



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

INMUNOLocalización DE LAS LL-GP 14, 24 Y 50
SUBUNIDADES GLICOPROTEICAS ÚTILES PARA EL
DIAGNÓSTICO DE CISTICERCOSIS EN DOS ESTADIOS
DE DESARROLLO DE *Taenia solium*

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA:

MAYRA YOLANDA CRUZ RIVERA

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. ANA FLISSER STEINBRUCH
FACULTAD DE MEDICINA. UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. OSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ
INSTITUTO DE CARDIOLOGÍA. SSA

COMITÉ TUTOR:

DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS. UNAM

MÉXICO, D.F. ABRIL 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

INMUNOLocalización de las LL-GP 14, 24 y 50
SUBUNIDADES GLICOPROTEICAS ÚTILES PARA EL
DIAGNÓSTICO DE CISTICERCOSIS EN DOS ESTADIOS
DE DESARROLLO DE *Taenia solium*

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA:

MAYRA YOLANDA CRUZ RIVERA

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. ANA FLISSER STEINBRUCH

FACULTAD DE MEDICINA. UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. OSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ

INSTITUTO DE CARDIOLOGÍA. SSA

COMITÉ TUTOR:

DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS. UNAM

MÉXICO, D.F. ABRIL 2014

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 20 de mayo de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **CRUZ RIVERA MAYRA YOLANDA** con número de cuenta **90570157** con la tesis titulada **"INMUNOLocalización de las LL-GP 14, 24 y 50 subunidades glicoproteicas útiles para el diagnóstico de cisticercosis de dos estadios de desarrollo de *Taenia solium*"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ANA FLISSER STEINBRUCH**:

Presidente: DR. AGUSTÍN PLANCARTE CRESPO
Vocal: DR. EDGAR ZENTENO GALINDO
Secretario: DR. ÓSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ
Suplente: DRA. PATRICIA MARGARITA TATO ZALDÍVAR
Suplente: DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 25 de febrero de 2014

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

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

Al apoyo recibido por el proyecto CONACYT 129683.

A los miembros de mi comité tutor: Dra Ana Flisser Steinbruch, Dr. Oscar Pérez Méndez y al Dr.

Julio César Carrero Sánchez .

Tema	Página
i. Resumen	1
ii. Abstract	2
1. Introducción	3
1.1. Clasificación de <i>Taenia solium</i>	4
1.2. Ciclo de vida	4
1.3. Morfología	5
1.4. Características de algunas estructuras	8
1.4.1. Tegumento	8
1.4.2. Parénquima	8
1.4.3. Sistema de excreción	9
1.4.4. Sistema muscular	9
1.4.5. Órganos sexuales	10
1.5. Diagnóstico	11
1.5.1. Teniosis	11
1.5.2. Cisticercosis	11
1.5.3. Inmunoelectrotransferencia para cisticercosis	12
2. Objetivo	14
3. Antecedentes	15
3.1. Glicoproteínas en parásitos	15
3.2. Glicoproteínas recombinantes de <i>Taenia solium</i>	17
4. Diseño experimental	20
5. Materiales y Métodos	21
5.1. Obtención de parásitos	21
5.2. Proteínas recombinantes y anticuerpos anti LL-GP 14, 24 y 50	21
5.3. Titulación de Anticuerpos	22
5.4. Tinción de PAS	23
5.5. Ensayos de Inmunolocalización	23
6. Resultados	25
6.1. Titulación de anticuerpos por Inmunoelectrotransferencia	25
6.2. Tinción de PAS	26
6.3. Inmunolocalización	27
6.3.1. GP-14 en cisticercos de <i>T. solium</i>	27
6.3.2. GP-14 en proglótidos maduros y grávidos de <i>T. solium</i>	28
6.3.3. GP-24 en cisticercos de <i>T. solium</i>	29
6.3.4. GP-24 en proglótidos maduros y grávidos de <i>T. solium</i>	32
6.3.5. GP-50 en cisticercos de <i>T. solium</i>	34
6.3.6. GP-50 en proglótidos maduros y grávidos de <i>T. solium</i>	35
7. Discusión y Conclusiones	39
8. Referencias	43

