian Guerrero por su asesoría en las técnicas de cromatografía de afinidad y electroforesis bidimensional.

Al Dr. Javier Ambrosio por el tiempo dedicado a la discusión y desarrollo de esta tesis, por sus consejos e indicaciones.

A la Dra. Ana Flisser por la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación.

*Al personal de la Facultad de Medicina por las facilidades prestadas.*

A mis sinodales por la atención prestada para la revisión de esta tesis.

A los profesores que contribuyeron a mi formación.

El presente trabajo de tesis fue desarrollado en el laboratorio de la Dra. Ana Flisser del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM; bajo la dirección del Dr. Javier Ambrosio, la asesoría técnica de la Biól. Olivia Reynoso Ducoing, y con el apoyo económico de los proyectos PAPIIT (DGAPA) IN200297 y Comunidad Europea de Naciones CI1-CT940081.

## ÍNDICE GENERAL

	pág.
Abreviaturas.	iv
Índice de figuras.	vi
Resumen	vii
Introducción.	viii
<b>I. Marco Teórico.</b>	<b>1</b>
1. <i>Taenia solium</i> .	1
1.1. Enfermedades parasitarias	1
1.1.1. Teniosis.	1
1.1.2. Cisticercosis.	2
1.2. El parásito.	3
1.2.1. Taxonomía.	3
1.2.2. Morfología.	4
1.2.2.1. Parásito adulto o tenia.	4
1.2.2.2. Metacéstodo o cisticerco.	5
1.2.2.3. Huevo.	6
1.2.3. Ciclo Biológico.	7
2. Citoesqueleto.	8
2.1. Miosina	8
2.2. Actina.	9
2.2.1. Estructura.	9
2.2.2. Función.	13
2.2.3. Isoformas.	13
2.2.4. Purificación.	15
2.2.4.1. Métodos.	15
2.2.4.2. Evaluación.	16
2.3. Citoesqueleto en céstodos	17
2.3.1. Miosina.	17
2.3.2. Actina.	17

---

<b>II. Objetivos.</b>	19
<b>III. Hipótesis.</b>	19
<b>IV. Materiales y Métodos.</b>	20
1. Obtención de parásitos.	20
2. Preparación de extracto crudo.	20
3. Purificación de actina de cisticercos.	21
3.1. Obtención de miofilamentos.	21
3.2. Cromatografía en columna.	22
3.2.1. Cromatografía por exclusión molecular en Sepharosa CL-4B.	22
3.2.1.1. Preparación.	22
3.2.1.2. Calibración.	22
3.2.1.3. Elución.	23
3.2.2. Cromatografía de afinidad a DNasa I.	23
3.2.2.1. Preparación.	23
3.2.2.2. Elución.	24
4. Evaluación de actina de cisticercos.	25
4.1. Electroforesis unidimensional.	25
4.2. Electroforesis bidimensional.	26
4.3. Análisis inmunoenzimáticos.	27
4.3.1. Ensayo en placa o ELISA.	27
4.3.2. Inmunoelectrotransferencia.	28
4.3.3. Inmunopunto.	29
<b>V. Resultados.</b>	
1. Obtención de miofilamentos.	30
2. Cromatografía por exclusión molecular en Sepharosa CL-4B.	32
3. Cromatografía de afinidad a DNasa I.	35
4. Electroforesis bidimensional.	40
4.1. Extracto crudo.	40
4.2. Miofilamentos.	42
4.3. Actina purificada.	44



---

<b>VI. Discusión de Resultados.</b>	45
1. Purificación de actina.	45
2. Electroforesis bidimensional de actina.	50
3. Comparación de la secuencia aminoterminal de actinas.	55
<b>VII. Conclusiones.</b>	60
<b>VIII. Perspectivas.</b>	61
<b>IX. Apéndices.</b>	62
1. Precipitación de proteínas.	62
2. Electroforesis en geles de poliacrilamida.	63
2.1. Electroforesis unidimensional.	63
2.1.1. Preparación de geles y corrimiento electroforético.	63
2.2. Electroforesis bidimensional.	65
2.2.1. Soluciones para la primera dimensión.	65
2.2.2. Preparación y corrimiento del gel de la primera dimensión.	66
2.2.3. Preparación y corrimiento del gel de la segunda dimensión.	67
3. Protocolos para tinción de proteínas en geles de poliacrilamida.	68
3.1. Tinción con nitrato de plata.	68
3.2. Tinción inversa con zinc-imidazol.	68
3.3. Tinción con Azul de Coomassie.	69
3.4. Tinción con Rojo de Ponceau S.	70
4. Determinación de proteínas por el micrométodo colorimétrico de Bradford.	71
4.1. Curva de calibración.	71
4.2. Determinación de la concentración en muestras problema.	71
<b>X. Referencias hemerobibliográficas.</b>	72

---

**ABREVIATURAS.**

AcM	Anticuerpo monoclonal
AcM 4B3	Anticuerpo monoclonal 4B3 con especificidad para miosina de <i>Taenia solium</i> .
ASB	Albúmina sérica bovina
ATP	Adenosina trifosfato
DAB	Tetrahidrocloruro de 3,3' diaminobencidina
DEAE	Dietilaminoetil
DNasa I	Desoxirribonucleasa I
DSS	Dodecil sulfato de sodio
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
EGTA	Ácido etilenglicol bis( $\beta$ aminoetiléter) N,N,N',N' tetraacético
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en placa (del inglés: Enzyme linked immunosorbent assay)
IET	Inmunoelectrotransferencia
IgG	Inmunoglobulina G
NP-40	Nonidet P-40
OFD	Orto fenilendiamina
pI	Punto isoeléctrico
PVDF	Polivinildifluoruro
SSAF	Solución salina amortiguadora de fosfatos pH 7.2
SSAF-Tween	Solución salina amortiguadora de fosfatos con Tween 20 al 0.3%
SNC	Sistema nervioso central
TEMED	N,N,N',N' Tetrametiletildiamina
Tris	Tris hidroximetil aminometano
Tris HCl	Cloruro de tris hidroximetil aminometano

**Abreviaturas de los aminoácidos en una y tres letras.**

Nombre	Abreviatura en tres letras	Abreviatura en una letra
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	Hys	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

## INDICE DE FIGURAS.

Figura	Tema	pág.
1	Morfología del estadio adulto de <i>Taenia solium</i> .	5
2	Morfología de cisticercos de <i>Taenia solium</i> .	6
3	Morfología de huevos de <i>Taenia solium</i> .	6
4	Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i> .	8
5	Estructura de la actina.	10
6	Proceso de polimerización de la actina.	11
7	Diagrama de flujo general del procedimiento experimental empleado	21
8	Análisis por electroforesis e Inmunoelctrotransferencia de actina en extractos semipurificados.	31
9	Fraccionamiento de actina por Sepharosa CL-4B y análisis inmunoenzimático.	33
10	Análisis por electroforesis e inmunoelctrotransferencia de la actina purificada por Sepharosa CL-4B.	35
11	Fraccionamiento de actina por Sepharosa 4B-DNasa I y análisis inmunoenzimático.	37
12	Evaluación de la presencia de actina y miosina por inmunopunto de las fracciones de la columna de DNasa I.	38
13	Evaluación por electroforesis e inmunoelctrotransferencia de actina purificada por DNasa I.	39
14	Evaluación por electroforesis bidimensional (pH 3-10) de actina contenida en extracto crudo de cisticercos.	41
15	Evaluación por electroforesis bidimensional (pH 4-6) de actina contenida en extracto crudo de cisticercos.	46
16	Evaluación por electroforesis bidimensional (pH 3-10) de actina contenida en miofilamentos de cisticercos.	48
17	Evaluación por electroforesis bidimensional (pH 4-6) de actina contenida en miofilamentos de cisticercos.	49
18	Evaluación por electroforesis bidimensional (pH 4-6) de actina purificada de cisticercos por afinidad con DNasa I.	51

---

## RESUMEN

*Taenia solium* es el céstodo causante de la teniosis y la cisticercosis, las cuales representan un problema de salud pública para el humano. Pocas proteínas estructurales de *T. solium* han sido estudiadas, sólo la miosina y la paramiosina, pero no la actina. Este tipo de proteínas pueden desempeñar un papel importante en el mantenimiento del parásito dentro de su huésped. La actina es una proteína de 43 kDa en su forma monomérica que puede polimerizarse en actina F (PM 2000 kDa); es un componente del citoesqueleto con múltiples funciones en la estructura y motilidad de las células eucariotas. Con el objeto de conocer las características de la actina de *T. solium* se decidió aislarla a partir de los cisticercos. Para este fin, fueron obtenidos extractos de miofilamentos, los cuales fueron empleados para purificar actina por cromatografía por exclusión molecular en Sepharosa CL-4B y por cromatografía de afinidad con DNasa I. Con el primer método se logró recuperar predominantemente actina F, mientras que con el segundo método se recuperó actina posiblemente en forma dimérica, como dos fracciones de 70 y 60 kDa. Al analizar las diferentes etapas del proceso de purificación por electroforesis bidimensional e inmunoelectrotransferencia, se encontraron 4 posibles isoformas de actina con valores de pI situados entre 5.4 y 5.7, tanto en el extracto crudo como en los miofilamentos. Con la actina purificada por DNasa I no se logró determinar el número de isoformas, probablemente por modificación de la proteína o por una inadecuada solubilización. Aunque los métodos de purificación permiten la obtención de actina para su estudio bioquímico, requieren ser optimizados para mejorar su rendimiento. La existencia de isoformas de actina expresadas en el cisticercos podría sugerir que las actinas de este parásito poseen funciones específicas relacionadas con su localización tisular, además de que podrían ser expresadas de manera diferencial en los estadios de *T. solium*.

---

## INTRODUCCIÓN.

Las parasitosis son un problema importante de salud pública en México por su alta prevalencia. Algunas de las enfermedades son benignas y pueden pasar inadvertidas mientras que otras pueden ser incapacitantes. Las parasitosis debidas a los diferentes estadios de *Taenia solium* se encuentran en ambos extremos porque la teniosis, causada por el estadio adulto, puede pasar inadvertida; mientras que la cisticercosis, ocasionada por la fase larvaria o de metacéstodo, puede ser incapacitante cuando se localiza en el sistema nervioso central. La presencia de estas enfermedades se debe principalmente a los malos hábitos de alimentación e higiene de la población, lo cual es un reflejo del desarrollo socioeconómico del país [1].

En términos generales, las parasitosis han sido ampliamente estudiadas desde el punto de vista de la respuesta del huésped hacia el parásito, y es poca la información existente acerca de los mecanismos que el parásito emplea para mantenerse dentro del huésped. De las dos parasitosis ocasionadas por *T. solium*, la cisticercosis es la mejor estudiada y en los cisticercos se han realizado la mayoría de los estudios de morfología y fisiología. En estos parásitos, a pesar de los estudios realizados, son pocas las proteínas caracterizadas, entre las cuales pueden mencionarse al antígeno B (que tiene elevada homología con las paramiosinas), a la colágena, a algunas proteasas y a la miosina [2].

Uno de los motivos del presente proyecto de tesis está relacionado con el estudio de una miosina tipo II o convencional de parásitos de *T. solium*, el cual se derivó de la caracterización inmunoquímica de uno de varios anticuerpos monoclonales producido contra extractos crudos de tenias [3]. Posteriormente, para la caracterización bioquímica de esta miosina era necesario demostrar que tiene actividad enzimática de ATPasa y se presentó la

necesidad de purificar actina de estos parásitos. En un estudio preliminar fue obtenida la actina y empleada para evaluar la actividad ATPasa de la miosina de cisticercos de *T. solium*, en este proceso se observaron algunas diferencias al ser comparadas con otras actinas. Con base en estas observaciones y en el hecho de que no hay estudios con actinas aisladas de este tipo de parásitos se propuso purificar y evaluar la actina con el fin de iniciar la caracterización de la proteína.

En el presente trabajo de tesis se purificó la actina de cisticercos de *T. solium* mediante dos métodos empleados previamente con actinas de otras fuentes y se demostró la presencia de isoformas de actina mediante electroforesis bidimensional e inmunoelectrotransferencia. Los resultados obtenidos muestran que la actina de este parásito aparentemente tiene algunas propiedades bioquímicas diferentes de las conocidas para otras actinas.

## I. MARCO TEÓRICO

### 1. *Taenia solium*.

**1.1. Enfermedades parasitarias.** *Taenia solium* produce dos enfermedades parasitarias, la teniosis y la cisticercosis. Estas enfermedades son consideradas como un problema de salud pública en México y por ello se ha considerado oficialmente su control y erradicación como elemento de atención primaria a la salud [4].

**1.1.1. Teniosis.** La teniosis es una parasitosis debida al establecimiento de la fase adulta de *T. solium* en el intestino delgado del hombre. La teniosis es una enfermedad asintomática y de difícil diagnóstico clínico porque la presencia de un parásito adulto no representa serios daños para la salud de los individuos infectados. Aunque la parasitosis se presenta en todas las edades, afecta principalmente a individuos cuya edad fluctúa entre 16 y 45 años. La frecuencia en México varía de 0.2 a 3.4% y los factores de riesgo para contraerla son: la crianza de cerdos que se alimentan con excretas humanas, la falta de control sanitario de la carne de cerdo y los hábitos de alimentación de la población, entre ellos, el consumo de carne insuficientemente cocida [1, 5].

Para el diagnóstico de la teniosis se ha implementado un método basado en la captura de coproantígenos, debido a que los exámenes coproparasitológicos comúnmente empleados carecen de sensibilidad y especificidad [6]. Desafortunadamente, su uso se ha restringido a estudios epidemiológicos. El tratamiento de esta enfermedad en México se realiza con praziquantel y albendazol, aunque debe buscarse el escólex en las heces para garantizar que el tratamiento antihelmíntico ha sido efectivo [1, 7].



**1.1.2. Cisticercosis.** La cisticercosis es la enfermedad parasitaria causada por la presencia de cisticercos de *T. solium* en los tejidos del hombre y del cerdo (músculo esquelético, corazón y cerebro). Cuando afecta al cerdo ocasiona pérdidas económicas para la ganadería, mientras que en el hombre puede producir una enfermedad incapacitante cuando se localiza en el SNC. Las manifestaciones clínicas de la neurocisticercosis no son características y dependen en gran medida del estado de la infestación, de la localización de los cisticercos y del grado de inflamación [8]. Algunos de los signos y síntomas más comunes son: convulsiones, náusea y vómito, estado mental alterado (psicosis, confusión); problemas visuales y ataxia [7, 8].

Por medio de diferentes estudios epidemiológicos se ha logrado demostrar que existe una alta asociación entre individuos con cisticercosis y portadores de *Taenia* [9]; la presencia de cisticercosis es favorecida por las costumbres, la religión, los hábitos higiénico-dietéticos y la cultura de la población; así como por la defecación al aire libre, la falta de higiene personal, la irrigación de cultivos de verduras con aguas negras, el consumo de agua sin hervir y de alimentos sin lavar. La importancia de estos conocimientos radica en que se ha demostrado que un solo portador de *Taenia* es capaz de producir varios casos de neurocisticercosis [10].

El diagnóstico de la neurocisticercosis se realiza por medio de estudios de neuroimagen, como la tomografía axial computarizada (TAC), que es útil para detectar la calcificación asociada con la infestación, y la resonancia magnética nuclear (RMN), que es una técnica más sensible que la TAC para la detección de cisticercos además de que revela la inflamación asociada a la infestación [8, 9]. Por otra parte, han sido diseñadas una amplia gama de pruebas serológicas para su uso en el diagnóstico y en estudios epidemiológicos, entre ellas, la inmunoelectrotransferencia de glicoproteínas es la prueba más específica y sensible [2].

Para el tratamiento de la neurocisticercosis deben considerarse factores como la localización y viabilidad de los cisticercos, los síntomas y el grado de respuesta inflamatoria del hospedero [8]. En el caso de una infestación inactiva el tratamiento es sintomático, con el uso de anticonvulsivos y de punción ventricular; mientras que en el caso de una infestación activa se emplean anticonvulsivos (fenitoína y fenobarbital) y antihelmínticos (praziquantel o albendazol). Cuando los pacientes desarrollan inflamación alrededor de los cisticercos pueden emplearse corticosteroides [2, 7, 8].

## 1.2. El parásito.

**1.2.1. Taxonomía.** La forma adulta es conocida comúnmente como "solitaria" y la forma de metacéstodo o cisticerco es llamada, "tomatillo", "granillo" o "zahuate" [5]. La clasificación taxonómica de *Taenia solium* es la siguiente [11]:

Phylum Platyhelminthes. Gusanos en forma de hoja o de cinta, con simetría bilateral y sin cavidad visceral. Los órganos internos están inmersos en un tejido conectivo denominado parénquima. La mayoría son hermafroditas.

Clase Cestoda. Gusanos exclusivamente parásitos, aplanados dorsoventralmente y semejantes a cintas.

Subclase Eucestoda. El parásito adulto presenta cuerpo dividido en proglótidos, generalmente con escólex y la oncosfera tiene una corona de 6 ganchos.

Orden Cyclophyllidae. El escólex está formado por cuatro ventosas, en el parásito adulto los poros genitales son laterales, la glándula vitelina es una masa única o bilobulada posterior al ovario. Son parásitos de aves y mamíferos.

Familia Taeniidae. El escólex suele estar armado con una doble hilera de ganchos. El estadio adulto presenta un útero de tallo longitudinal en la porción media y con ramificaciones laterales, los poros genitales laterales están distribuidos de forma alterna, los huevos tienen cubiertas interiores gruesas y estriadas. Son parásitos de humanos o de animales domésticos, su ciclo biológico transcurre en dos hospederos.

Género *Taenia*. La forma larvaria es el cisticerco, la forma adulta es relativamente grande con un escólex piriforme. Los adultos son parásitos de mamíferos carnívoros y las larvas, de herbívoros.

Especie *solium*. El adulto habita en el humano, los individuos infectados generalmente sólo contienen un ejemplar. El útero tiene 6-8 ramificaciones.

## 1.2.2. Morfología.

**1.2.2.1. Parásito adulto o tenia.** El estadio adulto de *T. solium* habita de manera natural en el intestino delgado del ser humano infectado y mide entre 1.5 a 5 m de longitud. En el extremo anterior del parásito se encuentra el escólex o cabeza, de aproximadamente 1 mm de diámetro, el cual incluye un rostelo armado con una doble corona de ganchos grandes y pequeños (22-36 ganchos) y 4 ventosas, que actúan como órganos de fijación que favorecen el anclaje del parásito en la pared del yeyuno (Fig. 1A). Posterior al escólex se encuentra el cuello, a partir del cual se inicia la segmentación del parásito. Esta segmentación genera una cadena estrobilar o estróbilo, en la cual cada segmento se denomina proglótido. Conforme crece el estróbilo, los proglótidos cambian de tamaño y pueden clasificarse en tres tipos con base en la evolución de sus órganos reproductores: proglótidos inmaduros, maduros y grávidos; los proglótidos inmaduros son aquellos en los cuales los órganos reproductores son afuncionales o inexistentes,

los maduros (Fig. 1B), en los que sus órganos reproductores están bien diferenciados y son funcionales, por último los grávidos son aquellos en los que los órganos reproductores no son visibles y contienen los huevos en un número aproximado de 30 000 a 50 000 [12].



Figura 1. Morfología del estadio adulto de *Taenia solium*. Escólex (A), Esquema de un proglótido maduro (B). Fuente: [5]

**1.2.2.2. Metacéstodo o cisticerco.** Los cisticercos están constituidos por una vesícula (con un diámetro aproximado de 0.5 a 2 cm) ovalada y translúcida llena de un líquido y un nódulo opaco, que corresponde al escólex invaginado (Fig. 2). El escólex del cisticerco posee 4 ventosas y un rostelo armado. El líquido se denomina fluido vesicular y es una mezcla compleja de moléculas del parásito y componentes del plasma del hospedero. En el cerebro, el cisticerco tiene un diámetro de 1 cm y suele estar rodeado por una cápsula de espesor variable que está compuesta de colágeno. La pared vesicular consta de tres capas: una cutícula cubierta de microtricas, una capa de pseudoepitelio y una capa de tejido conectivo atravesada por una red de canalículos [5, 8].

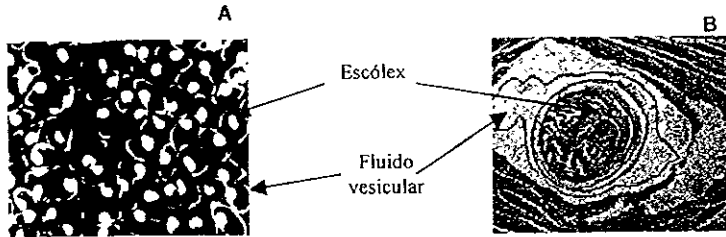


Figura 2. Morfología de cisticercos de *Taenia solium*. Cisticercos extraídos de músculo de cerdo (A) Corte de cisticercos en músculo (B) Fuente: [5].

**1.2.2.3. Huevo.** Los huevos de *T. solium* miden aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  de diámetro y poseen varias envolturas para proteger a la oncosfera de factores ambientales (Fig. 3). La envoltura más externa es el vitelo o cápsula, constituida por un grupo de células que forman un sincicio, que rodea al embrióforo, que a su vez está constituido por una serie de tabiques constituidos de queratina llamados bloques embriófóricos, unidos entre sí por una proteína cementante. La siguiente cubierta es la membrana oncosferal que rodea a la oncósfera o embrión hexacanto, llamado así porque posee tres pares de ganchos.

Los huevos de *T. solium* son resistentes al medio externo, ya que dentro o fuera de los proglótidos se mantienen viables por varias semanas en suelos húmedos [13, 14].

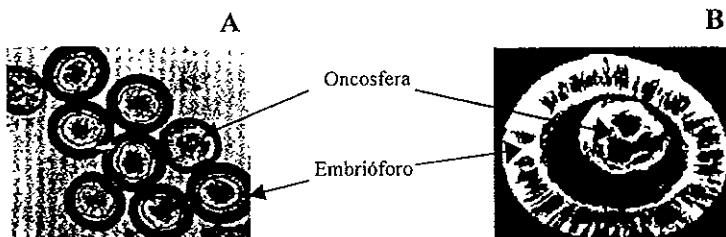


Figura 3. Morfología de huevos de *Taenia solium*. Huevos en microscopía de luz (A) y en microscopía electrónica (B). Fuente: [14].

**1.2.3. Ciclo Biológico.** El hombre es el único hospedero definitivo de *T. solium*, el hospedero intermediario es el cerdo y el hombre es considerado como hospedero accidental cuando aloja al metacéstodo (Fig. 4). Otras especies como el perro y el mono, entre otros mamíferos también pueden alojar a los cisticercos [5].

El humano adquiere la infestación intestinal por la ingestión de carne de cerdo mal cocida e infestada con cisticercos de *T. solium*. Los parásitos evaginan en el intestino delgado por acción de las sales biliares y las enzimas proteolíticas, se adhieren por medio de su escólex a la pared del intestino, donde maduran a parásito adulto. Los proglótidos grávidos son eliminados espontáneamente por el parásito adulto (promedio de 4-5/día) en las heces del hospedero, la primera expulsión de huevos ocurre entre 62 y 72 días después de la infestación (período de prepatencia); la putrefacción de los proglótidos en el medio ambiente permite la liberación de los huevos, que pueden alcanzar al hospedero intermediario por distintos medios [12].

Generalmente, la cisticercosis se adquiere al ingerir alimentos contaminados con los huevos, pero podrían existir otros vehículos o mecanismos de transmisión; en el caso del cerdo es común la ingestión de materia fecal contaminada. En el tubo digestivo del hospedero intermediario, las enzimas proteolíticas y las sales biliares favorecen la señal de activación de las oncosferas (embrión hexacanto); que una vez activadas penetran en la mucosa intestinal del hospedero hasta alcanzar capilares linfáticos y sanguíneos, para ser distribuidas a una gran variedad de órganos y tejidos: tejido subcutáneo, músculo cardiaco, cerebro y ojos. La oncosfera madura a cisticerco después de entre tres semanas y dos meses; durante este período la oncosfera incrementa su área superficial por el desarrollo de microtrícas que favorece la adquisición de nutrientes y su crecimiento [5, 14].

El ciclo se cierra cuando el ser humano ingiere carne cruda o insuficientemente cocida proveniente de un cerdo cisticercoso (Fig. 4).

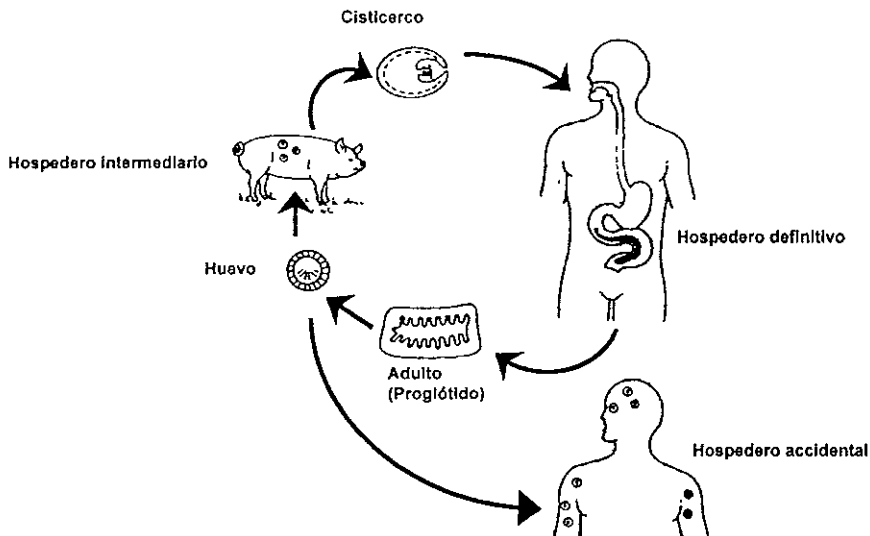


Figura 4. Ciclo de vida de *Taenia solium*. Modificado de [7].

**2. Citoesqueleto.** El citoesqueleto es la red interna de fibras citosólicas que estabiliza la estructura celular, organiza el citoplasma y produce movimiento. Los tipos de filamentos citoplasmáticos que lo componen son: microfilamentos de actina ( $\phi$  7-9nm), microtúbulos ( $\phi$  24nm) y filamentos intermedios ( $\phi$  10nm). Los microfilamentos y microtúbulos juegan un papel importante en la determinación de la forma celular; en asociación con tipos particulares de enzimas ATPasas participan en eventos de motilidad celular, además, participan en procesos como la mitosis, la movilización de organelos y el transporte de vesículas de excreción [15, 16].

**2.1. Miosina.** La miosina es una proteína del citoesqueleto que constituye el principal motor molecular en fenómenos relacionados con contracción muscular o movimiento celular. Consiste

de dos cadenas pesadas (170 kDa) y cuatro ligeras (20 kDa), agrupadas en una larga cola filamentosa y dos cabezas globulares. La interacción de las cabezas globulares de la miosina con la actina F (Fig. 5A), incrementa la actividad Mg-ATPasa de la miosina y con ello produce la fuerza mecánica necesaria para el movimiento muscular. La actina y la miosina se unen por medio de interacciones hidrofóbicas, iónicas y polares, reguladas por el ión  $\text{Ca}^{2+}$ . La actina y miosina están presentes tanto en células musculares como en no musculares, en estas últimas intervienen en fenómenos de contracción para generar tensión cortical (que da forma a las células) y en la citocinesis [17, 18].

**2.2. Actina.** La actina es una de las proteínas del citoesqueleto más abundantes en las células eucariontes conocidas y su función principal es la de constituir la base de la estructura y el movimiento de estas células en general [19].

**2.2.1. Estructura.** La actina puede existir como una molécula monomérica globular denominada actina G o como un polímero filamentoso, la actina F. La actina G consiste de una cadena polipeptídica de 374-375 residuos de aminoácidos, con un peso molecular cercano a 43kDa y un pI alrededor de 5.4; la secuencia de aminoácidos y sus propiedades bioquímicas están altamente conservadas a través de la evolución [19].

La actina es una molécula bilobulada constituida por dos dominios globulares, uno mayor y uno menor, separados por una hendidura (Fig. 5C). En el dominio menor, que comprende a los subdominios 1 y 2, se encuentran los extremos amino y carboxilo; mientras que el dominio mayor comprende a los subdominios 3 y 4. En la región de la hendidura existe un sitio de unión para una molécula de nucleótido de adenina (ATP o ADP) y un sitio de alta afinidad para un catión divalente,  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ , además existen otros sitios de baja afinidad distribuidos a lo largo



de la molécula. El nucleótido y el metal enlazados contribuyen a la estabilidad de la molécula al interactuar con la actina en múltiples sitios, por lo cual, la remoción del nucleótido o del metal causa su desnaturalización. Fisiológicamente el  $Mg^{2+}$  está unido a la actina y cuando se reemplaza por  $Ca^{2+}$  se modifican las propiedades de polimerización de la actina [19, 20].

El filamento de actina es una hélice levógira sencilla, como la hélice genética, en la que cada subunidad gira  $-166.2^\circ$  respecto a la precedente (Fig. 5B). El diámetro aparente del filamento varía entre 7 y 10 nm, esto permite el ensamble de la actina F en estructuras de orden superior [16, 21].

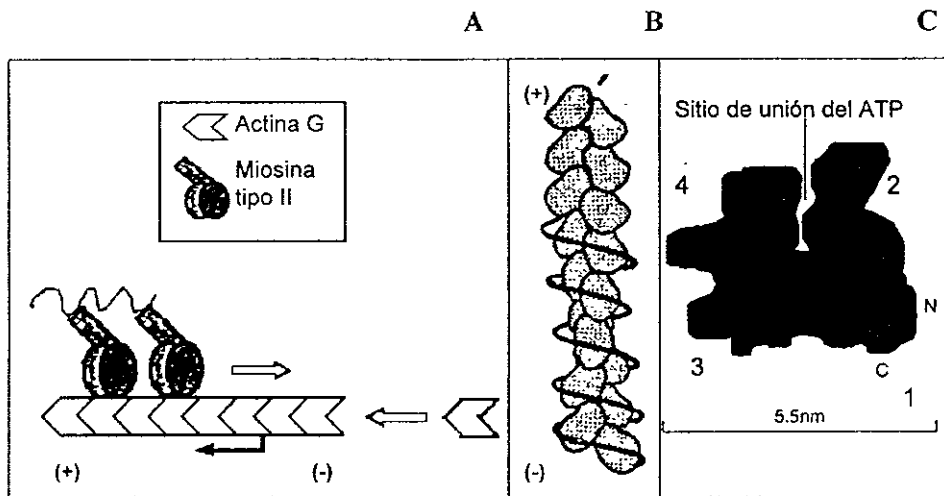


Figura 5. Estructura de la actina. Actina F, formación, interacción con miosina y dinámica del movimiento fibrilar Fuente: [22] (A). Actina F. Conformación y dirección del filamento. Fuente: [19] (B). Actina G (C) Conformación, porción aminoterminal (N) y porción carboxiterninal (C), subdominios globulares (1, 2, 3, 4), extremo más (+), extremo menos (-) Fuente: [19]

El proceso de polimerización de la actina en filamentos ocurre en 4 etapas [20]:

1. Activación. Cambios conformacionales de los monómeros por su unión a iones.
2. Nucleación. Formación de oligómeros que tengan mayor probabilidad de crecer a filamentos que de descomponerse en monómeros.
3. Elongación. Asociación y disociación de moléculas de actina en los extremos de los filamentos.
4. Anillación. Unión de los filamentos por sus extremos.

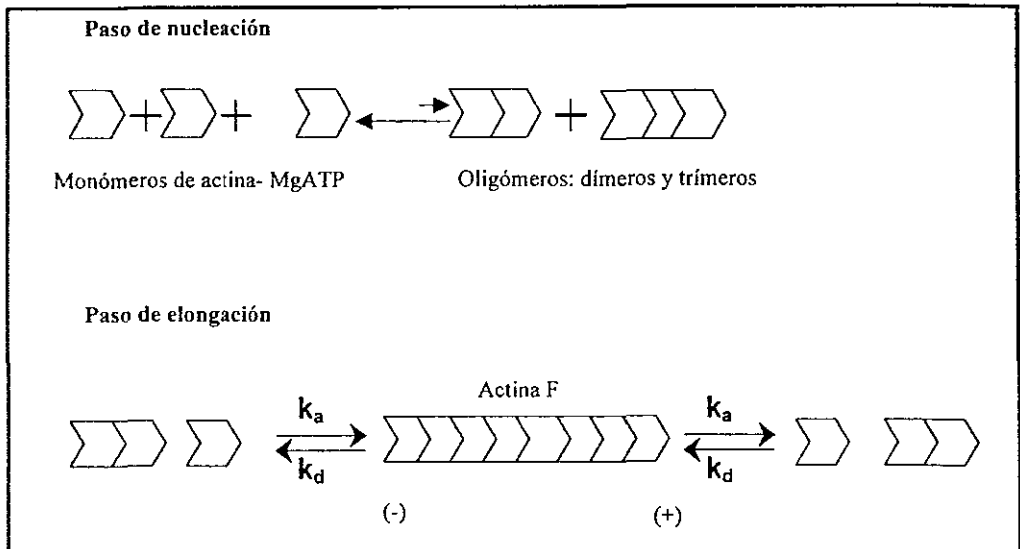



Figura 6. Proceso de polimerización de la actina.: Constante de asociación ( $k_a$ ); constante de disociación ( $k_d$ ).

Monómero de actina (  ) Extremos más (+), extremo menos (-). Fuente: [20].

El paso limitante de la polimerización es la nucleación, que está energéticamente desfavorecida porque la vida media de los oligómeros (dímeros y trímeros) es corta, aun cuando la estabilidad de estos oligómeros se incrementa en presencia de  $Mg^{2+}$ ; el proceso continúa con

la adición de subunidades a los dos extremos del filamento, los cuales crecen a diferentes velocidades y se denominan como más (+) y menos (-); después de la incorporación de una molécula de actina en el filamento, el ATP que se encuentra unido a la actina es hidrolizado a ADP. Todos los pasos involucrados en la polimerización son reversibles, por lo que la actina puede interconvertirse de la forma monomérica a la polimérica por medio de cambios en la concentración y naturaleza de los iones [19, 20].

Una vez que el proceso de polimerización alcanza el equilibrio, la velocidad de asociación se iguala con la velocidad de disociación, y la actina G que coexiste con la actina F tiene una concentración característica: la concentración crítica, que es, por tanto, la mínima concentración de actina monomérica requerida para iniciar la polimerización bajo condiciones específicas de temperatura, concentración y naturaleza de las sales. Por debajo de la concentración crítica se considera que no existe ningún tipo de polímero, aunque se ha detectado formación de dímeros en concentraciones de actina por debajo de la concentración crítica y en presencia de  $MgCl_2$  0.1mM. La concentración crítica de la actina muscular es de alrededor de 15  $\mu g/ml$  y es superada fácilmente en condiciones fisiológicas, por lo que la actina está presente en las células predominantemente en forma polimerizada [19].

Existen numerosas proteínas que se unen a la actina tanto en su forma monomérica como a la polimérica. Entre las proteínas que se unen a la actina G, la profilina y la timosina  $\beta_4$  inhiben la formación de polímeros al secuestrar los monómeros en complejos, y de esta manera mantienen una reserva de actina no polimerizada. Las proteínas que se unen al polímero forman una variedad de estructuras supramoleculares, que pueden ser modificadas en respuesta a estímulos intra o extracelulares [20, 21, 23].

El gran número de proteínas que controlan la organización de la actina sugiere que las redes de actina están reguladas con precisión durante procesos como la motilidad celular y la

diferenciación. Estas proteínas pueden funcionar como reguladoras del crecimiento celular y la diferenciación [24].

**2.2.2. Función.** La actina tiene un papel estructural como componente del citoesqueleto en las células: proporciona la rigidez necesaria para dar forma a las células, junto con otros componentes del citoesqueleto; provee fuerza mecánica al citoplasma, ayuda a organizar procesos celulares en el espacio y el tiempo como son la expresión de proteínas, localización de RNAm, citocinesis, secreción de vesículas y la transducción de señales. La interacción entre actina y la membrana citoplásmica estabiliza la membrana y modifica las funciones de las proteínas de membrana. La actina es un elemento importante en los procesos de motilidad celular, por medio de rearrreglos del citoesqueleto o a través del movimiento de la miosina a lo largo del filamento de actina. En la fagocitosis, la actina tiene un papel principal durante las etapas iniciales porque los filamentos de actina son reclutados a la superficie de la membrana citoplásmica en el sitio de unión para iniciar el englobamiento [23, 25, 26, 27, 28].

**2.2.3. Isoformas.** La mayoría de los organismos vertebrados y algunos invertebrados poseen varias formas de actina, las cuales difieren en cuanto a su punto isoeléctrico y pueden ser diferenciadas mediante electroforesis bidimensional. Las isoformas de actina han sido clasificadas dentro de dos grandes grupos de acuerdo al tipo de tejido donde son expresadas principalmente: las actinas musculares y las no musculares. Estas isoformas son denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  de acuerdo a la alcalinidad creciente de sus movilidades electroforéticas en geles de isoelectroenfoque [29]. Recientemente se ha hecho una clasificación de las isoactinas con base en la composición de aminoácidos de la región aminoterminal: en la clase I se encuentran las actinas cuyos residuos aminoterminales son ácido aspártico o glutámico N-

acetilados; en la clase II están las isoactinas musculares, que tienen metionina y cisteína seguida por ácido aspártico o glutámico, los primeros dos aminoácidos son removidos y el nuevo aminoterminal es acetilado; en la clase III están proteínas semejantes a la actina, que tienen un peso molecular ligeramente mayor (45 kDa) y su pI es más básico (6.8-6.9) que las actinas de las clases I y II [30].

La mayoría de las isoformas de actina son productos de diferentes genes que codifican para proteínas con diferentes secuencias primarias, pero con una alta homología; mientras que otras son el resultado de modificaciones post-traduccionales de la expresión de un solo gen [21, 31].

Los vertebrados contienen 6 isoformas de actina, las cuales se expresan de una manera específica de tejido, dos actinas son características de músculo estriado ( $\alpha$  esquelética y  $\alpha$  cardíaca), dos se localizan en músculo liso ( $\alpha$  vascular y  $\gamma$  visceral), y las restantes ( $\beta$  y  $\gamma$ ) son actinas citoplásmicas, presentes en todas las células no musculares, en proporciones que dependen del tipo celular y el estado de diferenciación. Las actinas citoplásmicas son evolutivamente más antiguas que las musculares y es posible encontrarlas en todas las células de eucariontes inferiores, invertebrados y en células no musculares de vertebrados [31, 32, 33, 34].

La importancia de la existencia de isoformas de actina no ha sido determinada porque sus propiedades son muy similares, aunque recientemente se han demostrado algunas diferencias en el comportamiento de las diferentes isoformas:

- La velocidad de polimerización de la actina de músculo esquelético es 10 veces mayor que la actina no muscular, empleando condiciones de baja temperatura y fuerza iónica a niveles fisiológicos [30].
- La isoforma  $\gamma$  de músculo liso es más termolábil que las actinas musculares [34].

- Las actinas no musculares pueden ser ADP ribosiladas por la toxina C2 de *Clostridium botulinum* [34].
- La actina no muscular tiene mayor afinidad por las proteínas ezrina, I-plastina, profilina y timosina  $\beta_4$  que la actina muscular [32].
- Las isoformas existentes dentro de una misma célula están compartimentalizadas tanto en el sitio de expresión como en su localización final [32].
- Las isoformas no musculares de actina favorecen la organización del citoesqueleto en una forma óptima para la proliferación de ciertas células [34].
- Las actinas musculares son incorporadas preferentemente a los miofilamentos en un 40-50% sobre las actinas citoplásmicas, las cuales no complementan a las actinas musculares en la formación de estructuras contráctiles en músculo [33, 34].
- Las actinas  $\beta$  se concentran en áreas móviles, no contráctiles de las células; mientras que las actinas musculares están predominantemente en estructuras sarcoméricas [32].
- La actina  $\beta$  citoplásmica tiene el doble de afinidad por faloidina que la actina  $\alpha$  de músculo esquelético [32].
- La longitud de los filamentos de actina polimerizados en presencia de faloidina es mayor para la actina  $\alpha$  de músculo esquelético que las actinas  $\alpha$  y  $\gamma$  de músculo liso [32].
- Existen diferencias en la estructura de los subdominios de las actinas  $\alpha$  y  $\beta$  mediante estudios cristalográficos [35].