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

Figura		Página
Figura 1.	Evaginación de un cisticerco de <i>T. solium</i>	7
Figura 2.	Representación tridimensional de un proglótido maduro	10
Figura 3.	Diseño experimental	20
Figura 4.	Western Blot para sueros anti-glicoproteínas (50,24 y14)	25
Figura 5.	Tinción PAS en cisticerco evaginado	26
Figura 6a.	Inmunolocalización de GP14 (1:400) en cisticercos evaginados	27
Figura 6b.	Inmunolocalización de GP14 (1:400) en cisticercos evaginados	28
Figura 7.	Inmunolocalización de GP14 (1:400) en el parásito adulto	29
Figura 8a.	Inmunolocalización de GP24 (1:400) en cisticercos evaginados	30
Figura 8b.	Inmunolocalización de GP24 (1:400) en cisticercos evaginados	31
Figura 9a.	Inmunolocalización de GP24 (1:400) en el parásito adulto	32
Figura 9b.	Inmunolocalización de GP24 (1:400) en el parásito adulto	33
Figura 10a.	Inmunolocalización de GP50 (1:64000) en cisticercos evaginados	34
Figura 10b.	Inmunolocalización de GP50 (1:64000) en cisticercos evaginados	35
Figura 11a.	Inmunolocalización de GP50 (1:64,000) en el parásito adulto	36
Figura 11b.	Inmunolocalización de GP50 (1:64,000) en el parásito adulto	37
Figura 11c.	Inmunolocalización de GP50 (1:64,000) en el parásito adulto	38
Cuadro 1.	Resumen de la localización de las glicoproteínas estudiadas	38

Taenia solium es un parásito helminto causante de dos enfermedades diferentes en el ser humano: cisticercosis y teniosis. La Neurocisticercosis se produce por el establecimiento del metacéstodo de *Taenia solium* en el sistema nervioso central. El inmunodiagnóstico de esta enfermedad se lleva a cabo por Inmunolectrotransferencia y utiliza una fracción enriquecida de glicoproteínas (LL-GP) (50, 39-42, 24, 21, 18, 14 and 13 kDa) la cual se ha usado de forma extensa para definir la prevalencia y conocer la epidemiología de la enfermedad. En este trabajo, localizamos por inmunohistoquímica a las subunidades glicoproteicas GP14, GP24 y GP50 en tejidos de la larva (cisticercos) y de parásitos adultos de *T. solium* utilizando sueros hiperinmunes contra estas glicoproteínas. La GP-14 se encontró en parénquima y citones musculares, así como en ventosas y róstelo en el escólex del cisticerco, esta glicoproteína tiene baja expresión en proglótidos maduros. La GP24 se identificó en corpúsculos calcáreos y en el sistema de excreción de la membrana vesicular en cisticercos. En proglótidos maduros, se localizó en la mayoría de las estructuras reproductoras como espermatozoides, conducto deferente, ovario lobulado, útero y vagina. En cisticercos, la GP-50 se localizó en glicocálix, parénquima, corpúsculos calcáreos, y miocitones subtegumentarios, en proglótidos maduros esta glicoproteína se encontró localizada en el saco del cirro y espermatozoides. Para finalizar GP14 y GP24 no están presentes en las oncosferas, mientras que la GP50 se expresa de forma intensa en oncosferas en desarrollo, aunque cuando el huevo está totalmente desarrollado ya no se expresa.