#### 2.2.4. Purificación.

**2.2.4.1. Métodos.** La actina puede ser purificada por diversos métodos, los cuales aprovechan su capacidad para polimerizar y despolimerizar, su interacción con DNasa I y su solubilidad en

KCl 0.6M. La forma clásica de obtención de actina está basada en la preparación de extractos acetónicos y su concentración mediante ciclos de despolimerización-polimerización [36]. Posteriormente, al demostrarse que la actina era el inhibidor de la DNasa I fueron desarrollados múltiples métodos de cromatografía de afinidad basados en esta interacción, los métodos más recientes usan formamida para eluir la actina enlazada a la columna aunque recomiendan la remoción de este agente desnaturante por medio de diálisis o filtración en gel [37, 38, 39]. Otro método de gran utilidad es la cromatografía de intercambio iónico (DEAE-celulosa) por medio del cual es posible obtener actina de un grado de pureza razonable [40]. Para la extracción de actinas no musculares recientemente se diseñó un protocolo basado en la extracción de la actina con Tris 1M y su purificación por filtración en gel de Sepharosa CL-4B [41]; este proceso fue empleado con éxito para la obtención de la actina de *Trichomonas* [25]. Un procedimiento similar combina la extracción con Tris 1M, la cromatografía de intercambio iónico y la afinidad de actina por DNasa I es efectiva para la obtención de actina de fuentes no musculares con alto grado de pureza para su estudio bioquímico [42].

**2.2.4.2. Evaluación.** La presencia de actina durante el proceso de purificación puede ser evaluada por densitometría en geles teñidos con Coomassie para evaluar rendimiento y pureza relativa [40]. La actividad biológica puede medirse por la inhibición de la DNasa I o por activación de la actividad ATPasa de la miosina, aunque esta técnica no es aplicable en extractos crudos por la actividad ATPasa de otras proteínas [40, 41]; durante el proceso también puede evaluarse el reconocimiento por anticuerpos monoclonales o policlonales de especificidad variable contra actina por medio de alguna técnica inmunoenzimática (IET, inmunopunto, ELISA) [25, 35, 43]. La actina purificada puede evaluarse por alguna de las siguientes técnicas: tinción negativa de la actina F por microscopía electrónica, ensayos de motilidad *in vitro* de miosina

sobre filamentos de actina F unida a faloidina-rodamina, análisis fluorométrico de la polimerización de la actina marcada con N-(1-pireno) yodoacetamida y análisis viscosimétrico de la polimerización [38, 39, 41, 44].

**2.3. Citoesqueleto en céstodos.** Las proteínas del citoesqueleto son componentes claves de las células, pero han sido poco estudiadas en céstodos [45]. En *T. solium* las proteínas estructurales que han sido estudiadas son la paramiosina [46, 47] y la miosina [3], cuya caracterización se ha iniciado recientemente, mientras que la actina aun no ha sido estudiada bioquímicamente. La paramiosina de *Himenolepis diminuta* es similar a la de otras fuentes y en *E. granulosus* se ha estudiado la tubulina (50 kDa) que conforma a los microtúbulos [45]. En *H. diminuta* también se ha estudiado la distribución de las fibras del citoesqueleto en el tegumento por medio de microscopía electrónica, los resultados indican que la actina y los filamentos intermedios se localizan en sitios específicos del ectocitoplasma mientras que los microtúbulos están presentes en todo el tegumento [48].

**2.3.1. Miosina.** La miosina de céstodos sólo ha sido estudiada en *T. solium* y se piensa que podría estar relacionada con la evaginación de los cisticercos, con la fijación del parásito adulto en la mucosa intestinal, con el movimiento de proglótidos y con la liberación de huevos. Además, el mecanismo de deslizamiento entre los filamentos de actina y miosina de los céstodos podría operar de manera similar a los sistemas de los invertebrados y vertebrados que han sido estudiados [45, 49].

**2.3.2. Actina.** Relativamente poco es lo que se conoce acerca de la actina en este grupo de organismos [45]. En *T. solium* se lograron aislar de 3 a 8 secuencias homólogas a genes de



actina, dos de estos genes (AT5 y AT6) fueron secuenciados y las secuencias predichas de aminoácidos de las proteínas que codifican mostraron un 100% de homología entre sí. Además, se demostró la expresión de al menos un gen en el cisticerco por IET con anticuerpos monoclonales antiactina [50].

En *Echinococcus granulosus*, otro parásito ténido, se encontraron por lo menos 8 secuencias relacionadas con genes de actina, las secuencias de aminoácidos deducidas son similares a las de actinas citoplásmicas de vertebrados, de otros invertebrados y de eucariotes inferiores [51]. Por otra parte, en *Diphyllobothrium dendriticum* se han secuenciado seis genes de actina, que por medio de hibridación *in situ* mostraron tener tres patrones de expresión relacionados con su localización, denominados cestoda I,II y III [52]:

- Cestoda I (Act 1, 2 y 4) Localización en células musculares y a nivel subtegumentario, aunque es posible que durante el desarrollo del parásito se expresen en células no musculares.
- Cestoda II (Act 3 y 5). Localización en células en migración, proliferación, diferenciación y contracción, debido a ello podrían ser de tipo citoplásmico.
- Cestoda III (Act 6). Localización en el tegumento, donde podría intervenir en el transporte de moléculas y vesículas.

En este mismo parásito, recientemente fue estudiada la distribución de actina F por microscopia confocal y los resultados muestran que la actina es una proteína abundante, con una localización predominantemente muscular y sugiere que los genes de actina pudieran expresarse de manera tejida específica dependiendo de la etapa de desarrollo [52, 53]. Es importante resaltar que a pesar de los conocimientos recientes en la actina de céstodos, aún no ha sido aislada y se desconocen sus propiedades bioquímicas.

## II. OBJETIVOS.

- Purificar actina a partir de cisticercos de *Taenia solium* por medio de dos tipos de cromatografía (afinidad y exclusión por peso molecular).
- Evaluar los métodos de purificación de actina empleados.
- Identificar isoformas de actina en el cisticerco de *T. solium* por medio de electroforesis bidimensional y de ensayos inmunoenzimáticos.
- Inferir sobre el papel que tienen las isoformas de actina en el desarrollo del parásito.

## III. HIPÓTESIS.

Si la actina de los cisticercos de *Taenia solium* es semejante a las actinas conocidas actualmente, entonces la actina de este parásito puede ser purificada por métodos convencionales y puede existir en varias isoformas.

## IV. MATERIALES Y METODOS

### 1. Obtención de parásitos.

Los cisticercos fueron recuperados inmediatamente después de la necropsia de cerdos parasitados, para los estudios se utilizaron los parásitos aún cuando estuviera puncionada la vesícula. Posteriormente todo el tejido parasitario se lavó varias veces con solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF) pH 7.2 y se guardó en congelación a -20°C hasta que fue utilizado para la obtención de extractos crudos y de actina.

### 2. Preparación de extracto crudo.

*El tejido parasitario fue procesado, para su análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida, con base a lo descrito por Lacllette [54]. Para ello, 5 g de cisticercos (peso húmedo) fueron homogeneizados, a razón de 5 ml/g de peso húmedo con un homogeneizador Polytron, en presencia de una solución de Tris HCl 50 mM pH 6.8 con dodecil sulfato de sodio (DSS) al 1%, 2-mercaptoetanol al 1%, EDTA al 0.07% y glicerol al 10%. Luego, la suspensión fue aclarada mediante centrifugación (11000 g, 5 min) en una microcentrífuga Eppendorf y al sobrenadante obtenido se le determinó su concentración de proteínas mediante un micrométodo comercial basado en el método de Bradford (BioRad). Como proteína de referencia durante las cuantificaciones fue utilizada la albúmina sérica bovina fracción V (ver apéndice 4) .*

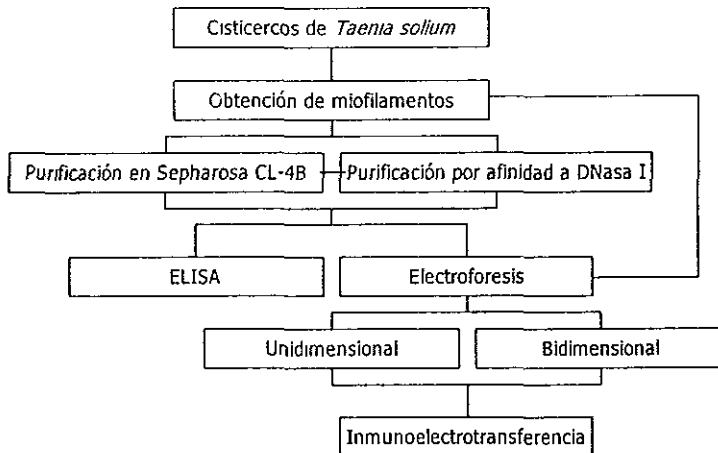


Figura 7. Diagrama de flujo general del procedimiento experimental empleado.

### 3. Purificación de actina de cisticercos.

**3.1. Obtención de miofilamentos.** Una vez que los cisticercos fueron lavados con SSAF, fueron sometidos a centrifugación (1000 *g*, 5 min, 4°C) para eliminar la solución de lavado y determinar el peso húmedo de los parásitos. Posteriormente, los cisticercos fueron homogeneizados en NaCl 0.2 M, en baño de hielo. Luego de la homogeneización, el tejido fue sometido a una extracción (2 h, agitación continua y suave, 4°C) y la suspensión obtenida fue centrifugada (30000 *g*, 30 min, 4°C); el paquete obtenido, una vez separado por decantación, fue nuevamente homogeneizado en KCl 0.6 M pH 6.5. La suspensión resultante en KCl 0.6 M fue centrifugada (7 500 *g*, 30 min, 4°C) y el nuevo paquete obtenido fue mezclado con el sobrenadante recolectado después de la primera centrifugación. La suspensión resultante fue

dializada exhaustivamente (24 h) en presencia de una solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 7.0 complementada con EDTA 1 mM, luego esta misma suspensión fue dializada contra una solución relajante de fibras musculares (KCl 0.1 M, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, ATP 5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.016 M y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.016 M pH 7.5). Durante la diálisis, dentro de la membrana la parte que precipitó fue retirada y el sobrenadante fue recuperado y centrifugado (11,000 g, 30 min, 4°C). De esta última centrifugación, tanto los sobrenadantes como los paquetes fueron analizados y la actina concentrada, contenida en los miofilamentos, se demostró que se encontraba contenida en los paquetes luego de la centrifugación. Luego, dichos paquetes fueron resuspendidos en una pequeña cantidad de sobrenadante, suficiente para resuspender los miofilamentos, fraccionarlos en alícuotas y almacenarlos a -20°C hasta su uso posterior [55].

### **3.2. Cromatografía en columna.**

#### **3.2.1. Cromatografía por exclusión molecular en Sepharosa CL-4B.**

**3.2.1.1. Preparación.** A una columna de vidrio (2.5 x 50 cm) se le adicionó gel de Sepharosa CL-4B, previamente hidratado, esterilizado en autoclave y desgasificado exhaustivamente. Para la adición del gel a la columna fue empleada una solución de SSAF, con la cual también se empacó y equilibró la columna; después de lo cual se le calibró como se indica a continuación.

**3.1.1.2. Calibración.** Fueron empleados los siguientes marcadores de pesos moleculares: azul dextrán (2000 kDa), apoferritina (443 kDa), albúmina bovina (66 kDa) y anhidrasa carbónica (29 kDa). Una vez equilibrada la columna, se adicionó cada uno de los marcadores para determinar sus volúmenes de elución, mediante eluciones por separado en la misma columna; cada una de las fracciones colectadas, de 1.5 ml, fueron analizadas visualmente (azul dextrán) o

por su absorbancia a 280 nm (proteínas usadas como marcadores). A la primera fracción en la cual se observó el colorante o aquella en la cual se obtuvo el valor de absorbancia más alta para las proteínas en estudio, se le determinó el volumen eluido y este fue considerado como el volumen de elución de cada marcador.

Una vez que la columna fue montada y calibrada, se le utilizó para la purificación de actina y en los casos en que no fue usada se le adicionó SSAF con timerosal al 0.05% para su almacenamiento.

**3.2.1.3. Elución.** Posterior a la precipitación selectiva de los miofilamentos de actina, estos fueron solubilizados en una solución compuesta de Tris HCl 1 M pH 7.0, ATP 0.2 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.2 mM y DTT 0.2 mM y fueron fraccionados con un procedimiento semejante a lo descrito por Pinder [41]. Para estos fines, una vez que la actina fue solubilizada se le sometió a una incubación previa (30°C, 15 min) e inmediatamente después fue aplicada a la columna de Sepharosa CL-4B. La elución se realizó con la solución de Tris HCl 1 M a una velocidad de 19-20 gotas/min. En todos los fraccionamientos de actina efectuados se recuperaron 144 fracciones de un volumen igual a 1.5 ml; cada fracción fue analizada mediante espectrofotometría y ELISA para la determinación de la presencia de actina o miosina usando anticuerpos policlonales específicos.

### **3.2.2. Cromatografía de afinidad a DNasa I.**

**3.2.2.1. Preparación.** Para el acoplamiento de la desoxirribonucleasa I (DNasa I, E.C. 3.1.21.1) a la Sepharosa 4B se utilizó el método descrito por Lazarides y Lindberg [37]: la Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno (1 g) fue suspendida en agua destilada fría (50 ml), lavada

secuencialmente con HCl 1 mM y con una solución amortiguadora de acoplamiento ( $\text{NaHCO}_3$  0.1M,  $\text{CaCl}_2$  0.1mM). Luego, a la Sepharosa le fueron adicionados 10 mg de la DNasa I de páncreas de bovino disuelta en 1 ml de la solución de acoplamiento y se permitió la reacción bajo condiciones definidas (4°C, agitación orbital constante, toda la noche). Una vez conjugada la DNasa I, el gel fue montado en una columna de plástico y lavado exhaustivamente con agua destilada (60 ml), solución de acoplamiento (60 ml) y agua destilada (100 ml). Luego, con la finalidad de bloquear el exceso de grupos reactivos, al gel le fue adicionada una solución de dietanolamina 1 M pH 8.0 y se permitió su interacción durante 1 h. Posteriormente, la columna fue lavada con una solución compuesta de Tris 2 mM pH 7.5, KCl 1M, formamida 40%,  $\text{MgCl}_2$  2 mM y finalmente, la columna fue nuevamente lavada con una solución compuesta de Tris 10 mM pH 7.5 y  $\text{CaCl}_2$  5 mM (30 ml). Esta última solución de lavado fue utilizada para el almacenamiento del gel Sepharosa-DNasa I a 4°C hasta su uso. El volumen total de la columna de Sepharosa-DNasa I utilizado en los estudios fue de 3.5 ml.

**3.2.2.2. Elución.** Previo a su uso, la columna fue lavada con solución amortiguadora G: Tris-HCl 2 mM pH 7.5, ATP 0.1 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM (100 ml). Para su fraccionamiento, los miofilamentos previamente fueron precipitados con cloroformo-metanol y *resuspendidos en la solución G (ver apéndice 1)* y sometidos a centrifugación (11000 *g*, 1 min.) en una microcentrífuga. Una vez clarificada la muestra, fue aplicada a la columna y se permitió su interacción durante 2 h; posteriormente, a la columna le fue adicionada una solución G complementada con KCl 0.1M para retirar el material unido inespecíficamente y se continuó hasta que no hubiera valor de absorbancia a 280 nm en las fracciones obtenidas.

La elución de la actina se hizo de dos pasos, de acuerdo a lo descrito por Guerrero-Barrera [56]; primero fue empleada una solución de Tris 2 mM pH 7.5,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, ATP 1 mM,

2-mercaptoetanol 5 mM, EGTA 5 mM, KCl 1 M en la cual, por la inducción de la polimerización de la actina, se promueve su despegado; y después, para el despegado de la actina remanente, se empleó una solución G complementada con formamida al 40%.

Para la elución de la actina se recuperaron fracciones de 2.5 ml (50 gotas) con un colector de fracciones (Redirac, LKB) bajo condiciones de temperatura de 4°C. Las fracciones fueron analizadas por su absorbancia a 280 nm y por ELISA para determinar su contenido de actina; y aquellas que contenían únicamente actina fueron mezcladas y concentradas por filtración (Minicon, Amicon). Luego, las proteínas fueron dializadas exhaustivamente contra la solución G y se les determinó su contenido de proteínas como ya fue indicado anteriormente.

#### **4. Evaluación de actina de cisticercos.**

**4.1. Electroforesis unidimensional.** El protocolo empleado fue el propuesto por Laemmli [57], para lo cual fueron empleados geles de poliacrilamida al 7.5% y 10% en presencia de dodecil sulfato de sodio (DSS), solución amortiguadora para fraccionamiento de Tris-glicina pH 8.3 (Tris 20 mM, glicina 153 mM) complementada con DSS al 0.08%. Previo al fraccionamiento, las muestras fueron diluídas (1:2) en la solución amortiguadora de muestra (Tris 50 mM pH 6.8, DSS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.005%) y sólo en los casos en los que se requirió, se adicionó urea 8 M y/o DTT 0.1 M; luego las muestras fueron incubadas 1 min. en baño maría a 90°C para favorecer su desnaturalización. Las condiciones de fraccionamiento en los geles fueron las mismas para todos los análisis (100V, 2 h) usando geles de poliacrilamida al 10% de 7 x 8 cm en una minicámara de electroforesis. Una vez efectuada la separación electroforética, los geles fueron recuperados y teñidos con azul de Coomassie o con plata (apéndice 3) o en su caso, los geles fueron electrotransferidos a membranas de PVDF.



**4.2. Electroforesis bidimensional.** Se aplicó un protocolo basado en lo propuesto por O'Farrell [58], el cual combina el isoelectroenfoque (primera dimensión) con la electroforesis en geles de poliacrilamida (segunda dimensión). Para la primera dimensión, efectuada en geles de poliacrilamida al 4%, fueron empleados anfolitos de amplio intervalo (Bio Lyte 3-10, BioRad) adicionados en una concentración final del 4%. En los casos en los que se requirió, estos anfolitos de amplio intervalo fueron combinados con anfolitos de intervalo reducido (Bio Lyte 4-6, BioRad) en relaciones que variaban de 1:4 a 1:9. Previo a su separación electroforética, las muestras que se encontraban muy diluídas fueron precipitadas y resuspendidas en una solución amortiguadora de lisis (Urea 9.5 M, NP-40 2%, 2-mercaptoetanol 5%, anfolitos 4%), mientras que cuando se encontraban concentradas, fueron directamente mezcladas con esta solución. Una vez aplicadas las muestras a los tubos capilares (1 x 75 mm) que contenían los geles, estos fueron sometidos a la electroforesis bajo condiciones definidas (Inicialmente a 500 V, 15 min y luego a 750 V, 3.5 h). Después, los geles fueron extraídos de los capilares y congelados a -20°C inmediatamente sobre Parafilín en caso de que no fueran a ser utilizados en el momento. Luego, para el corrimiento electroforético en segunda dimensión, una vez que los geles fueron descongelados (en caso de que así se requiriera), fueron equilibrados por espacio de 5 a 10 min empleando una solución de equilibrio (Tris 62.5 mM pH 6.8, DSS 2.3%, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.001%). Para esta segunda dimensión, los geles de poliacrilamida fueron preparados a una concentración del 10% y las electroforesis fueron efectuadas en condiciones semejantes a las descritas para las electroforesis unidimensionales.

Los geles obtenidos de la electroforesis bidimensional, una vez que fueron recuperados, fueron teñidos con plata o transferidos a membranas de PVDF. Para la medición del pH de los

geles obtenidos de la primera dimensión, 5 geles capilares fueron cortados en trozos de 5 mm a partir del extremo ácido y los fragmentos resultantes fueron colocados en tubos de ensayo. A cada uno de los tubos se les adicionó agua desionizada y desgasificada exhaustivamente (1 ml), se les cubrió con Parafilm y se les colocó en agitación durante 2 h. Al término de este tiempo, el pH de cada uno de los tubos fue medido y con ello se trazó una curva de pH.

### 4.3. Análisis inmunoenzimáticos.

**4.3.1. Ensayo en placa o ELISA.** Alícuotas (100  $\mu$ l) de cada una de las fracciones recuperadas de las cromatografías en columna, descritas anteriormente, fueron adsorbidas a los pozos de placas de poliestireno MaxiSorp (4°C, toda la noche); luego de la adsorción, las placas fueron lavadas (3 veces) con SSAF complementada con Tween 20 al 0.3% (SSAF-Tween) y posteriormente bloqueadas con leche descremada al 5% en SSAF-Tween (30 min, 37°C, 200  $\mu$ l /pozo). Transcurrido el tiempo del bloqueo, nuevamente las placas fueron lavadas e inmediatamente después se les aplicaron los anticuerpos policlonales anti actina en conejo (1:1750) o los AcM 4B3 (sobrenadantes totales de cultivo) que reaccionan con miosina de *T. solium*. Nuevamente, en presencia de estos anticuerpos primarios, las placas fueron incubadas (2 h, 37°C, 100  $\mu$ l/pozo) y el exceso de anticuerpos fue eliminado por otros lavados. Una vez que se eliminó el exceso de anticuerpos se aplicaron los anticuerpos secundarios anti IgG de conejo en cabra (1:1500) y anti IgG de ratón en cabra (1:1000) conjugados a peroxidasa respectivamente. Estos anticuerpos previamente habían sido disueltos en SSAF y para su incubación se usaron las mismas condiciones descritas para los anticuerpos primarios. Finalmente, luego de los lavados de las placas y con la finalidad de revelar la actividad enzimática de los conjugados de los anticuerpos secundarios, fueron adicionados (100  $\mu$ l/pozo)

el sustrato y el cromógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$  0.012% y o-fenilendiamina 0.04% en amortiguador de citratos pH 4.0 respectivamente). El desarrollo del color fue permitido hasta que se paró la reacción enzimática por adición de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N (100  $\mu\text{l}$ /pozo) y todas las lecturas de absorbancia fueron hechas con un filtro de 492 nm en un lector de ELISA (BioRad).

**4.3.2. Inmunoelectrotransferencia.** Una vez que las proteínas fueron separadas en los geles de poliacrilamida, fueron electrotransferidas a membranas de polivinildifluoruro (PVDF; Millipore) bajo condiciones definidas (100 mA, 12-16 h, 4°C). Luego de la electrotransferencia, las membranas fueron recuperadas y tratadas para efectuar las inmunoprecipitaciones con los anticuerpos. Para la comprobación de la transferencia de las proteínas del gel a la membrana, el gel fue teñido luego de la transferencia con zinc-imidazol y la membrana, con rojo de Ponceau S (Ver apéndice 3). Inmediatamente después de haber obtenido las membranas, estas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en SSAF-Tween, lavadas con SSAF-Tween e incubadas primero 3 h con los anticuerpos policlona anti actina (1:750) y luego 2 h con los anticuerpos anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa (1:1000). Al final, las membranas fueron hechas reaccionar con el sustrato y el cromógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$  0.03% y DAB 0.05% en SSAF respectivamente) y la reacción enzimática fue detenida por adición de agua destilada en el momento que se consideró conveniente durante la aparición de las bandas de inmunoprecipitación. Todo el proceso de lavado de las membranas, en los tiempos requeridos, se hizo de manera semejante a lo descrito para ELISA. Con la finalidad de intensificar la reacción colorida de las bandas inmunoprecipitadas, se añadió al sustrato cromogénico una solución de sulfato de amonio y níquel al 0.93% a razón de 1 ml/20 ml de sustrato [59].

**4.3.3. Inmunopunto.** Este proceso fue efectuado con la idea de evaluar la presencia de actina, en las diferentes fracciones recuperadas de la columna de afinidad por DNasa I, analizando al mismo tiempo la presencia de actina y miosina con anticuerpos antiactina y antimiosina como los descritos en la sección correspondiente al ELISA. Cada una de las muestras (10  $\mu$ l) fueron adsorbidas, empleando un aparato para dot-blot (BioDot, BioRad) , mediante aplicación de vacío a membranas de PVDF previamente activadas. Normalmente el período de adsorción permitido a la membrana fue de 30 min. Luego, una vez que las membranas fueron identificadas, bloqueadas, lavadas y hechas reaccionar con los anticuerpos y los sustratos respectivos tal y como fue indicado en la sección anterior relacionada con la IET.

**Nota:** En el caso de los reactivos en los que no se indique el proveedor, estos productos fueron adquiridos de Sigma. Los anticuerpos policlonales empleados fueron adquiridos de Zymed.

## V. RESULTADOS.

1. **Obtención de miofilamentos.** La cuantificación de las proteínas presentes en cada uno de los pasos del proceso de obtención de los miofilamentos se utilizó como base para el cálculo del rendimiento de miofilamentos luego de su comparación con los extractos crudos (Tabla 1).

	Concentración (mg/ml)	Cantidad (mg)	Rendimiento (%)
Extracto inicial	9.1	424.06	100.0
Precipitado de diálisis	13.5	175.50	41.3
Sobrenadante de diálisis	6.4	213.12	50.2
Miofilamentos	22.6	117.52	27.7

**Tabla 1.** Rendimiento de los miofilamentos obtenidos.

Los resultados obtenidos muestran que hasta la obtención de miofilamentos existe una pérdida mayor del 50% del contenido proteico, durante los diferentes pasos. Aunque la cantidad de proteínas totales disminuyó conforme se obtienen los miofilamentos, el proceso permitió concentrarlas y lo cual indica que esta forma de obtención de miofilamentos es una manera adecuada de recuperar proteínas concentradas del citoesqueleto.

La determinación de la calidad de las proteínas contenidas en los miofilamentos mediante su análisis en geles de poliacrilamida, mostró que se encuentran sin degradación aparente (Fig. 8A). Luego, una vez electrotransferidas las proteínas y hechas reaccionar con anticuerpos antiactina, se observó que los anticuerpos no sólo reaccionaron con la fracción de 43 kDa sino que también lo hicieron con otra fracción de mayor peso molecular (aproximadamente 70 kDa) (Fig. 8B). Cabe aclarar que la fracción de 43 kDa fue detectada en todos los pasos de purificación y aparentemente la intensidad de reacción de esta fracción con los anticuerpos antiactina fue menor en el sobrenadante que se obtuvo al final

de la preparación de los miofilamentos. De igual manera, tanto en el sobrenadante del paso posterior a la diálisis, como en el sobrenadante de la obtención de los miofilamentos (carriles 4 y 6; fig. 8B) se observó que una fracción de 70 kDa aparentemente era enriquecida y fue el último paso en el proceso de purificación en donde se le encontró de forma predominante. De acuerdo al poder resolutivo de la concentración del gel empleado la fracción de 70 kDa pudiera contener a un duplete muy cercano. No sólo durante la purificación se observó la aparición de esta banda de 70 kDa, sino que también se le observó en menor concentración en muestras de extractos crudos. De acuerdo con estos resultados, la preparación de los miofilamentos favorece la obtención de esta fracción proteica que esta relacionada con actina por el reconocimiento de los anticuerpos antiactina, ya que en los geles teñidos con plata (Fig. 8A) se observa que en las muestras existen otras fracciones proteicas diferentes a actina. Esta fue la razón para mejorar el proceso de purificación de los filamentos de actina.

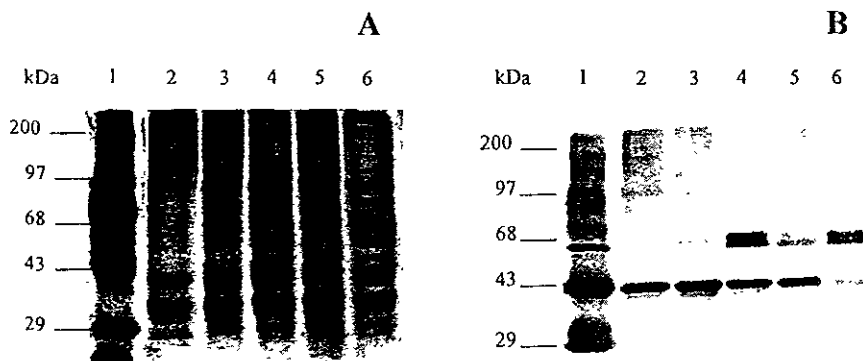


Figura 8. Análisis por electroforesis e inmunoelectrotransferencia de actina en extractos semipurificados. Las proteínas obtenidas a partir del extracto con NaCl 0.2 M (30 µg) fueron sometidas a fraccionamiento por gel de poliacrilamida al 7.5% (A) es cual fue teñido posteriormente con azul de Coomassie. Todas las muestras fueron previamente incubadas en baño maría a ebullición (5 min.) en presencia de urea 8 M y ditiotreitól 0.1 M. La evaluación de la presencia de actina en las muestras se hizo mediante su electrotransferencia a membrana de PVDF (B). Marcadores de pesos moleculares preteñidos (carril 1), sobrenadantes de KCl 0.6 M (carril 2), de la diálisis (carril 4) y de miofilamentos (carril 6). Precipitado de diálisis (carril 3), miofilamentos (carril 5). El revelado de las proteínas transferidas se hizo mediante el empleo de anticuerpos antiactina, antiIgG de conejo conjugado a peroxidasa y como sustratos fueron usados la DAB y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**2. Cromatografía de exclusión molecular en Sepharosa CL-4B.** En la calibración de la columna con los marcadores, se encontró que ellos eran eluidos en diferentes volúmenes: azul dextrán (78 ml), apoferritina (167ml), albúmina (192ml) y anhidrasa carbónica (207 ml). Con base en estos resultados se consideró que el volumen de elución del azul dextrán podría corresponder al esperado para la actina polimerizada.

Posteriormente, cuando fueron sometidos los miofilamentos a filtración en el gel de Sepharosa CL-4B, se encontró que el perfil de elución de proteínas (medido a 280 nm) presentaba 4 picos cromatográficos (Fig. 9). Las fracciones que conformaban estos picos fueron mezcladas y agrupadas en 5 lotes. El primer pico, que contenía la mayor cantidad de proteína de los demás picos, fue eluido en un volumen cercano al volumen de exclusión de la columna; de acuerdo con la calibración de la columna en estas fracciones se encuentran proteínas de peso molecular elevado ( $> 2,500$  kDa). Este mismo pico, al ser analizado por ELISA con anticuerpos antiactina y AcM 4B3, mostró que puede ser dividido en 2 regiones: la primer región (1A) fue reconocida principalmente por anticuerpos antiactina (fracciones 45-50) y fue reconocida en menor grado por los AcM 4B3; la segunda región (fracciones 51-64) fue reconocida principalmente por los AcM 4B3 y en menor proporción por los anticuerpos antiactina. Los otros picos cromatográficos (2,3 y 4), contienen menor cantidad de proteínas, que también fueron reconocidas por los anticuerpos antiactina. De acuerdo a la estrategia experimental usada es posible que en el pico 4 se encuentre actina no polimerizada.

Los cálculos de la cantidad de actina obtenida en el proceso cromatográfico se encuentran presentadas en la tabla 2. Como se observa, partiendo de una cantidad de 56 mg de miofilamentos, sólo el 1.16 % de esta cantidad corresponde a actina según el fraccionamiento y el análisis de ELISA. Aunque en la región 1B se encuentra la mayor cantidad de proteína recuperada desde la columna, el pico presenta fracciones que tienen

una mezcla de actina y miosina. De cualquier manera, la cantidad de actina que se obtiene de su purificación por columna tiene un rendimiento pobre ya que existe una pérdida alta durante el proceso.

Pico	Fracciones	Concentración (µg/ml)	Cantidad de proteína (µg)	Rendimiento (%)
1A	45-50	62.40	652.0	1.16
1B	51-63	170.00	3315.0	5.90
2	77-85	0.04	217.5	0.39
3	100-105	29.00	22.5	0.04
4*	139-160	0.53	4.0	0.01

Tabla 2. Rendimiento del fraccionamiento de miofilamentos en la columna de Sepharosa CL-4B. \* El pico 4 fue concentrado para poder cuantificarlo.

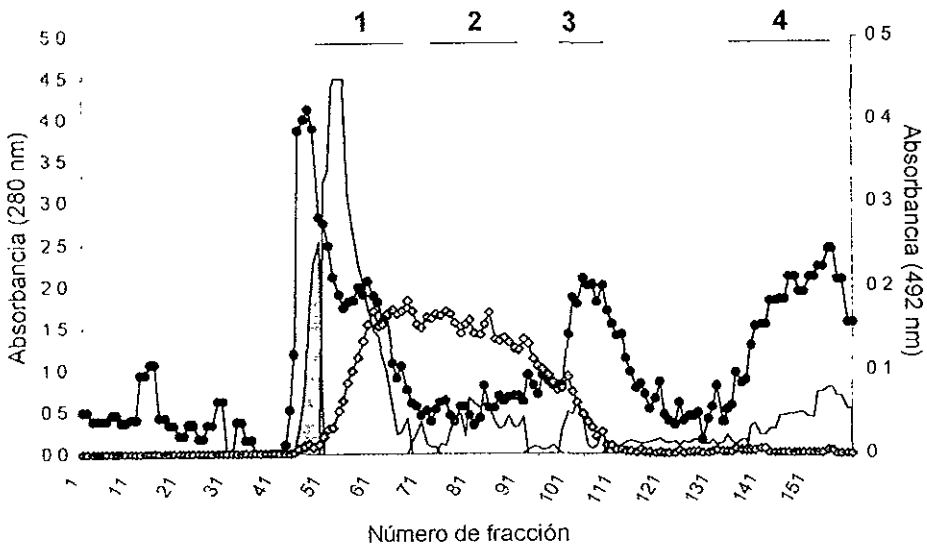


Figura 9. Fraccionamiento de actina por Sepharosa CL-4B y análisis inmunoenzimático. Los miofilamentos obtenidos (56mg) fueron aplicados a la columna de Sepharosa CL-4B (50 x 2.5cm) y eluidos (14 gotas/min) con Tris 1M pH 7.0, MgCl<sub>2</sub> 0.2mM, DTT 0.2mM, ATP 0.2mM. Las fracciones colectadas (1.5 ml) fueron leídas espectrofotométricamente (280 nm) y evaluadas por ELISA para la detección de actina por medio de anticuerpos antiactina (1:750) y de miosina por medio del AeM 4B3 (sobrenadante de cultivo). Los anticuerpos secundarios correspondientes estaban conjugados a peroxidasa, el sustrato empleado fue OPD y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reacción fue detenida con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y las lecturas fueron hechas a 492nm. El área sombreada corresponde a las fracciones que contienen actina purificada. Los números en la parte superior de la gráfica indican la ubicación de los picos cromatográficos (1, 2, 3, 4).

Actina (●-●), Proteínas 280nm (- -) Miosina (◊-◊)



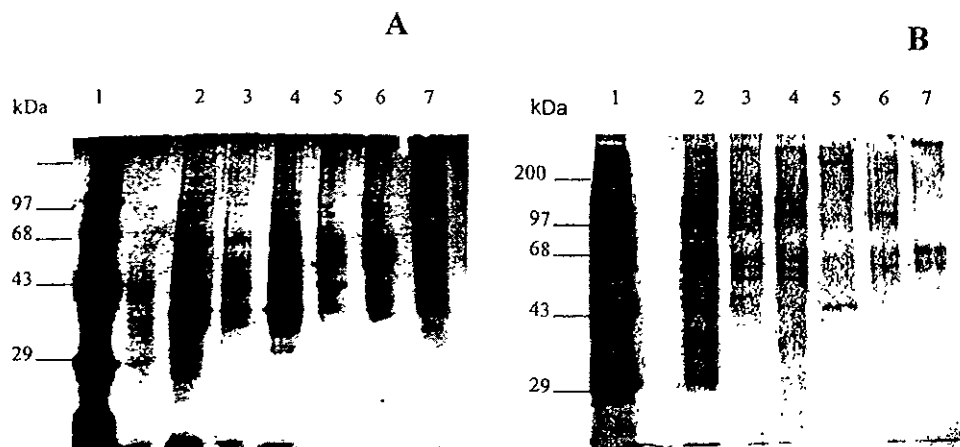
Aparentemente, según la combinación de resultados de la cromatografía y ELISA, basados en el volumen de exclusión y la detección de actina, este método en columna permite la purificación de actina polimerizada; y en el pico 4, de actina en forma monomérica, pero la comparación de los rendimientos indica que el método de purificación favorece que predomine la actina polimerizada.

En el análisis por electroforesis se observa que las muestras presentan un posible enriquecimiento en algunas fracciones antigénicas (principalmente en un duplete de aproximadamente 70 kDa) de acuerdo a su extracción y su fraccionamiento (Fig. 10A). Las fracciones contenidas en el duplete, luego del análisis por IET (Fig. 10B), fueron reconocidas intensamente por los anticuerpos antiactina. Por otro lado, aunque la actina monomérica (43 kDa) podría estar presente en todos los picos analizados, no hubo reconocimiento de ella por los anticuerpos antiactina en la IET, sólo en los picos 1A y 2 (Fig. 9). Los pesos moleculares estimados de las fracciones antigénicas más reconocidas fueron de 73, 71, 65 y 43 kDa. La banda de 65 kDa sólo pudo ser observada en los picos 1A y 1B.

Por otro lado, en las muestras de los picos 1B y 2 se observaron fracciones de peso molecular igual a 200 kDa, las cuales podrían corresponder a la cadena pesada de las miosinas que copurificaron con la actina. Estos mismos picos de fraccionamiento, cuando fueron evaluados por ELISA con el AcM 4B3, mostraron que la miosina es una proteína copurificada.

Es posible, con relación a las fracciones contenidas en la muestra del pico 1A, que la actina F presente en este pico se despolimerizara, dado que para los análisis se empleó urea 8M, y por ello se obtuvieran productos de diferentes tamaños de peso molecular, de los cuales algunos fueron reconocidos por los anticuerpos antiactina en IET. Otras fracciones, no

reconocidas por los anticuerpos pero presentes en la electroforesis, podrían corresponder a proteínas que copurifican con actina y miosina pero que no fueron identificadas en el estudio.



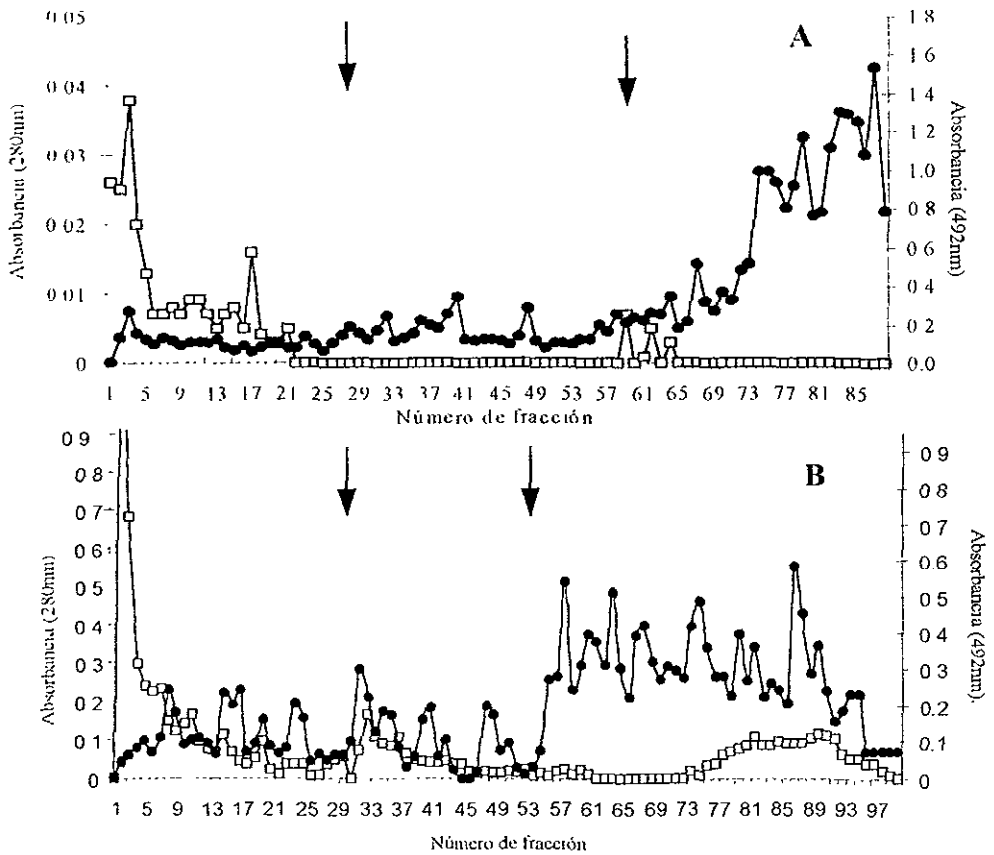
**Figura 10. Análisis por electroforesis e inmunoelectrotransferencia de la actina purificada en Sepharosa CL-4B.** Cada uno de los picos del fraccionamiento de los miofilamentos fueron analizados en geles de poliacrilamida al 10%, 1  $\mu$ g de proteína previamente incubada en baño maría a ebullición (5 min) en presencia de urea 8 M y ditiotreitól 0.1 M fue colocada en cada carril. Un gel fue teñido con plata (A) y otro fue electrotransferido a membrana de PVDF (B) y éste fue revelado con antiactina y anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa, DAB-Ni y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustratos. Marcadores preteñidos de pesos moleculares (carril 1), miofilamentos (carril 2), pico 1A (carril 3), pico 1B (carril 4), pico 2 (carril 5), pico 3 (carril 6) y pico 4 (carril 7).