Taenia solium is a helminth parasite that causes two different diseases in humans; cysticercosis and taeniosis. Neurocysticercosis is caused by the establishment of *Taenia solium* metacestodes in the central nervous system. Immunodiagnosis of neurocysticercosis is performed by western blot with an enriched fraction of glycoproteins (LL-GP), and has been used extensively for diagnosis and epidemiologic surveys. Seven antigenic glycoproteins are contained in the LL-GP fraction (GP50, 39-42, 24, 21, 18, 14 and 13 kDa), some have been used as a target for cloning, expression and synthesis of peptides in order to improve assay performance. Up to date there is no information on their localization and possible functions in the parasite. In this work we localized GP 14, 24 and 50 in adult worms and cysticerci of *T. solium*. GP14 is expressed in the parenchyma and muscle cytons as well as suckers and rostellum of the scolex of cysticerci, this glycoprotein has a low expression in mature proglottids. GP24 was identified in calcareous corpuscles and the excretory system of the vesicular membrane in cysticerci; in mature proglottids this protein was localized in most of the reproductive structures like spermatozoa, vas deferens, ovarian lobules, uterine epithelium and vaginal duct. In cysticerci, GP50 was localized in the glycocalix, parenchyma, calcareous corpuscles and subtegumentary cytons; in mature proglottids this glycoprotein was found in the cirrus sac and spermatozoa. Interestingly, GP14 and GP24 are not present in oncospheres, while GP50, shows an intense staining in the latter. These findings are of interest since these glycoproteins are specific for the diagnosis of neurocysticercosis, suggesting its expression and important participation in both stages of *T. solium* development

Taenia solium es un helminto parásito causante de dos enfermedades en el ser humano: cisticercosis y teniosis. La cisticercosis es el padecimiento producido por el establecimiento de la larva o metacéstodo de *Taenia solium*, se considera un problema de salud pública en México y en otros países en vías de desarrollo. La neurocisticercosis (NC) es la parasitosis más frecuente en el sistema nervioso central y se ha demostrado que dos de cada tres casos de NC cursan con epilepsia de inicio tardío, aunque esta enfermedad genera síntomas y signos neurológicos diversos (1). La teniosis, que es causada por el parásito adulto, es prácticamente asintomática, lo que dificulta su detección y tratamiento (2). Puesto que el ser humano es el único hospedero definitivo del adulto de *T. solium* es el responsable de la dispersión de los huevos del parásito y el principal factor de riesgo para adquirir cisticercosis (3).

Taenia solium posee moléculas altamente antigénicas, las mejor caracterizadas son glicoproteínas, con alta afinidad por lectinas *Lens culinaris* y Concanavalina A, las cuales son específicas para el diagnóstico de neurocisticercosis, (4-10). Se sabe que las glicoproteínas de *T. solium* contienen uno o más oligosacáridos N ligados, y que la contribución de estos carbohidratos a la antigenicidad es directamente proporcional a la glicosilación (11). Se ha puesto gran énfasis en estas moléculas como blanco para la clonación, secuenciación, expresión, síntesis y purificación de antígenos, ya que el desarrollo de métodos basados en una sola proteína purificada expande las posibilidades del formato del ensayo inmunodiagnóstico, pues permite la unión directa al antígeno (12).

El objetivo de este estudio fue determinar la localización de 3 glicoproteínas específicas e importantes para el diagnóstico de cisticercosis, con énfasis en la expresión diferencial de estas a lo largo de los estadios de desarrollo de *T. solium*.

Clasificación de *Taenia solium*

Reino	Animalia
Phyllum	Platyhelminthes
Clase	Cestoidea
Subclase	Eucestoda
Orden	Cyclophyllidea
Familia	Taeniidea
Genero	<i>Taenia</i>
Especie	<i>solium</i>

Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. solium* se inicia cuando un ser humano ingiere carne de cerdo insuficientemente cocida, y contaminada con cisticercos. Gracias a las condiciones de pH ácido del estómago y a los componentes de la bilis, el cisticerco evagina y se adhiere en el primer tercio del intestino delgado. Generalmente sólo se encuentra un parásito adulto o tenia en el hospedero. La porción cefálica de la tenia se ancla a las vellosidades del epitelio intestinal con la doble corona de ganchos del rostelo y las cuatro ventosas. El parásito crece en el intestino hasta alcanzar alrededor de un par de metros de largo y tiene la apariencia de un listón blanco, aplanado y muy delgado. Después de aproximadamente 4 meses la tenia está completamente desarrollada y se inicia la expulsión de proglótidos grávidos. No se sabe cuánto dura la infección por el adulto de *T. solium* aunque se considera que es de larga duración, esta información se obtuvo de otra especie que también infecta a humanos (*Taenia*