**3. Cromatografía de afinidad a DNasa I.** Dos diferentes muestras fueron sometidas a la purificación por la Sepharosa-DNasa I: una correspondió al pico 1B recuperado del fraccionamiento por Sepharosa CL-4B y otra correspondió a los miofilamentos obtenidos durante la extracción de la actina.

En lo relacionado con el pico de fraccionamiento 1B, luego de su obtención, fue concentrado por precipitación con metanol (ver apéndice 1) con la intención de retirar las sales y despolimerizar la actina; luego, la muestra fue fraccionada en la columna. El perfil de elución obtenido (Fig. 11A) mostró la proteína total recuperada se encontraba en baja concentración y que esto podría deberse a la poca cantidad de muestra (2.58 mg) con la que

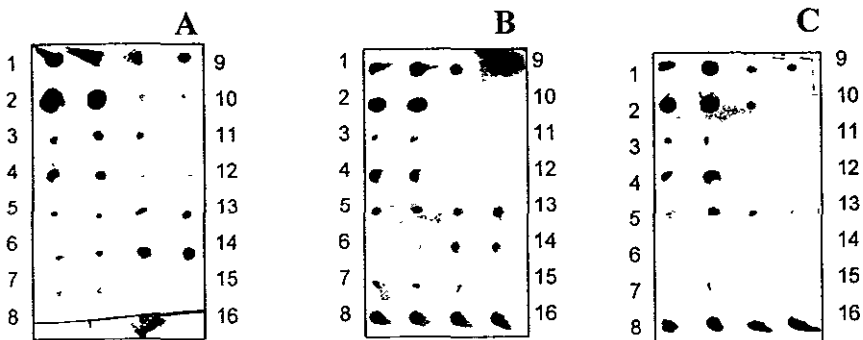
se hizo el fraccionamiento. La mayor parte de las proteínas, según lo medido por  $\lambda=280$  nm, no se unen a la columna y son retiradas durante el lavado. Luego fue aplicada la solución amortiguadora de elución en ausencia de formamida, pero no se recuperaron fracciones con proteínas. Sin embargo, cuando la formamida fue adicionada a la solución de elución, sólo en tres fracciones se detectó la presencia de proteínas. La evaluación de las fracciones obtenidas, mediante ELISA, mostró que luego de la elución hay aumento de actina según el reconocimiento dado por los anticuerpos antiactina y este reconocimiento fue mayor al utilizar la formamida como parte de la solución de elución. Debido a la baja concentración de la actina, no fue posible su cuantificación ni su análisis por electroforesis y esto motivó a tratar de purificar la actina a partir de miofilamentos.

Posterior a que los miofilamentos fueron concentrados y aplicados a la columna (30 mg), el patrón de elución obtenido fue diferente del obtenido para el pico recuperado por Sepharosa CL-4B (Fig. 11B): las fracciones con mayor cantidad de proteína eran eluidas primero y luego se obtuvieron otras fracciones con un descenso gradual de su cantidad de proteínas; estas primeras fracciones obtenidas correspondieron a proteínas que no se adsorbieron a la columna. Inmediatamente después de que se aplicó la primer solución de elución, se eluyeron fracciones que presuntamente contenían actina purificada. Posteriormente, con la adición de solución de elución con formamida, se obtuvieron inicialmente fracciones sin proteína, luego aparecieron otras con proteína y las cuales pudieran corresponder a fracciones con actina remanente que sólo fue despegada en presencia de formamida. El análisis de las fracciones por ELISA, mostró que en el tercer pico (en presencia de formamida) se presentaban los valores más altos de absorbancia debido a la reacción con los anticuerpos antiactina.



**Figura 11** Fraccionamiento de actina por Sepharosa 4B-DNasa I y análisis inmunoenzimático. Se evaluó la purificación a partir del pico 113 de la columna de Sepharosa CL-4B (porción no sombreada en la fig 7) (A) y a partir de miofilamentos (B). Previo a su fraccionamiento, las muestras fueron disueltas en solución amortiguadora G y aplicadas a la columna de DNasa I (10 mg en 3.5ml de resina). El fraccionamiento (50 gotas=2.5ml) fue realizado con solución amortiguadora G + KCl 0.1 M y en las gráficas se indica el momento en que fueron adicionadas las soluciones amortiguadoras sin y con formamida para la elución de la actina. Para la detección de actina, cada una de las fracciones (100µl) fue adsorbida a las placas y hecha reaccionar con anticuerpos antraftina (1:750) y anticuerpos anti IgG conejo-peroxidasa (1:1000). El revelado de la reacción enzimática fue hecho con OPD y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Proteínas 280nm (□-□), Actina 492nm (•-•).

La evaluación por inmunopunto con los anticuerpos antiactina y 4B3 de las diferentes fracciones obtenidas (Fig. 12) mostró que aún hay actina y miosina en las fracciones previas a la elución y se detectó la mayor cantidad de ambas proteínas en la primer fracción. Luego, al evaluar las fracciones resultantes de la adición de la solución de elución (sin o con formamida), la actina es eluída como lo muestra su reacción positiva con los anticuerpos antiactina. La evaluación de la actina purificada con los anticuerpos policlonales o monoclonales antimiosina mostró que en ambos casos la reacción es débil.



**Figura 12.** Evaluación de actina y miosina por inmunopunto luego del fraccionamiento por DNasa I. Las proteínas (10 µg) fueron adsorbidas a una membrana de PVDF, posteriormente la membrana fue bloqueada e incubada con los anticuerpos primarios, anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa (anticonejo para los anticuerpos policlonales y anti IgG de ratón para el AcM); y revelados con DAB y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Extracto crudo (1), miofilamentos (2), actina purificada de Sepharosa CL-4B (3), miosina de cisticerco de *T. solium* (4), miosina comercial (5), actina DNasa I (7), fracciones de lavado (9, 10, 11), actina de columna de DNasa I (12, 13, 14, 15), controles negativos, sin antígeno (6), sin anticuerpo primario (8) y sin anticuerpo secundario (16). Actina revelada con anticuerpos policlonales antiactina (A), Miosina revelada con anticuerpos policlonales antimiosina (B), Miosina revelada con AcM 4B3 (C).

La evaluación de la actina purificada a través de electroforesis e IET (Fig. 13) mostró que son dos las proteínas eluídas y que tienen un peso molecular muy semejante (60 y 70 kDa). Ambas proteínas son bien reconocidas por los anticuerpos antiactinas y su peso molecular es semejante a aquellas obtenidas al analizar la actina purificada por Sepharosa

CL-4B. Aparentemente, por electroforesis, estas proteínas no se encuentran en los extractos crudos, pero sí en los miofilamentos.

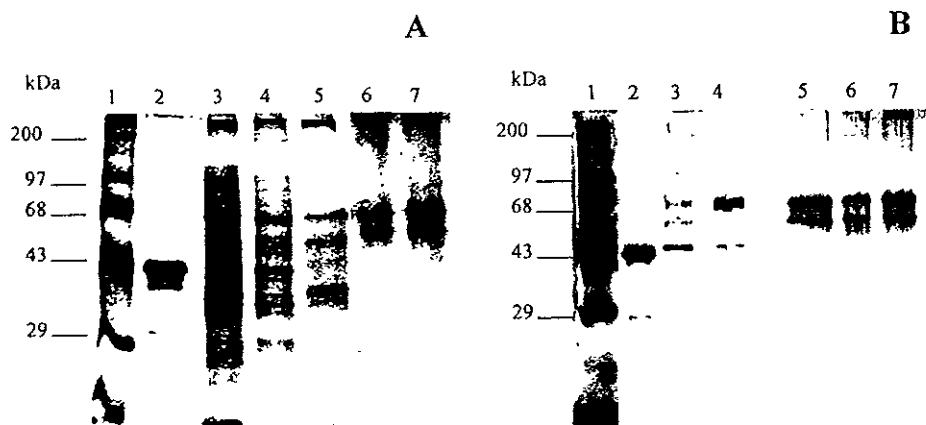


Figura 13. Evaluación por electroforesis e inmuno-electrotransferencia de actina purificada por DNasa I. Electroforesis en gel de poli-acrilamida al 10% (100 V, 2 h) y posterior tinción con plata (A) Inmuno-electrotransferencia del gel (B) a membrana de PVDF (100 mA, 16 h, 4°C), para la reacción inmunoenzimática se emplearon anticuerpos antiactina (1:750, 3 h), anti IgG de conejo-peroxidasa (1:1000, h) y DAB/Ni-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Marcadores de pesos moleculares preteñidos (carril 1), actina de músculo de conej (carril 2), extracto crudo de cisticerco (carril 3), miofilamentos (carril 4), actina de la columna de Sepharos CL-4B (carril 5), actina de la columna de DNasa I (carriles 6 y 7). Cada carril contiene 1 µg de proteína.

Una evaluación de todo el proceso de purificación de la actina, mostró que durante el proceso hay una disminución en la cantidad total de proteínas (rendimiento total luego de las eluciones 0.33%) e incluso, el valor calculado del rendimiento es menor para el que se obtuvo para la columna de Sepharosa CL-4B.

Fracciones	Cantidad (µg)	Rendimiento (%)
Previas a la elución (1-31)	993.5	3.30
Elución sin formamida (32-59)	81.4	0.27
Elución con formamida (74-97)	18.0	0.06

Tabla 3 Rendimiento del fraccionamiento de miofilamentos en la columna de Sepharosa 4B-DNasa I.

#### 4. Electroforesis Bidimensional.

**4.1. Extracto crudo.** En el gel resultante de la electroforesis, una vez que fue teñido con nitrato de plata, se observaron varias proteínas distribuidas a lo largo y ancho del gel (Fig. 14A). Varias de ellas estuvieron localizadas a nivel de los 43 kDa e incluso fueron reconocidas por anticuerpos antiactina (como se demuestra en las IET), estas proteínas aparentemente se encuentran concentradas en la zona ácida del gel, mientras que en la zona alcalina podría aparecer otra proteína. Aunque se tuvieron problemas experimentales para la medición exacta de los valores de pH a lo largo del gel, se hizo una estimación de que las proteínas podrían estar situadas entre los valores de pH de 5 y 6 respectivamente.

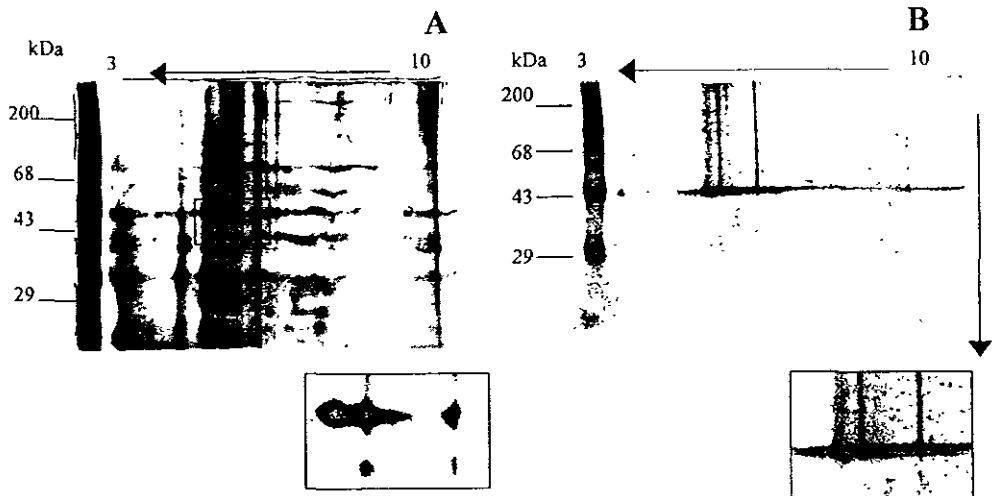


Figura 14. Evaluación por electroforesis bidimensional (pH 3-10) de actina contenida en extracto crudo de cisticercos de *T. solium*. 10  $\mu$ g de proteína fueron aplicados a geles capilares de poliacrilamida al 4% preparados con 4% de anfólitos de intervalo amplio de pH (3-10). Posteriormente, la segunda dimensión fue realizada en geles de poliacrilamida al 10% (100 V, 2 h). Gel de electroforesis teñido con plata (A). Inmuno-electrotransferencia (B) revelada con anticuerpos antiactina (1:750, 3 h) y anti IgG de conejo-peroxidasa (1:1000, 2 h), el sustrato fue DAB/Ni y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%. Los recuadros muestran una ampliificación de las zonas que contienen a las posibles isoformas de actina. Las flechas indican la dirección de los corrimientos electroforéticos (de derecha a izquierda, isoelectroenfoque; y de arriba hacia abajo, electroforesis en geles de poliacrilamida).

El número de proteínas de 43 kDa, que podrían corresponder a los monómeros de actina, no pudo ser definido debido a la resolución del gel (intervalo de pH 3-10). Sin embargo, el análisis por IET de un gel procesado al mismo tiempo (Fig. 14B), mostró que sólo en el intervalo de los 43 kDa había reconocimiento de actina monomérica por parte de los anticuerpos antiactina. De igual manera, la resolución del gel y su reactividad con los anticuerpos no permitió identificar el número de monómeros de actina reconocidos.

Los geles obtenidos, con el empleo de anfolitos de intervalo restringido (4-6), permitieron una mejor resolución de los geles bidimensionales analizados por IET. Cuando los geles fueron directamente teñidos con plata mostraron que, al igual que con los anfolitos de intervalo amplio, hay gran cantidad de proteínas (Fig. 15A). Según el IET, posiblemente los anticuerpos antiactina están reconociendo por lo menos cuatro monómeros diferentes (Fig. 15B), aunque la separación de las proteínas no es la óptima.

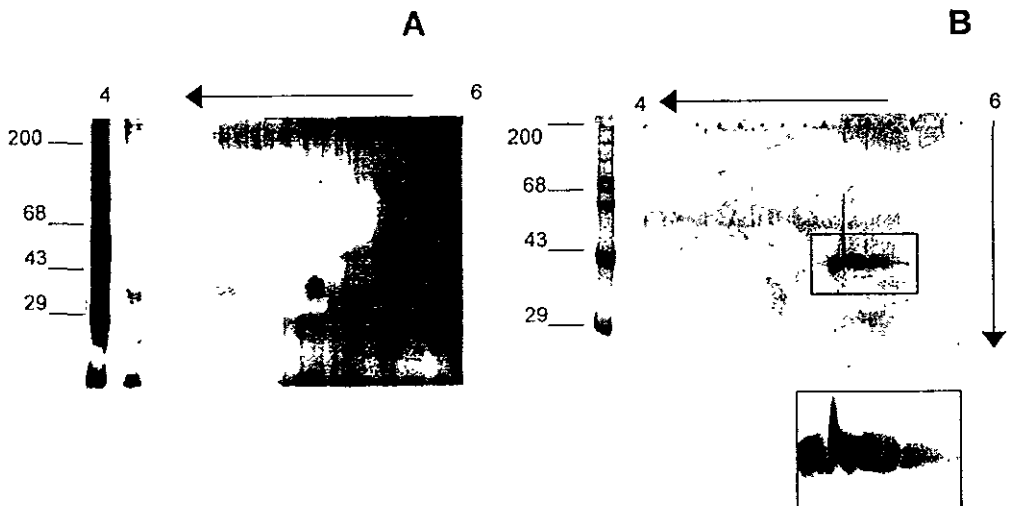


Figura 15. Evaluación por electroforesis bidimensional (pH 4-6) de actina contenida en extracto crudo de cisticercos de *T. solium*. 10  $\mu$ g de proteína fueron aplicados a geles con 2% de una mezcla de anfolitos de intervalo de pH 4-6 y 3-10 en proporción de 4:1. Gel de electroforesis teñido con plata (A). Inmuno-electrotransferencia (B) revelada con anticuerpos antiactina. El recuadro indicado muestra una amplificación de la zona que contienen a las posibles isoformas de actina. Las flechas indican la dirección de los corrimientos electroforéticos



**4.2. Miofilamentos.** Con la idea de generar geles con menor cantidad de proteína pero enriquecidos en las proteínas de estudio, fueron evaluados los miofilamentos obtenidos durante la purificación de la actina en presencia de anfolitos de intervalo de pH de 3-10. Sin embargo, los resultados obtenidos indican que aún se mantenía el problema por la gran cantidad de proteínas presentes (Fig. 16A). Luego del análisis por IET de dichos geles (Fig. 16B), aparentemente hay 3 isoformas ácidas y 2 más alcalinas de actina. Bajo estos mismos análisis, alrededor de los 60 kDa se observó otra posible única isoforma ácida que está bien definida y reconocida por anticuerpos antiactina. De igual manera que en el caso anterior, no fue posible la determinación de los valores de pH en donde se encontraban las proteínas.

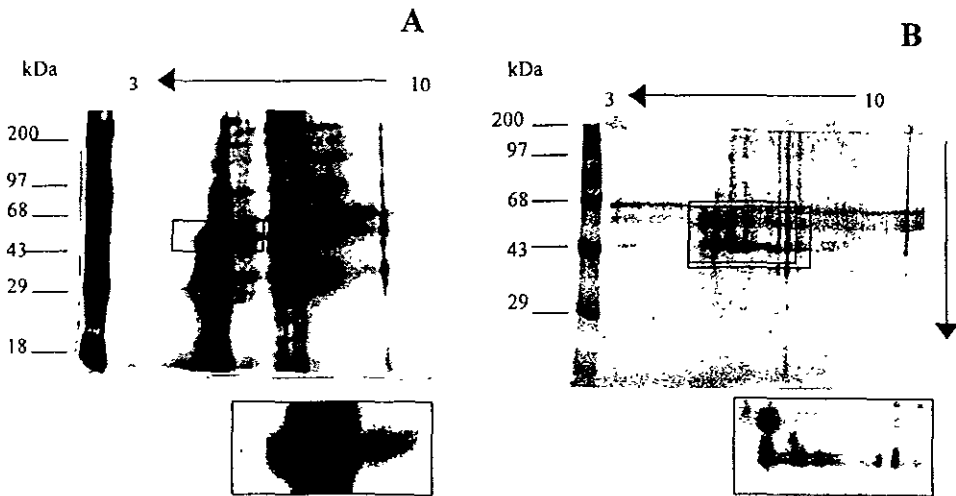


Figura 16. Evaluación por electroforesis bidimensional (pH 3-10) de actina contenida en miofilamentos de cisticercos de *T.solium*. 10 µg de proteína fueron aplicados a geles con 4% de una mezcla de anfolitos de intervalo de pH 3-10. Gel de electroforesis teñido con plata (A). Inmunoelectrotransferencia (B) revelada con anticuerpos antiactina. Los recuadros indicados muestran una amplificación de las zonas que contienen a las posibles isoformas de actina. Las flechas indican la dirección de los corrimientos electroforéticos.

Análisis posteriores de los miofilamentos con anfólitos de pH 4-6 (Fig. 17), mostraron un barrido de las posibles isoformas de actina a la altura del peso molecular de 43 kDa así como la aparición de un barrido similar en los 70 kDa, el pH donde aparece este barrido es de 5-6 y la posición es similar al sitio donde son reveladas las isoformas de actina en el extracto crudo.

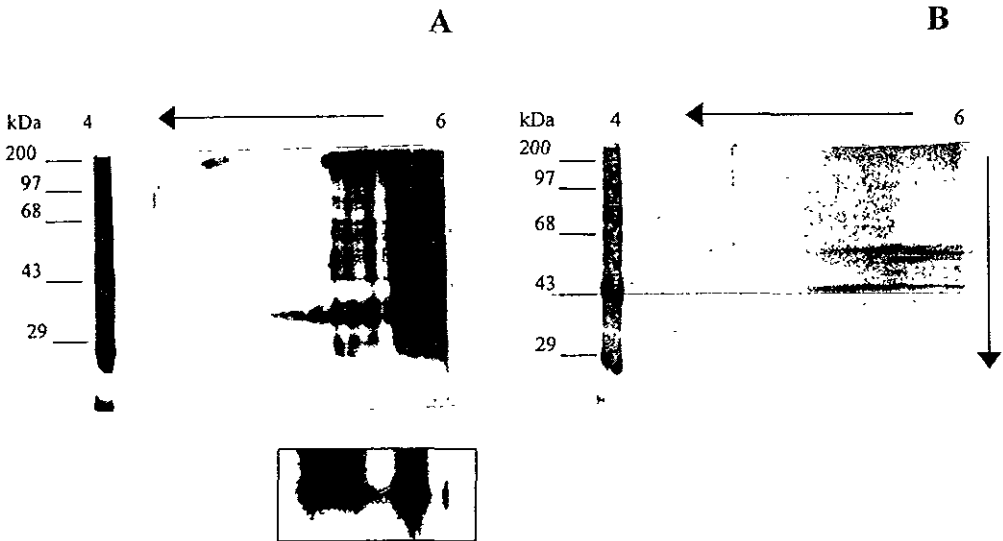


Figura 17. Evaluación por electroforesis bidimensional (pH 4-6) de actina contenida en miofilamentos de cisticercos de *T.solium*. 10 µg de miofilamentos fueron aplicados a geles con 2% de una mezcla de anfólitos de intervalo de pH 4-6 y 3-10 en proporción de 4:1. Gel de electroforesis teñido con plata (A). Inmuno-electrotransferencia (B) revelada con anticuerpos antiactina. El recuadro indicado muestra una amplificación de la zona que contienen a las posibles isoformas de actina. Las flechas indican la dirección de los corrimientos electroforéticos.