saginata) (13). El adulto de *T. solium* libera frecuentemente con las heces del portador varios proglótidos con alrededor de 60,000 cada uno, con potencial de infectar a seres humanos y a cerdos causando cisticercosis. La infección ocurre por la ingestión de alimentos o agua contaminados con excremento que contiene huevos, esto se facilita por la convivencia con un portador de *T. solium* (2). Al ser ingeridos, la capa mas externa del huevo (embrióforo), se degrada por las enzimas del tracto digestivo del hospedero liberando al embrión (14). Las larvas recién eclosionadas inician movimientos activos con los ganchos y produce vacuolas que contienen enzimas, las que les permiten atravesar el epitelio intestinal para llegar a la circulación sanguínea o linfática, por donde se transportan y se establece en diversos tejidos en donde los parásitos se convierten en cisticercos. En la población de América Latina, los cisticercos se localizan principalmente en el sistema nervioso central y en el ojo, mientras que en Asia prevalecen los casos de cisticercosis muscular (2).

Morfología

El adulto de *T. solium* es un gusano plano y segmentado, carece de tubo digestivo, mide de 2 a 4 metros de longitud y posee en uno de sus extremos un escólex de aproximadamente 1 mm de diámetro con cuatro ventosas de 0.4 mm de diámetro y un rostelo armado por una doble corona de ganchos, cada una formada por 12 a 16 unidades. Sigue el cuello que es la porción germinal que da origen al estróbilo formado por proglótidos o segmentos que constituyen la unidad de reproducción de la tenia y se clasifican según su grado de desarrollo. Los más

cercanos al cuello son inmaduros y carecen de órganos sexuales diferenciados, después están los proglótidos maduros los cuales contienen aparato sexual masculino y femenino. El aparato sexual masculino consiste de numerosos testículos dispersos y conectados por medio de túbulos seminíferos a un espermatoducto enrollado. El final del espermatoducto se encuentra modificado para formar un órgano muscular copulatorio llamado cirro, que llega al poro genital, a donde también desemboca la vagina. Este órgano femenino recibe los espermatozoides y los conduce al receptáculo seminal que se conecta con el oviducto. Los óvulos liberados periódicamente por los dos lóbulos del ovario pasan a través del oviducto hasta el ootipo donde ocurre la fecundación. Por último, se encuentran los proglótidos grávidos con miles de huevos contenidos en el útero ramificado. Estos proglótidos se desprenden periódicamente del resto del estróbilo y se expulsan con las heces. Los huevos miden de 31 a 51 μm de diámetro, tienen una envoltura llamada embrióforo la que, cuando se observa al microscopio tiene apariencia radial, por estar formada por bloques electrodensos de proteínas parecidas a la queratina unidos por una sustancia cementante. En el interior está la oncosfera, también llamada embrión hexacanto por tener 6 ganchos, es la forma infectiva. El embrióforo, protege al embrión del ambiente exterior (15).

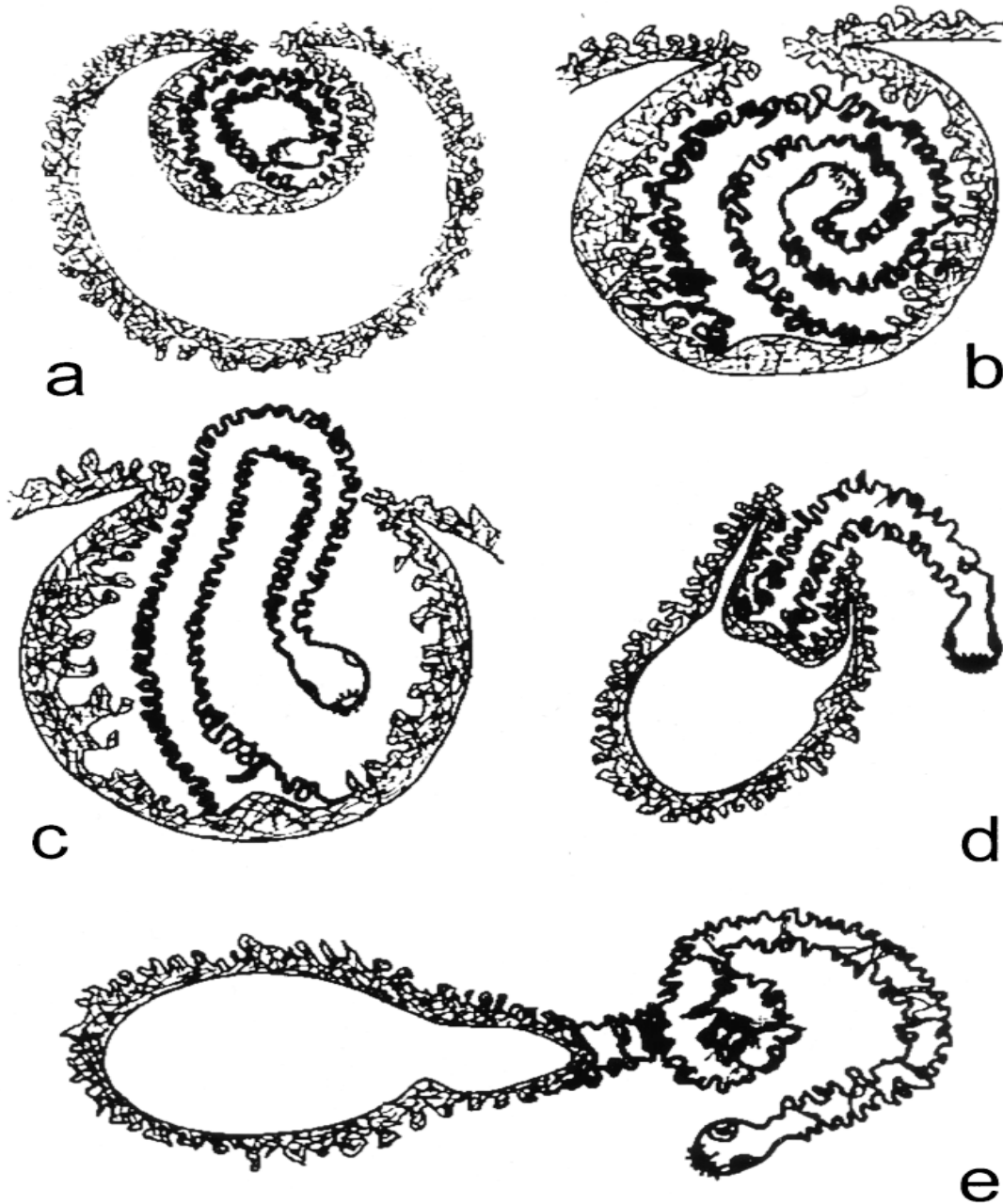


Figura 1. Evaginación de un cisticerco de *Taenia solium*. a) y b) canal espiral, c) poro de evaginación, d) evaginación, e) cisticerco evaginado con vesícula remanente. (16)

El cisticerco es una vesícula translúcida y ovoide, de 5 a 20 mm de diámetro, tiene un escólex invaginado y puede permanecer en los tejidos del hospedero intermediario varios años. La superficie externa de la vesícula está rodeada por

microvellosidades limitadas por una membrana plasmática, que a su vez está cubierta por una capa de glucocálix. La vesícula contiene un fluido transparente compuesto por proteínas del parásito y del hospedero. El tegumento y la pared vesicular son el sitio de contacto del parásito con el hospedero y desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la relación hospedero-parásito (15).

Características de algunas estructuras

Tegumento

Debido a que los gusanos planos no tienen aparato digestivo, todos los nutrientes pasan y los desechos se eliminan a través de la superficie del cuerpo.