**4.3. Actina purificada.** No fue posible identificar proteína alguna en el análisis de la actina purificada por filtración en gel de Sepharosa CL-4B, tanto por tinción con plata como en la IET con anticuerpos antiactina, a pesar de que se colocaron 5 $\mu$ g de actina. Una de las causas podría ser la excesiva cantidad de sales en la muestra, que no fue retirada completamente por precipitación con cloroformo-metanol y la pérdida de la proteína en este proceso.

El análisis de la actina purificada por afinidad con DNasa I en electroforesis bidimensional empleando anfolitos de intervalo de pH 4-6 mostró la presencia de una sola mancha de 70 kDa tanto en la tinción con plata como en la IET con los anticuerpos antiactina, sin embargo, no fue posible distinguir el número de isoformas dentro de esta mancha (Fig. 18).

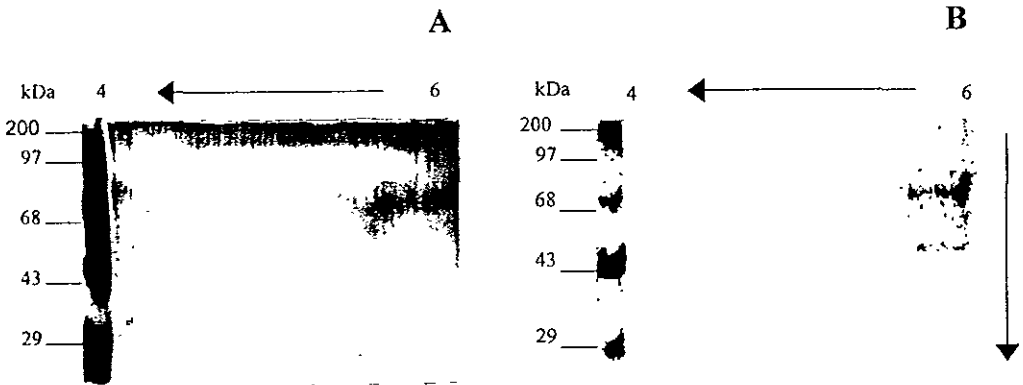


Figura 18. Evaluación por electroforesis bidimensional (pH 4-6) de actina purificada de cisticercos por afinidad con DNasa I. 10  $\mu$ g de actina purificada fueron aplicados a geles con 2% de una mezcla de anfolitos de intervalo de pH 4-6 y 3-10 en proporción de 9:1. Gel de electroforesis teñido con plata (A). Inmunoelectrotransferencia (B) revelada con anticuerpos antiactina. Las flechas indican la dirección de los corrimientos electroforéticos

## VI. DISCUSION DE RESULTADOS.

### 1. Purificación de actina.

Según los resultados de electroforesis e IET, con la obtención de miofilamentos a partir de los extractos proteicos, es posible la purificación simultánea de actina y miosina a partir de una misma población de cisticercos. Los miofilamentos, gruesos y delgados, son los componentes de las miofibrillas y en céstodos aparentemente son sintetizados por los miocitones [45]. La base de la obtención de los miofilamentos es la incubación de las miofibrillas en un medio relajante de fibras musculares, en el cual los iones  $\text{Ca}^{2+}$  son retirados por medio del EDTA y reemplazados por los iones  $\text{Mg}^{2+}$ , que inhibe la interacción entre actina y miosina [60]. Además, como la solución relajante tiene una fuerza iónica y un pH similar al fisiológico, permite que la integridad de los filamentos que las componen sea mantenida al proporcionar condiciones propias para la polimerización de actina [61]. Este método permite la obtención de actina (filamentos delgados) y miosina (gruesos) como lo muestra la figura 8, sin embargo este proceso de obtención de actina y miosina no es específico porque otras proteínas copurifican y posiblemente sean proteínas asociadas a actina o a miosina. A pesar de ello, el método es efectivo para iniciar la purificación de la actina, porque se eliminan varias proteínas sin alteración de las propiedades de la actina presente en las muestras y se permite su concentración en un volumen pequeño.

Una vez preparados los miofilamentos y con la idea de lograr la purificación de la actina se procedió a estandarizar la obtención de la misma por su filtración en gel de Sepharosa CL-4B. Este procedimiento se fundamentó en lo descrito por Pinder y col. [41]

para la purificación de actina de eritrocitos con el uso de Tris 1M, este método está basado en que una elevada concentración de Tris permite la disociación de la actina de los complejos multiproteicos en los cuales se encuentra, y su despolimerización; una vez despolimerizada la actina, es separada de los complejos de alto peso molecular por filtración en gel de Sepharosa CL-6B. En el caso de los miofilamentos de los cisticercos de *T. solium*, aunque fueron tratados con Tris 1M pH 7.0 y fraccionados en Sepharosa CL-4B; en su perfil de elución a 280nm y en su evaluación con anticuerpos antiactina por ELISA a 492 nm (Fig. 9) se observó que una gran parte de la actina se encuentra en forma polimerizada y que la despolimerización parece ser gradual; además, los picos con alta absorbancia a 492 nm (correspondientes a actina) coinciden con los picos visualizados a 280 nm. El análisis por electroforesis e IET de los picos mostró que en los picos 3 y 4 existen posibilidades de que la actina se encuentre en diferentes formas oligoméricas (Fig. 10). En el pico 4, las formas de 60 y 70 kDa (presuntamente dímeros de actina) podrían corresponder al producto final de la despolimerización de la actina. La explicación a la aparición de las especies de actina antes mencionadas podría deberse al empleo de Sepharosa CL-4B en lugar de la Sepharosa CL-6B originalmente empleada para la separación de las proteínas, lo cual altera el intervalo de peso molecular para su separación. La Sepharosa CL-6B separa proteínas entre 2,000 y 40 kDa, mientras que la Sepharosa CL-4B, entre 40,000 y 60 kDa [62]; esta última resina permite una mejor separación de las proteínas de alto peso molecular, por lo que es posible la separación de actina polimerizada (pico 1A); sin embargo, no permite la recuperación de la actina monomérica, ya que su peso molecular (43 kDa) está por debajo del límite inferior de resolución de la resina (60 kDa) y por consiguiente, la actina G es recuperada en baja proporción y es posible que siga eluyéndose más allá de las fracciones recuperadas.

El primer pico, según el análisis por ELISA y electroforesis, contiene dos subpoblaciones distintas: una compuesta por actina polimerizada (pico 1A) y otra, de actina asociada con miosina remanente, ya que la mayor cantidad de miosina fue previamente retirada en la fracción soluble en KCl 0.6M. De acuerdo a los resultados del fraccionamiento, es posible que se haya logrado la separación de los dos tipos de miofilamentos por la acción combinada del Tris 1M y la filtración en el gel de Sepharosa CL-4B. El Tris 1M permitió la disociación de la actina F desde los complejos multiproteicos en los cuales se encuentra, pero su acción despolimerizante fue gradual y sólo una pequeña proporción de la actina fue despolimerizada hasta dímeros de 60 y 70 kDa visibles por electroforesis e IET (Fig. 10); lo cual es contrario al conocimiento de que el Tris favorece una despolimerización inmediata. Aunque la actina G fue observable en las electroforesis, pero fue poco detectada en IET por los anticuerpos antiactina; esto pudo deberse a su baja cantidad, o a que bajo las condiciones experimentales empleadas esta forma es menos estable en comparación con las formas oligoméricas. El comportamiento de la actina de cisticercos de *T. solium* frente al Tris 1 M podría ser un indicio de que es diferente a la actina eritrocitaria ya que esta última sí es despolimerizada hasta actina G por el Tris 1M. Si la actina de cisticercos de *T. solium* resiste la despolimerización con Tris 1M, podría deberse a sus propiedades de polimerización o de estabilidad, que tendrían que ser evaluadas mediante estudios más profundos de las características moleculares de la actina (composición de aminoácidos, velocidad de polimerización, entre otras).

Debido a la necesidad de obtener actina G de cisticercos, se decidió emplear un método específico para este fin y para ello se procedió a su purificación por afinidad con DNasa I. La purificación de actina por este método es útil para la obtención de actina G con alto grado de pureza, ya sea como paso final de un proceso de purificación o como proceso único a partir de un extracto crudo [37]. La mayoría de las actinas estudiadas se unen a la

DNasa I, con excepción de las provenientes de *Entamoeba histolytica* y *Tetrahymena thermophila* [21, 63]; esta unión se da por medio de puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas en las que intervienen los aminoácidos 39-46 y 61-64 del subdominio 2 de la actina [20, 21, 63]. Por ello, al aplicar este método de purificación para la actina de *T. solium*, puede evaluarse al mismo tiempo si esta actina comparte la característica de unión a DNasa I con la mayoría de actinas conocidas. En el presente proyecto, la purificación por cromatografía de afinidad se realizó a partir de una suspensión de miofilamentos, los cuales fueron tratados para que la actina presente se encontrara en su forma no polimerizada. En las fracciones previas a la elución de actina se encontró actina tanto por ELISA como por inmunopunto (Fig. 12 y 13), y esto indica que una porción de la actina permaneció polimerizada o que el tratamiento previo alteró su capacidad de interactuar con la DNasa I; en estas fracciones además se detectó la presencia de miosina, lo cual indica que esta proteína fue eliminada por medio de la solución G con KCl 0.1M. El primer pico de actina eluída de la columna de DNasa I (Fig. 11) contiene a la actina capaz de polimerizar por la adición de  $Mg^{2+}$ , la eliminación de  $Ca^{2+}$  con EGTA, y el incremento de la fuerza iónica hasta KCl 1M. En el segundo pico de actina está la actina unida fuertemente a la DNasa I y con una baja capacidad de polimerización, probablemente por alguna modificación que sufrió la actina durante el proceso de su purificación. En nuestros experimentos fueron requeridos varios volúmenes de columna de solución G con formamida para eluir la actina remanente de la columna, esto debido a que la acción desnaturalizante de la formamida no es inmediata [38]; es posible que con el uso de una mayor concentración de formamida se reduzca el volumen de elución de la actina y se disminuya la dilución de la actina.

La purificación de actina G de cisticerco por afinidad con DNasa I a partir de miofilamentos no fue posible, a pesar de que el análisis de IET (Fig. 13) mostró que está

presente tanto en el extracto crudo como en los miofilamentos, en estas muestras y en la actina purificada también fueron reconocidas 2 bandas de aproximadamente 60 y 70 kDa, que pueden corresponder a dímeros de actina o a actina modificada durante el proceso de purificación. Estas bandas son similares a las observadas en el pico 4 de la purificación por filtración en gel y que aparecen en los diferentes picos de la cromatografía en Sepharosa CL-4B (Fig. 10); esto sugiere que estas formas son productos de la despolimerización de la actina F, ya sea por acción del Tris 1M o de una solución de baja fuerza iónica (solución G). Otro hecho que puede apoyar la aparición de actina en forma de dímeros es que la actina purificada tuvo una concentración por debajo de la concentración crítica de actinas no musculares, a las cuales es más parecida por su secuencia de aminoácidos (Tabla 2), y a que el  $Mg^{2+}$  está presente tanto en la solución de elución de la columna de afinidad como en la solución de Tris 1M; en estas condiciones la actina de mamíferos forma oligómeros [64], principalmente dímeros; además, bajo las condiciones experimentales empleadas las formas de 60 y 70 kDa tuvieron estabilidad y abundancia elevadas. De manera semejante, la actina de *Escherichia coli* obtenida por afinidad con DNasa I con el mismo sistema de elución presentó un peso molecular aproximado de 67 kDa, aun cuando por IET los anticuerpos antiactina reconocieron una banda de 43 kDa en un extracto total de la bacteria [56]. De acuerdo a estos resultados, es posible afirmar que el método empleado para la purificación de actina G de *T. solium* favorece la obtención de oligómeros de actina.

El rendimiento de ambos métodos de purificación de actina de cisticercos es muy bajo considerando que el paso previo a las cromatografías fue un enriquecimiento de actina en forma de miofilamentos. Los rendimientos típicos en la obtención de actina a partir de un extracto crudo están alrededor de 5% [40], que contrasta con los rendimientos obtenidos experimentalmente de 1.16% para la columna de Sepharosa CL-4B y de 0.33% para la columna de DNasa I; en el caso de la filtración en gel, es un proceso en el que de manera



normal los rendimientos son bajos debido a la dilución que sufre la muestra, mientras que en la cromatografía de afinidad la explicación del rendimiento bajo puede residir en alguna de las siguientes causas: 1) que una parte de la actina permaneció polimerizada y fue removida en la centrifugación previa al acoplamiento de la muestra en la columna, 2) que el despegado de la actina fue gradual mediante el sistema de elución seleccionado por lo que la actina no se concentró en un sólo pico cromatográfico de dimensiones mayores al observado, 3) que las propiedades de la actina hayan sido alteradas con los tratamientos previos. Los rendimientos más altos de actina purificada de otros organismos se han logrado con el empleo de la cromatografía de intercambio iónico (DEAE-celulosa) como un paso intermedio de enriquecimiento y la cromatografía de afinidad por DNasa I como paso final, con el empleo de otro sistema de elución en un sólo paso con formamida al 50%, o bien de urea 8M [40, 42, 44]. Estos agentes desnaturalizantes deben retirarse rápidamente para que no afecten las propiedades bioquímicas de la actina [38, 39].

## 2. Electroforesis bidimensional de actina.

La electroforesis bidimensional es una técnica ampliamente utilizada para diferenciar isoformas de actina con base en su punto isoelectrico y con este fin fue empleada para analizar la actina de *T. solium* [29, 65].

Inicialmente fueron empleados los anfolitos de intervalo amplio de pH para el análisis del extracto crudo (Fig. 14) y de los miofilamentos (Fig. 16) para localizar el intervalo de pH en que debía trabajarse para una mejor definición de las posibles isoformas; por electroforesis e IET se observó que la actina se situó en la región con un pH ácido

independientemente de la muestra analizada y que el número de manchas reconocidas por los anticuerpos antiactina era entre 3 y 4 en ambas muestras aunque no se logró una definición adecuada del número de manchas. La tinción con plata de los gels mostró que ambas muestras contienen gran cantidad de proteínas distribuidas a lo largo y ancho del gel, aunque la cantidad de proteínas en el extracto crudo es superior a las presentes en los miofilamentos, lo que confirma la eliminación de algunas proteínas en la obtención de éstos.

Cuando fueron empleados los anfolitos de intervalo de pH entre 4 y 6, las isoformas de actina fueron mejor definidas en IET con la muestra de extracto crudo (Fig. 15), aunque con la tinción con plata no se demostraron claramente estas manchas debido al intenso fondo de la tinción. De igual manera, en el caso de los miofilamentos (Fig. 17) las isoformas no pudieron observarse en el gel por el intenso fondo de la tinción aunque el patrón de distribución de las proteínas fue semejante al presentado en el extracto crudo; por IET tampoco pudo determinarse con exactitud el número de isoformas de actina reconocidas por los anticuerpos antiactina. Las posibles isoformas se presentaron en el mismo intervalo de pH en ambas muestras, el cual fue de 5.4 a 5.7. La falta de resolución de las manchas puede deberse a la presencia de DSS en la muestra, que altera la migración de las proteínas más ácidas, el DSS fue adicionado para solubilizar la actina junto con un detergente no iónico (NP-40) en una proporción de 1:2; la resolución podría mejorarse con el uso de anfolitos que generen un intervalo más restringido de pH (por ejemplo de 5 a 6) para ampliar la zona donde se concentran las isoformas de actina; o bien, con la adición del NP-40 en una proporción mayor para que no altere la carga de las proteínas o el uso de un detergente zwitteriónico no desnaturizante, como el 3-[(3-cloramidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfato (CHAPS), que es efectivo en la ruptura de interacciones proteína-proteína [65, 66].

El análisis de la actina purificada por Sepharosa CL-4B por electroforesis bidimensional no fue posible, entre las posibles causas están: la alta cantidad de sales que contiene la muestra, la pérdida de proteína durante la precipitación, alteración de las propiedades de la actina por el Tris 1 M, o una solubilización inadecuada con los detergentes empleados (SDS y NP-40). Por otra parte, en la actina purificada por DNasa I apareció sólo una mancha de aproximadamente 70 kDa, con un pI alrededor de 5.9 (Fig. 18); en IET fue necesario aplicar una cantidad mayor de proteína (40 mg) para que dicha mancha fuera reconocida por los anticuerpos antiactina, esto implica que algunos epitopos pudieron perderse por la exposición a la formamida o a los solventes orgánicos empleados en la precipitación. Debido a que no fue posible observar isoformas en las muestras de actina purificada, es necesario emplear otros métodos de purificación o análisis para definir el número de isoformas presentes en la actina purificada.

La presencia de isoformas de actina ha sido demostrada en varios invertebrados, desde insectos como *Drosophila melanogaster* y *Bombyx mori* hasta helmintos, como *Schistosoma mansoni* [67, 68]. Las isoformas de actina pueden ser producto de la expresión de varios genes que codifican para proteínas con secuencias de aminoácidos con un alto grado de homología, como en la mayoría de eucariotes superiores, o de la modificación postraduccional de la expresión de un solo gen, como en *Saccharomyces* [34, 63].

Dentro de una familia de isoformas de actina de una especie, el número de aminoácidos que son diferentes es de 6 a 18 para isoformas de insectos y de 4 a 26 para las de humano, por lo que podría esperarse una variación de este grado para la familia de isoformas de actina de *T. solium*; que se reflejaría en las diferencias en el pI de las isoformas observadas en electroforesis bidimensional [67]. Los cambios en las secuencias de las isoformas ocasionan funciones distintas y específicas para cada una de ellas, y

probablemente, diferencias en su expresión en tiempo y espacio; por ello, las isoformas de actina no son equivalentes [33]. Los principales cambios en las secuencias de actina de diversas fuentes ocurren en 3 regiones: residuos 1-10, 257-280 y 357-368; estas regiones comprenden sólo el 12% de la secuencia primaria, pero sirven como modificadores que adaptan las regiones más conservadas, en particular la unión a ATP, para papeles subcelulares particulares [21, 31]. Ha sido demostrado que son los efectos del cambio colectivo de aminoácidos, no de aminoácidos individuales, los que confieren propiedades únicas a las isoformas de actina, aunque algunos aminoácidos específicos de isoformas parecen ser más importantes que otros [33].

Las 3-4 isoformas de actina que fueron encontradas en el estadio de cisticerco de *T. solium*, por electroforesis bidimensional e inmunoelctrotransferencia, pueden corresponder a la expresión de algunas de las 3-8 secuencias similares a genes de actina encontradas en *T. solium*, dos de los cuales codifican para la misma secuencia de aminoácidos [50]. La regulación de la expresión de estos genes podría ser relevante para el ciclo de vida del parásito, sobre todo en los procesos en donde ocurre proliferación y diferenciación de algunas células (activación de la oncosfera y evaginación del cisticerco), porque es conocido que en las células en proliferación existen cambios en los patrones de expresión de las isoformas de actina [30].

En céstodos se conocen 3 tipos de actina, que son divergentes entre sí, y que han sido clasificados en un tipo muscular (cestoda I) y dos no musculares (cestoda II y cestoda III), por los estudios realizados en *Diphylobothrium dendriticum* [52]. De acuerdo a resultados preliminares de la distribución de la actina en cortes de cisticercos de *T. solium*, la actina presenta patrones de marca que podrían corresponder a los patrones descritos para *D. dendriticum* y lo cual implicaría la expresión de los 3 tipos de actina de céstodos.

Las actinas de los céstodos difieren entre sí en un grado similar al grupo de actinas de vertebrados, donde existen dos grandes grupos de isoformas: musculares y no musculares [34, 69]. En el caso de los invertebrados, en los insectos también existen isoformas no musculares y musculares, aunque éstas últimas difieren tanto de las formas citoplásmicas como de las musculares de vertebrados; por lo que es posible en las actinas de céstodos una clasificación similar, a pesar de que la secuencia de aminoácidos de estas actinas tienen una alta homología con las isoformas citoplásmicas de vertebrados [34, 67].

La composición de la región aminoterminal contribuye a las diferencias en el comportamiento de las isoformas de actina en geles de isoelectroenfoque [21, 34]. El hecho de que en el aminoterminal ocurran la mayor parte de los cambios de aminoácidos específicos de isoformas sugiere que estas substituciones modulan la interacción de las isoformas de actina con las proteínas asociadas a actina, y que a su vez estas interacciones regulan la participación de la actina en los diferentes procesos celulares en los que está involucrada [21, 31].

La mayoría de actinas conocidas son modificadas postraduccionalmente en el aminoterminal (excepto la de *Acanthamoeba castellanii*) por enzimas que remueven los primeros aminoácidos (normalmente Met y/o Cys), para exponer los residuos ácidos, y acetilan al nuevo extremo; por ello, es posible que la Met-1 y la Gly-2 de la actina de *T. solium* sean removidas postraduccionalmente para exponer los 3 residuos de naturaleza ácida (Asp-Glu-Glu), pero esto debe confirmarse experimentalmente con la secuencia de la proteína purificada [34]. La importancia de este proceso radica en el hecho de que su inhibición puede alterar el proceso de polimerización de la actina, porque las modificaciones en esta región producen cambios conformacionales que afectan un sitio de contacto

actina-actina; además, los residuos ácidos dentro de las primeras posiciones intervienen en la unión de actina a la fracción S1 de miosina y la activación de la actividad ATPasa de esta última [30, 63]. Estos residuos, junto con el C-terminal y los residuos alrededor del aminoácido en la posición 100 están localizados en el subdominio 1 y tienen una participación frecuente en la interacción de la actina con algunas proteínas asociadas a actina, como las que se unen a la forma monomérica (profilina y cofilina), las que cortan el filamento de actina (fragmina, gelsolina, actobindina) y las que se unen a la forma polimérica ( $\alpha$ -actinina y miosina) [20, 63].

### 3. Comparación de la secuencia aminoterminal de actinas.

Con la finalidad de determinar el pI teórico de la actina de *T. solium* cuya secuencia es conocida, se empleó la base de datos Swiss Prot ([www.expasy.ch/sprot/](http://www.expasy.ch/sprot/)) y se realizaron comparaciones de pI y de los 20 aminoácidos de la porción aminoterminal con las actinas de otros parásitos helmintos, así como de actinas citoplásmicas (clase I) y musculares (clase II) [50].

Las actinas seleccionadas para la comparación fueron las de *D. dendriticum* (ACT2 y ACT3) y *Echinococcus granulosus* (ACT1 y ACT2) por ser los céstodos de los que se tiene esta información; de *Caenorhabditis elegans* (ACT1, ACT2 y ACT 4) por ser un nemátodo ampliamente estudiado y cinco de las seis isoformas de mamíferos fueron empleadas como parámetros de comparación (Tabla 1).

El pI teórico de la actina de *T. solium* (5.30) es similar al estimado para las actinas citoplásmicas de mamíferos ( $\beta$  y  $\gamma$ ) así como para la actina  $\gamma$  de músculo liso. Dentro de los

céstodos, sólo es semejante con la ACT1 de *E. granulosus*, y es ligeramente más ácido que las ACT2 y ACT3 de *D. dendriticum* y de la ACT2 de *E. granulosus*. Cabe resaltar la secuencia de actina de *T. solium* es 100% homóloga con las ACT1 y ACT4 de *D. dendriticum*. Por otra parte, el pI teórico es más ácido el intervalo de pH donde fueron observadas experimentalmente las isoformas de actina de *T. solium* (5.5-5.7), sin embargo es posible que la secuencia de aminoácidos predicha corresponda a alguna de las isoformas observadas experimentalmente, debido a que los pI teóricos son una aproximación de los pI reales [66].

De las comparaciones de las secuencias aminoterminales de actinas de las diferentes especies se observa que prácticamente los 20 primeros aminoácidos de la actina de *T. solium* son similares a las ACT2 y ACT4 de *D. dendriticum*, que tienen una distribución predominantemente muscular (cestoda I), a pesar de ello el pI teórico de la ACT2 es ligeramente más alcalino, por lo que deben existir sustituciones en otras partes de la molécula que contribuyan a este cambio; sin embargo, tiene diferencias en 5-6 aminoácidos en las primeras 7-8 posiciones de las secuencias ACT1 y ACT2 de *E. granulosus* y de la ACT3 de *D. dendriticum*, estos cambios se reflejan en que el pI teórico de estas secuencias sea ligeramente más básica por el tipo de aminoácidos que son sustituidos (Ala y Thr). Respecto a las actinas del nemátodo *C. elegans*, con las ACT 1 y 4 existen sólo 3 diferencias en los 20 aminoácidos comparados, por ello su pI teórico es igual (5.30), mientras que son 6 los aminoácidos diferentes con la ACT2 de este mismo parásito, sin embargo estos cambios no influyen significativamente con el pI de esta actina que es ligeramente más ácido (5.29); cabe señalar que la comparación hecha con la actina de clase III de este parásito muestra que son 12 los aminoácidos diferentes y el pI es más alcalino, por lo que la actina de *T. solium* no pertenece a esta clase de actinas.

Especie	Clave SwissProt	Número de registro	pI teórico
<i>Taenia solium</i>	act_taeso	P14227	5.30
<i>Echinococcus granulosus</i> ACT1	act1_echgr	P35432	5.31
<i>Echinococcus granulosus</i> ACT2	act2_echgr	Q03341	5.37
<i>Diphyllobothrium dendriticum</i> ACT2	act2_dipde	P53456	5.39
<i>Diphyllobothrium dendriticum</i> ACT3	act3_dipde	P53457	5.38
<i>Caenorhabditis elegans</i> ACT1	act1_caeel	P10983	5.30
<i>Caenorhabditis elegans</i> ACT2	act2_caeel	P10984	5.29
<i>Caenorhabditis elegans</i> ACT4	act4_caeel	P10986	5.30
<i>Caenorhabditis elegans</i> actinlike	actl_caeel	P53489	6.15
$\alpha$ músculo esquelético de humano	acta_human	P02568	5.23
$\alpha$ vascular de humano	acth_human	P03996	5.24
$\beta$ citoplásmica de humano	actb_human	P02570	5.29
$\gamma$ citoplásmica de humano	actg_human	P02571	5.31
$\gamma$ músculo liso de humano	acts_human	P12718	5.31

**Tabla 1.** Comparación de los pI teóricos de actinas de diferentes fuentes. Los pI fueron calculados por medio de la base de datos Swiss Prot ([www.expasy.ch/cgi-bin/pi-tool](http://www.expasy.ch/cgi-bin/pi-tool)) con la secuencia completa de aminoácidos de cada una de las actinas.



Especie	Clase	Amino terminal
<i>Taenia solium</i>	I	M G D E E V Q A L V V D N G S G M C K A
<i>Echinococcus granulosus</i> ACT1	I	MA - - I T P - - - - - - - - - - - G
<i>Echinococcus granulosus</i> ACT2	I	MA - - D T A - - - I - - - - - - - - -
<i>Diphyllobothrium dendriticum</i> ACT2	I	- - - - - - - - - - - - - - - - - - -
<i>Diphyllobothrium dendriticum</i> ACT3	I	MA E N - D - G - - - I - - - - - - - - -
<i>Caenorhabditis elegans</i> ACT1	I	- C - D - - A - - - - - - - - - - - - -
<i>Caenorhabditis elegans</i> ACT2	I	- C - D D - A - - I L - - - - - - - - -
<i>Caenorhabditis elegans</i> ACT4	I	- C - D - - A - - - - - - - - - - - - -
<i>Caenorhabditis elegans</i> actinlike	III	- D S Q G R K V I - - - - - T - F V - C
$\alpha$ músculo esquelético	II	M C D E D - T T - - - C - - - - - L V - -
$\alpha$ vascular	II	M C E E - D S T - - - C - - - - - L - -
$\beta$ citoplásmica	I	M - D D I A - - - - - - - - - - - - -
$\gamma$ citoplásmica	I	M E - - I A - - - I - - - - - - - - -
$\gamma$ músculo liso	II	M E - - T T - - - C - - - - - C L - -

**Tabla 2.** Comparación de las secuencias aminoterminales (20 aminoácidos) deducidas para actinas de diferentes fuentes. Los aminoácidos idénticos a la secuencia de la actina de *T.solium* están indicados por guiones. Las secuencias fueron obtenidas de la base de datos Swiss Prot en Internet.

Al comparar la actina de *T. solium* con las actinas musculares, tienen 10 diferentes aminoácidos de los primeros 20 con las  $\alpha$  actinas y 7 diferentes con la actina  $\gamma$ , además de que el número de residuos ácidos es diferente de las  $\alpha$  actinas. Por ello, la actina de *T. solium* tampoco pertenece a la clase II.

Con respecto a las actinas citoplásmicas, la actina de *T. solium* difiere en sólo 5 aminoácidos de las actinas  $\beta$  y  $\gamma$ ; además de que comparte la presencia de 3 residuos de naturaleza ácida al inicio de la secuencia y de la Met-17, posición que en actinas musculares es ocupada por Lys; con este tipo de actinas la diferencia es de 10 aminoácidos en el aminoterminal; por su semejanza en la región aminoterminal y en el pI teórico con las actinas citoplásmicas es muy posible que la actina de *T. solium* pertenezca a la clase I.

## VII. CONCLUSIONES.

La actina de los cisticercos de *Taenia solium* es similar a las actinas de otros organismos, porque fue posible su purificación por extracción con Tris 1M y por cromatografía de afinidad con DNasa I. Sin embargo, podría tener diferencias con las actinas conocidas porque no pudo ser despolimerizada completamente por el Tris 1M y aparentemente la forma monomérica tiene corta estabilidad, y se observan posibles dímeros de actina con un peso molecular aproximado de 60 y 70 kDa.

La actina de *Taenia solium* puede ser purificada en forma polimerizada con el empleo de Tris 1M y cromatografía por exclusión molecular en Sepharosa CL-4B, aunque el rendimiento puede ser mejorado. Por otra parte, la purificación de actina monomérica por afinidad con DNasa I podría realizarse con el empleo de otro sistema de elución y el rendimiento puede mejorarse con el uso de la cromatografía de intercambio iónico como parte del proceso de purificación.

La actina de los cisticercos tiene isoformas (posiblemente 3 ó 4) con un pI entre 5.4 y 5.7 según el análisis por electroforesis bidimensional e inmunoelectrotransferencia; estos valores son similares a las de actinas de otras fuentes. Las isoformas de actina fueron encontradas en las muestras de extracto crudo y miofilamentos, pero no en la actina purificada.

Es posible que las isoformas de actina del cisticerco de *Taenia solium* tengan propiedades específicas que se reflejen en su localización y función biológica. El estudio de la composición de aminoácidos de estas isoformas y de su expresión en los diferentes tejidos y estadios del parásito conforman nuevas líneas de investigación al respecto.

## VIII. PERSPECTIVAS.

Es necesario optimizar los métodos de purificación de actina para mejorar el rendimiento. El método debe recuperar cantidades importantes de actina para realizar las siguientes actividades:

1. Resolver con exactitud el número de isoformas de actina en electroforesis bidimensional (o isoelectroenfoque). Con ello se podría intentar su aislamiento desde membranas de PVDF luego de su electrotransferencia.
2. Conocer la secuencia de aminoácidos de las isoformas de actina y compararlas con las de otras especies.
3. Determinar la localización tisular de las isoformas para confirmar los hallazgos de la distribución de actina F y con ello, inferir si las isoformas de cisticercos pueden tener alguna relación con los patrones descritos para *D. dendriticum*.
4. Encontrar las posibles diferencias entre las isoformas de los diferentes estadios de *T. solium*.

## IX. APENDICES

### 1. Precipitación de proteínas.

Los solventes orgánicos precipitan las proteínas por el cambio en la polaridad del medio. La evaporación del disolvente permite concentrar las proteínas en un volumen pequeño, útil para su análisis por electroforesis. Los solventes más empleados con este fin son el metanol, etanol y acetona [15, 56].

Procedimiento:

1. Adicionar 400  $\mu\text{l}$  de metanol absoluto por cada 100  $\mu\text{l}$  de solución de proteína.
2. Resuspender por pipeteo.
3. Agregar 100  $\mu\text{l}$  de cloroformo y mezclar bien.
4. Adicionar 300  $\mu\text{l}$  de agua.
5. Mezclar bien por pipeteo.
6. Centrifugar 1 min a 11,000  $g$ .
7. Desechar el sobrenadante, sin romper la interfase.
8. Adicionar 400  $\mu\text{l}$  de metanol y mezclar por pipeteo.
9. Centrifugar a 11,000  $g$  por 5 min.
10. Desechar el sobrenadante y conservar la pastilla.
11. Dejar evaporar el metanol al aire hasta que se deje de percibir su olor.
12. Almacenar la proteína a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2. Electroforesis en geles de poliacrilamida [57].

**2.1. Electroforesis unidimensional.** La electroforesis es un método empleado profusamente para la separación analítica de biomoléculas, que está basado en el movimiento de las moléculas cargadas en un inductor eléctrico utilizando un medio de soporte (que puede ser una solución amortiguadora, papel de nitrocelulosa, celulosa o geles de poliacrilamida, almidón o agarosa). Un método comúnmente empleado para el análisis de proteínas es la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). El SDS desnaturaliza las proteínas al romper interacciones no covalentes y les confiere una carga neta superficial negativa, bajo estas condiciones, las proteínas migran de manera diferencial dependiendo de su tamaño y de su peso molecular. La diferencia en la migración puede modularse por el tamaño de poro del gel, que es reflejo de la proporción y concentración de acrilamida y bisacrilamida, y por las condiciones de corrimiento, además de que las proteínas pueden someterse a condiciones reductoras mediante el empleo de 2-mercaptoetanol o ditiotreitól para romper puentes disulfuro, y a desnaturalización con urea 8M, con lo que las proteínas pierden su estructura secundaria sin modificación de su estructura primaria [15].

Los geles fueron preparados de manera discontinua, para ello se emplearon dos tipos de geles: un gel superior en el cual, mediante la formación de un gradiente de voltaje en la fase líquida, se concentra la muestra; y un gel inferior o separador en el cual se logra la separación de las proteínas.

### 2.1.1. Preparación de geles y corrimiento electroforético.

1. Lavar los vidrios con agua destilada y alcohol al 70%, secar con gasa.
2. Montar en el casting para la elaboración de geles en el siguiente orden: vidrio, 2 separadores y alúmina.
3. Preparar por separado las mezclas del gel separador y del gel concentrador (ver tabla 1), agregar el TEMED y el persulfato de amonio hasta el momento de usarse.
4. Agregar lentamente la mezcla del gel separador en el casting por medio de una pipeta, para evitar la formación de burbujas.

Soluciones	Gel concentrador	Gel separador	
		7,5%	10%
Concentración del gel	5%		
Acrilamida-bisacrilamida 30% (29.2:0.8)	625 $\mu$ l	5.0 ml	6.7ml
Tris 2M pH 8.8	----	3.75ml	3.75ml
Tris HCl 2M pH 6.8	315 $\mu$ l	-----	-----
DSS 10%	50 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l
Agua bidestilada	3.76ml	10.0 ml	8.35ml
Persulfato de amonio 1.5 % <sup>❶</sup>	250 $\mu$ l	1.0 ml	1.0 ml
TEMED <sup>❶</sup>	3.7 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l

**Tabla 1.** Soluciones requeridas para la preparación de los geles de poli(acrilamida).

❶ Agregar hasta el momento de usar.

5. Adicionar 200  $\mu$ l de isobutanol-agua bidestilada (1:1) sobre la superficie del gel, para formar una superficie plana.
6. Dejar polimerizar el gel por 1-2 h.
7. Lavar la superficie del gel con agua bidestilada para eliminar el isobutanol.
8. Secar la superficie del gel con papel filtro.
9. Vaciar la mezcla del gel concentrador sobre el gel separador previamente montado en la cámara de electroforesis.
10. Colocar el peine adecuado evitando la formación de burbujas.
11. Dejar polimerizar el gel por 1 h.
12. Retirar el peine y lavar los pozos con buffer de corrida.
13. Llenar la cámara con el buffer de corrida en la parte inferior y en la parte superior hasta el borde de la cámara.
14. Agregar las muestras, previamente hervidas en proporción 1:1 en amortiguador de muestra, en los pozos formados en el gel.
15. Conectar la cámara a la fuente de poder (Bio Rad Power Pack 1000) y ajustar a las condiciones de voltaje y/o amperaje requeridas.

**2.2. Electroforesis bidimensional.** Los métodos de electroforesis bidimensional han sido diseñados para separar a las proteínas con base en una propiedad molecular diferente en cada dimensión. El método más empleado para el análisis de mezclas complejas de polipéptidos es la separación de proteínas en la primera dimensión por isoelectroenfoque con base en su carga y luego la separación en la segunda dimensión en presencia de SDS con base en su peso molecular [66].

### 2.2.1. Soluciones para la primera dimensión [70].

#### Electrolito de ánodo NaOH 20mM

NaOH	0.2 g
Agua desionizada	250 ml

Degasificar al menos durante 2 h.

#### Electrolito de cátodo H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10mM

H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> al 85%	1342 µl
Agua desionizada	2000 ml

#### Amortiguador de lisis (A1)

Urea	2.85 g		
NP-40 10%	1.00 ml		
2-mercaptoetanol	0.25 ml		
Anfolitos 4-6	----	0.4 ml	0.45 ml
Anfolitos 3-10	0.5 ml	0.1 ml	0.05 ml

Llevar a 5 ml con agua desionizada y almacenar a -20°C.

#### Solución K o de recubrimiento.

Urea	2.7g
Anfolitos 3-10	0.25ml
Anfolitos 4-6	0.25ml

Llevar a 5 ml con agua desionizada y almacenar a -20°C.



### 2.2.2. Preparación y corrimiento del gel de la primera dimensión [70].

1. Sellar un extremo del tubo de casting con varias capas de Parafilm.
2. Llenar el tubo de casting con tubos capilares de modo que los extremos marcados con azul queden hacia el extremo abierto.
3. Mantener los tubos en posición vertical.
4. Preparar la solución de monómeros.

Reactivos	
Urea ❶	2.75 g
Acrilamida 30% (28.38:1.62)	665 µl
NP-40 10%	1.0 ml
Agua desionizada	955 µl
Anfolitos 4-6	200 µl
Anfolitos 3-10	50 µl
Persulfato de amonio 10%❷	5 µl
TEMED❸	5 µl

Tabla 2. Fórmula para la preparación de geles para la primera dimensión.

Notas. ❶ Disolver la urea en baño maría a 37°C. ❷ Agregar al final antes de servir.

5. Llenar una jeringa con la solución de monómeros y adaptar una aguja.
6. Insertar la aguja en el tubo de casting de modo que la punta quede por debajo del borde del tubo capilar. Los capilares deben llenarse desde el fondo, procurando no producir burbujas al vaciar la jeringa y que el tubo se llene a 3/4 partes de su capacidad.
7. Tapar el tubo de casting y remover las burbujas atrapadas.
8. Colocar en posición vertical el tubo y permitir la polimerización por 1-1.5 h.
9. Una vez polimerizado, retirar el Parafilm lentamente del tubo de casting y empujar los capilares hacia fuera.
10. Retirar la acrilamida del exterior de los tubos.
11. Conectar el extremo azul a los reservorios de muestra por medio de los conectores flexibles.
12. Enjuagar el fondo de los tubos con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM.

13. Fijar los capilares en el módulo para la primera dimensión.
14. Llenar el reservorio de muestra con NaOH 20 mM hasta el tope.
15. Llenar la cámara en su parte superior con NaOH 20 mM, cuidando que se sobrepasen los tubos. En la parte inferior colocar el H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM.
16. Conectar y precorrer: 10 min a 200 V, 10 min a 300 V y 10 min a 400 V.
17. Quitar las soluciones de ánodo y cátodo de la cámara.
18. Llenar con NaOH 20 mM fresco y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM frescos.
19. Adicionar la muestra resuspendida en amortiguador de lisis en un volumen igual al volumen de la muestra y colocar en los tubos 10 µg de proteína.
20. Adicionar 10 µl de solución K (Si es necesario, diluir 1:1 con agua).
21. Correr a 500 V, 10 min y a 750 V, 3.5 h.
22. Sacar los geles del capilar con una jeringa de 1 ml y ponerlos sobre un Parafilm.
23. Marcar el lado positivo y el negativo sobre el Parafilm.
24. Congelar a -20°C hasta su uso.