El tegumento contiene sistemas específicos de transporte de moléculas y de iones, especialmente aminoácidos, azúcares, vitaminas, purinas, pirimidinas, nucleótidos y lípidos. Es muy probable que cumpla funciones vitales como actividad catalítica ya que contiene enzimas del propio parásito y de su huésped, y es la primera defensa ante las enzimas digestivas y la respuesta inmune del huésped (17).

Parénquima

Al igual que en otros platelmintos, el parénquima y el intersticio ocupan la mayoría del espacio entre los órganos. Las células de parénquima son miocitones interconectados citoplasmáticamente, asociados a miofibrillas, los espacios están llenos de glicógeno por lo tanto, el tejido músculo-parenquimal se puede considerar que es de origen sincicial (17).

Sistema de excreción

El sistema protonefridial o de excreción de los platelmintos está formado por las células flama y vasos colectores. Se presentan de dos a cuatro vasos colectores longitudinales a lo largo de todo el estróbilo. Los tubos excretores parecen ser de origen sincicial con citones nucleados subyacentes y un citoplasma que expone microvellosidades. Las células flama se encuentran en todo el estróbilo. El sistema excretor no participa en la osmoregulación del parásito, esto quiere decir que el sistema excretor no ejerce ningún ajuste activo a la osmolaridad interna del parásito ya que existen evidencias de que los céstodos son osmoconformistas (18).

Sistema muscular

Las células musculares se dividen en dos porciones: a) una porción citoplasmática no contráctil o miocitón, el cual contiene el núcleo y glucógeno y b) una porción miofibrilar que contiene miofilamentos (actina y miosina). Generalmente los miocitones están situados a distancia de las miofibrillas que están conectadas por procesos espirales a más de un miocitón. En algunos lugares, los miocitones están interconectados por uniones cercanas o "gap junctions". Los cuerpos densos representan los sitios de unión para los miofilamentos delgados y están asociados al sarcolema. Las invaginaciones del sarcolema que aparecen en el músculo estriado de invertebrados sirven para transportar estímulos a través de las miofibrillas (17).

Órganos sexuales

En proglótidos maduros, el conducto deferente, la vagina, los ovarios y un gran número de testículos localizados entre los conductos excretores abarcan tres cuartas partes de la longitud del proglótido. Los espermatozoides maduros en ténidos muestran un patrón de organización, filiforme, de forma cónica en ambos extremos, espiral y tubular, con el núcleo de forma anular (19).

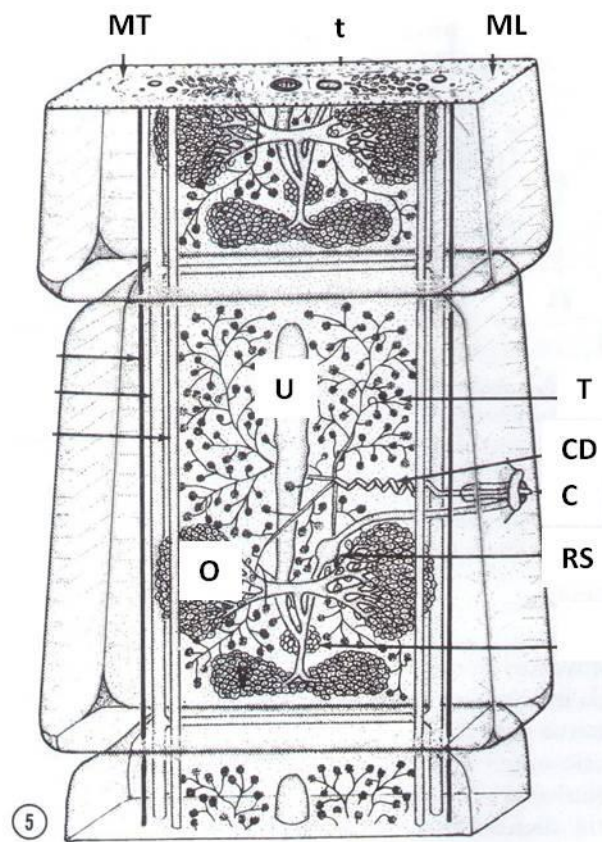


Figura 2. Representación tridimensional de un proglótido maduro. O (ovario), U (útero), T (testículos), CD (conducto deferente), C (cirro), RS (receptáculo seminal), ML (músculos longitudinales), MT (músculos transversales), t (tegumento). Tomado de Arme & Pappas 1983.(20)