### 2.2.3. Preparación y corrimiento del gel de la segunda dimensión [70].

1. Preparar un gel de poliacrilamida al 10% sin gel concentrador y colocar un peine para geles preparativos.
2. Secar con papel filtro la superficie del gel.
3. Añadir una pequeña cantidad de solución de equilibrio y quitar las burbujas
4. Colocar el gel de la primera dimensión en 150 µl de solución de equilibrio de 1 a 3 min.
5. Quitar el exceso de solución de equilibrio y colocar el gel de la primera dimensión sobre la superficie del gel de la segunda dimensión con la ayuda de una espátula limpia.
6. Llenar la cámara con solución amortiguadora de corrida, con cuidado de no levantar el gel de la primera dimensión.
7. Correr a 100 V por 2 h.

### 3. Protocolos para tinción de proteínas en geles de poliacrilamida.

#### 3.1. Tinción con nitrato de plata.

Las tinciones con plata se basan en la reducción de la plata iónica a plata metálica por las proteínas, la plata metálica se precipita donde ocurre la reacción. Las proteínas deben ser fijadas y tratadas con un reductor y un oxidante sucesivamente para incrementar la sensibilidad, la cual está en el orden de los nanogramos. Esta tinción es útil para analizar y detectar cantidades pequeñas de proteínas [71, 72].

Procedimiento:

1. Fijar el gel en una solución de metanol al 50% y ácido acético al 10% durante 30min.
2. Incubar el gel en una solución de metanol al 5% y ácido acético al 1% durante 15 min.
3. Lavar con agua desionizada 3 veces, 5 min.
4. Incubar durante 90 s en una solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0.002% recién preparada.
5. Lavar con agua desionizada 3 veces, 30 s.
6. Incubar en una solución de  $\text{AgNO}_3$  0.2% durante un mínimo de 25 min.
7. Lavar con agua desionizada 3 veces, 60 s.
8. Revelar con una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  6%, formaldehído 0.0185% y  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .
9. Incubar hasta la aparición de bandas en el gel.
10. Detener la reacción con ácido acético al 6%.
11. Lavar con agua desionizada varias veces y conservar el gel en agua desionizada.

#### 3.2. Tinción inversa con zinc-imidazol.

Esta tinción se basa en la precipitación del complejo Zn-imidazol-DSS alrededor de las bandas proteicas en los geles de poliacrilamida, las cuales no se tiñen; la tinción es reversible y permite transferir el gel o electroeluir las proteínas de interés luego de desteñir el gel. Su sensibilidad es comparable a la tinción con plata [73].

Procedimiento:

1. Inmediatamente después de la electroforesis, incubar el gel en una solución de imidazol 0.2 M y DSS al 0.1% durante 15 min con agitación moderada.
2. Retirar la solución y enjuagar unos segundos con agua destilada.
3. Incubar el gel en  $ZnSO_4$  0.2 M durante 30-45 s.
4. Observar el gel contra un fondo oscuro para monitorear la aparición de bandas.
5. Descartar la solución y lavar abundantemente con agua para detener la reacción.
6. Conservar el gel en agua.
7. *En caso de que se requiera desteñir el gel, incubar en una solución de EDTA 1 M.*

### 3.3. Tinción con Azul de Coomassie.

La tinción se basa en la interacción de las proteínas con el colorante azul de Coomassie R-250, su sensibilidad se encuentra en el orden de los microgramos, y los geles teñidos pueden ser analizados por densitometría [74].

Procedimiento:

1. Después de la electroforesis, colocar el gel en una solución de azul de Coomassie R-250 0.06%, metanol 30%, ácido acético 10% en agua bidestilada.
2. Incubar durante toda la noche.
3. Eliminar el exceso de colorante con metanol 50%, ácido acético 10% en agua destilada.
4. Incubar con ácido acético al 10% para hidratar el gel y continuar el desteñido hasta que se considere conveniente.

### 3.4. Tinción con Rojo de Ponceau S.

Es una tinción reversible de membranas para comprobar la electrotransferencia de proteínas y se basa en la unión de las proteínas al colorante Rojo de Ponceau S. Su sensibilidad es del orden de los microgramos [59].

Procedimiento:

1. Después de efectuada la electrotransferencia, incubar la membrana de PVDF con una solución de Rojo de Ponceau S en ácido acético al 10%, durante 5 min.
2. Lavar con agua destilada hasta observar la aparición de bandas.
3. Para el desteñido total, lavar con agua ligeramente alcalinizada con NaOH.
4. Proseguir con el tratamiento de la membrana.

**4. Determinación de proteínas por el micrométodo colorimétrico de Bradford.** La técnica empleada para la determinación de proteínas está basada en un microensayo basado en el método propuesto por Bradford [75] utilizando el reactivo comercial Bio Rad Protein Assay. El fundamento del método es el virre del colorante azul brillante de Coomassie G-250 debido a su unión con las proteínas, que se debe a la afinidad del colorante hacia residuos de arginina y en menor proporción a los residuos de histidina, tirosina, triptófano, lisina y fenilalanina. La intensidad de la reacción es proporcional a la concentración de las proteínas presentes [76]. Para las determinaciones de concentración de proteína total en los extractos preparados se utilizó como estándar a la albúmina sérica bovina fracción V (ASB).

**4.1. Curva de calibración.** Las alícuotas del estándar de ASB (1mg/ml) de la curva de calibración con la concentración establecida (ver tabla 1), fueron colocadas en tubos de ensayo y posteriormente se les adicionaron el volumen correspondiente de agua para después de agitar adicionar 200 $\mu$ l del reactivo de Bradford (Bio Rad).

ASB 1mg/ml ( $\mu$ l)	Reactivo de Bradford( $\mu$ L)	H <sub>2</sub> O	A <sub>595 nm</sub>
0	200	800	0
2	200	798	0.129
4	200	796	0.266
6	200	794	0.327
8	200	792	0.484
10	200	790	0.570

Tabla 3: Curva de calibración de proteínas empleando el método Bio Rad.

**4.2. Determinación de la concentración en muestras problema.** Con los valores de absorbancia que se obtuvieron en la curva de calibración con ASB, se realizó una regresión lineal y con ella se interpolaron los valores de absorbancia presentados por las muestras para poder obtener su concentración de proteínas, considerando si hubo o no dilución inicial de las muestras analizadas.

---

## X. REFERENCIAS HEMEROBIBLIOGRÁFICAS

1. SARTI E. La teniosis y la cisticercosis por *Taenia solium*. *Salud pública de México*. 1997, 39: 225-231.
2. FLISSER A. Larval cestodes. En *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, COLLIER L, BALOWS A, SUSSMAN M (eds). Vol. 5. 9ª.ed, Arnold, EEUU, 1998, pp. 539-560.
3. AMBROSIO J, CRUZ-RIVERA M, ALLAN JC, MORAN E, ERSFELD K, FLISSER A. Identification and partial characterization of a myosin-like protein from cysticerci and adults of *Taenia solium* using a monoclonal antibody. *Parasitology*, 1997, 116: 545-553.
4. NOM-021-SSA-2-1994. Para la vigilancia, prevención y control del complejo teniasis/cisticercosis en el primer nivel de atención médica. D.O.F. Tomo CDXCIV. No. 9; 31, 58-67.
5. ALUJA A, ESCOBAR A, ESCOBEDO F, FLISSER A, LACLETTE JP, LARRALDE C, MADRAZO I, VELÁZQUEZ V, WILLMS K. *Cisticercosis. Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por Taenia solium*. Fondo de Cultura Económica, México, 1987.
6. ALLAN JC, AVILA G, GARCIA-NOVAL J, FLISSER A y CRAIG PS. Immunodiagnosis of Teniasis by coproantigen detection. *Parasitology*, 1990, 101: 473-477.
7. FLISSER A. Taeniasis and cisticercosis due to *Taenia solium*. En *Progress in Clinical Parasitology*, SUN T (ed), CRC Press, EEUU, 1994, pp. 77-116.
8. WHITE AC. Neurocysticercosis. A major cause of neurological disease worldwide. *Clinical Infectious Diseases*, 1997, 24: 101-115.

9. OPS, OMS. Informe de una reunión de consulta de la OPS/OMS sobre el complejo teniasis/cisticercosis. Washington, EEUU, 1997.
10. SCHANTZ PM, MOORE A, MUÑOZ J L, HARTMAN B , SCHAEFER J, ARON A, PERSAUD D, SARTI E, WILSON M, FLISSER A. Neurocysticercosis in an Orthodox Jewish community in New York City. *New England Journal of Medicine*, 1992, 327: 692-695.
11. ATÍAS A, NEGhme A. *Parasitología Clínica*. InterMédica, Argentina, 1979, pp. 14-17.
12. FAUST E, RUSSELL PF, JUNG RC. *Craig and Faust's Clinical Parasitology*. 8a.ed. Londres, Lea & Febiger, Filadelfia, 1974, 529-539.
13. GEMMELL M, MATYAS Z, PAWLOWSKY Z, SOULSBY E, LARRALDE C, NELSON GS, ROSICKI Z. *Guidelines for surveillance, prevention and control of teniasis/cysticercosis*. VPH/83.49. World Health Organization, Ginebra, 1983:1-207.
14. LACLETTE JP, ORNELAS Y, MERCHANT MT, WILLMS K. Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. En *Cysticercosis: Present state knowledge and perspectives*. FLISSER A, WILLMS K, LACLETTE JP, LARRALDE C, RIDAURA C, BELTRAN F. (eds), Academic Press, New York, 1982, pp. 307-361.
15. LEHNINGER A. *Biochemistry*. 2ª ed. New York, 1981.
16. PRESTON TM, KING CA, HYAMS JS. The molecular components of the cytoskeleton. Cap. II. En *The cytoskeleton and cell motility*. Chapman and Hall. New York, EEUU, 1990, pp. 6-37.
17. DARNELL J, LODISH H y BALTIMORE D. *Molecular Cell Biology*. 2da ed. Scientific American Books, New York, 1990.
18. MITCHISON TJ, CRAMER LP. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell*, 1996, 84: 371-379.



19. BRAY D. Actin filaments: structure and assembly. Cap.6. En: *Cell Movements*. Garland Publishers. EEUU, 1992, pp. 75-90.
20. POLLARD TD, COOPER JA. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annual Review of Biochemistry*, 1986, 55: 987-1035.
21. KABSCH W, VANDEKERCKHOVE J. Structure and function of actin. *Annual Review of Biophysical and Biomolecular Structure*, 1992, 21: 49-76.
22. WELCH MD, MALLAVARAPU A, ROSENBLATT J, MITCHISON T J. Actin dynamics in vivo. *Current Opinion in Cell Biology*, 1997, 9: 54-61.
23. HITT AL, LUNA EJ. Membrane interactions with the actin cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology*, 1994, 6: 120-130.
24. JANMEY PA, CHAPONNIER C. Medical aspects of the actin cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology*, 1995, 7: 111-117.
25. BRUGEROLLE G, BRICHEUX G, COFFE G. Actin cytoskeleton demonstration in *Trichomonas vaginalis* and in other trichomonads. *Biology of the cell*, 1996, 88: 29-36.
26. ZIGMOND A. Signal transduction and actin filaments organization. *Current Opinion in Cell Biology*, 1996, 8: 66-73.
27. FULTON AB. *The cytoskeleton*. Chapman and Hall, Londres, 1984.
28. NOEGEL AA, LUNA EJ. The *Dictyostelium* cytoskeleton. *Experientia*, 1995, 51: 1135-1143.
29. GARRELS W, GIBSON G. Identification and characterization of multiple forms of actin. *Cell*. 1976, 9: 793-805.
30. HERMAN, IM. Actin isoforms. *Current Opinion in Cell Biology*, 1993, 5: 48-55.

31. MOUNIER N, SPARROW JC. Structural comparisons of muscle and nonmuscle actins give insights into the evolution of their functional differences. *Journal of Molecular Evolution*, 1997, 44: 89-97.
32. ALLEN PG, SHUSTER CB, KÄS J, CHAPONNIER C, JANMEY PA, HERMAN IM. Phalloidin binding and rheological differences among actin isoforms. *Biochemistry*, 1996, 35: 14062-14069.
33. FYRBERG EA, FYRBERG CC, BIGGS JR, SAVILLE D, BEALL CJ, KETCHUM A. Functional nonequivalence of *Drosophila* actin isoforms. *Biochemical Genetics*, 1998, 36: 271-287.
34. RUBENSTEIN PA. The functional importance of multiple actin isoforms. *BioEssays*, 1990, 12: 309-315.
35. YAO X, CHAPONNIER C, GABBIANI G, FORTE JG. Polarized distribution of actin isoforms in gastric parietals cells. *Molecular Biology of the Cell*, 1995, 6: 541-547.
36. SPUDICH J, WATT S. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. *Journal of Biological Chemistry*. 1971, 246: 4866-4871.
37. LAZARIDES E, LINDBERG U. Actin is the naturally occurring inhibitor of Deoxyribonuclease I. *Proceedures of the National Academy of Sciences USA*, 1974, 71: 4742-4746.
38. ZEHEL K. Dissociation of the DNase-I-actin complex by formamide. *European Journal of Biochemistry*, 1980, 110: 337-341.
39. ZEHEL K. Isolation of polymerization-competent cytoplasmic actin by affinity chromatography on immobilized DNase I using formamide as eluant. *European Journal of Biochemistry*, 1980, 110: 343-348.
40. UYEMURA DG, SPUDICH JA. Biochemistry and Regulation of nonmuscle actins. En: *Biological Regulation and Development*, Vol.2. GOLDBERGER RF (ed), Plenum Publishing, 1980, pp. 317-338.

41. PINDER J, SLEEP J, BENNETT P, GRATZER W. Concentrated Tris solutions for the preparation, depolymerization, an assay of actin: Application to erythroid actin. *Analytical Biochemistry*, 1995, 225: 2291-295.
42. SCHAFER DA, JENNINGS PB, COOPER JA. Rapid and efficient purification of actin from nonmuscle sources. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 1998, 39: 166-171.
43. LUBIT BW, SCHWARTZ JH. An antiactin antibody that distinguishes between cytoplasmic and skeletal muscle actins. *Journal of Cell Biology*, 1980, 86: 891-897.
44. BUZAN JM, FRIEDEN C. Yeast actin: polymerization kinetic studies of wild type and a poorly polymerizing mutant. *Proceedures of the National Academy of Sciences USA*, 1996, 93: 91-95.
45. SMYTH JD, McMANUS DP. *The physiology and biochemistry of cestodes*. Cambridge University Press, Gran Bretaña, 1989.
46. GUERRA G, FLISSER A, CAÑEDO L, LACLETTE JP. Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of *Taenia solium*. En *Cysticercosis: Present state of the knowledge and perspectives*. FLISSER A, WILLMS K, LACLETTE JP, LARRALDE C, RIDAURA C, BELTRAN F (eds), Academic Press, New York, 1982, pp. 437-451.
47. LACLETTE JP, LANDA A, ARCOS L, WILLMS K. Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda). *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1991, 44: 287-296.
48. HOLY JM, OAKS JA. Cytoskeletal features of the syncytial epidermis of the tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 1989, 13: 41-56.
49. LUMSDEN RD, VOGEL M, SOGANDARES-BERNAL M. The metacestode tegument: fine structure, development, topochemistry, and interactions with the host. En *Cysticercosis: Present state knowledge and perspectives*. FLISSER A, WILLMS K, LACLETTE JP,

- LARRALDE C, RIDAURA C, BELTRAN F. (eds), Academic Press, New York, 1982, pp. 307-361.
50. CAMPOS A, BERNARD P, FAUCONNIER A, LANDA A, GOMEZ E, HERNANDEZ R, WILLMS K, LACLETTE JP. Cloning and sequencing of two actin genes from *Taenia solium* (Cestoda). *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1990, 40: 87-94.
51. daSILVA CMD, FERREIRA HB, PICÓN M, GORKINFIEL N, EHRlich R, ZAHA A. Molecular cloning and characterization of actin genes from *Echinococcus granulosus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1993, 60: 209-220.
52. WAHLBERG MH. Three main patterns in the expression of six actin genes in the plerocercoid and adult *Diphyllobothrium dendriticum* tapeworm (Cestoda). *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1997, 86: 199-209.
53. WAHLBERG MH. The distribution of F-actin during the development of *Diphyllobothrium dendriticum* (Cestoda). *Cell and Tissue Research*, 1998, 291: 561-570.
54. LACLETTE JP, MERCHANT MT, WILLMS K. Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *Taenia solium*. *Journal of Parasitology*, 1987, 73: 121-129.
55. HEIDCAMP WH. Isolation of actin and myosin filaments. En: *Cell Biology Laboratory Manual*. Gustavus Adolphus College, Minnesota, EEUU, 1996.  
<http://www.gac.edu/cgi-bin/user/~cellab/phpl?index-1.html>
56. GUERRERO-BARRERA AL, GARCIA-CUELLAR CM, VILLALBA JD, SEGURA-NIETO M, GOMEZ-LOJERO C, REYES ME, HERNANDEZ JM, GARCIA RM, DE LA GARZA M. Actin related proteins in *Anabaena* spp. and *Escherichia coli*. *Microbiology*, 1996, 142: 1133-1140.
57. LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 214: 680-665.

- 
58. O'FARRELL PH. High resolution two-dimensional electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*, 1975, 250: 4007-4021.
59. HARLOW E, LANE D. *Antibodies: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, EEUU, 1988.
60. GIESE AC. *Cell Physiology*. 4ª.ed. WB Saunders, EEUU, 1973, pp. 644.
61. HARDWICK PMD y HANSON J. Separation of thick and thin myofilaments. *Journal of Molecular Biology*, 1971, 59: 509-516.
62. MAIZELS RM, BLAXTER ML, ROBERTSON BD, SELKIRK ME. *Parasite antigens, parasite genes*. Cambridge University Press, Gran Bretaña, 1991, pp. 76-78.
63. HENNESSEY E, DRUMMOND DR, SPARROW JC. Molecular genetics of actin function. *Biochemical Journal*, 1993, 282: 657-671.
64. MOZO-VILLARIAS A, WARE BR. Actin oligomers below the critical concentration detected by fluorescence photobleaching recovery. *Biochemistry*, 1985, 24: 1544-1548.
65. TANNENBAUM J, RICH A. An isoelectric focusing study of plasma membrane actin. *Analytical Biochemistry*, 1979, 95: 236-244.
66. DUNBAR BS. *Two Dimensional Electrophoresis and Immunological Techniques*. Plenum Press, New York, 1987, pp. 17-20.
67. MOUNIER N, GOUY M, MOUCHIROUD D, PRUDHOMME JC. Insect muscle actins differ distinctly from invertebrate and vertebrate cytoplasmic actins. *Journal of Molecular Evolution*, 1992, 34: 406-415.
68. ABBAS MK, CAIN GD. Analysis of isoforms of actin from *Schistosoma mansoni* by two-dimensional gel electrophoresis. *Parasitology Research*, 1989, 76: 178-180.

69. WAHLBERG MH, JOHNSON MS. Isolation and characterization of five actin cDNAs from the cestode *Diphyllobothrium dendriticum*: a phylogenetic study of the multigene family. *Journal of Molecular Evolution*, 1997, 44: 159-168.
70. RICKWOOD D, CHAMBERS JA, SPRAGG SP. Two-dimensional gel electrophoresis. En: *Gel electrophoresis of proteins*. HAMES B, RICKWOOD D (eds), IRL press, Oxford, Inglaterra, 1990, pp 217-249.
71. BLUM H, BEIER H, GROSS HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 1987, 8: 93-99.
72. SHEVCHENKO A, WILM M, VORM O, MANN M. Mass spectrometric sequencing of proteins in silver stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, 1996, 68: 850-858.
73. FERNANDEZ-PATRÓN C, HARDY E, SOSA A, SEOANE J, CASTELLANOS L. Double staining of Coomassie Blue-stained polyacrylamide gels by imidazole-sodium dodecyl sulfate-zinc reverse staining: sensitive detection of Coomassie Blue-undetected proteins. *Analytical Biochemistry*, 1995, 224: 263-269.
74. MEYER TS, LAMBERTS BL. Use of Coomassie Brilliant blue R-250 for detection of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biophysical Acta*, 1965, 107: 144-145 .
75. BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
76. BIO-RAD. *Protein Assay*. Instruction Manual. Bio-Rad Laboratories, EEUU, 1981.