Diagnóstico

Teniosis

El diagnóstico de teniosis se realiza por la identificación de proglótidos expulsados en el excremento, los cuales deben ser observados al microscopio para definir la especie, o bien por el hallazgo de los huevos mediante técnicas coproparasitológicas de sedimentación o flotación, cuya sensibilidad no es mayor de 60% (21) y no es específica ya que los huevos de las tres especies de *Taenia* que se desarrollan en el intestino humano son iguales. En 1990, Allan y colaboradores desarrollaron un ELISA de captura de antígenos de tenia en heces de personas infectadas y de animales infectados experimentalmente (22), con alta sensibilidad (100%) y que no presenta reacciones cruzadas con otros helmintos incluyendo *Hymenolepis nana*, sin embargo la prueba no puede distinguir entre *T. solium* y *T. saginata*.

Se han obtenido secuencias repetidas específicas de DNA para emplearlas en el diagnóstico por hibridación; con esta técnica se han logrado distinguir huevos de ambas especies *T. solium* y *T. saginata* en materia fecal (23). También se puede realizar un diagnóstico específico de teniosis por western blot (WB) basado en la detección de dos fracciones antigénicas de 33 y 38 kDa que no están presentes en el cisticerco (24); ambas técnicas sólo quedaron en etapa experimental y nunca se utilizaron en campo.

Cisticercosis

El diagnóstico de la cisticercosis porcina se puede realizar en pie o en la canal. El diagnóstico en pie se lleva a cabo con un examen visual y con la palpación de la

lengua en búsqueda de cisticercos. Con este método sólo se puede detectar un pequeño número de animales infectados. El diagnóstico en canal se realiza generalmente en rastros, para lo que se hacen cortes en los músculos anóneos en búsqueda de cisticercos; aun cuando se realiza la inspección en forma cuidadosa, las infecciones leves llegan a pasar desapercibidas, generalmente cuando hay menos de 10 cisticercos (25).

En las últimas 2 décadas se han desarrollado pruebas diagnósticas como el ELISA y el western blot, y se ha encontrado que este último tiene una sensibilidad y especificidad de hasta 100% (5).

Actualmente, el diagnóstico de la cisticercosis humana se apoya con estudios de imagen: tomografía computarizada y resonancia magnética, que se consideran técnicas de elección en la práctica clínica (26). Desafortunadamente, estas técnicas de imagen no son accesibles para la población que padece la enfermedad por su alto costo; por ello el desarrollo de pruebas de inmunodiagnóstico que son económicas y prácticas, y están orientadas a la identificación de anticuerpos anti-cisticerco, como el diagnóstico serológico por ELISA es una buena alternativa a pesar de usar extractos crudos del parásito que pueden generar baja especificidad (27).

Inmunoelectrotransferencia para cisticercosis

La inmunoelectrotransferencia o western blot (WB) es la primera técnica inmunológica sensible y específica para el diagnóstico de cisticercosis, se usa para determinar la prevalencia de la enfermedad en zonas endémicas (28) y es la

única prueba reconocida por la Organización Panamericana de la Salud para el serodiagnóstico de cisticercosis (29-32).

Esta técnica, se basa en la electroforesis y la inmunotransferencia de una fracción semipurificada de glicoproteínas de cisticercos de *T. solium* (LLGP). Las LLGP se obtienen por medio de una cromatografía de afinidad utilizando la resina lentil-lectina-sefarosa. El resultado de esta cromatografía es la obtención 6-7 fracciones antigénicas que pesan 50, 39-42, 24, 21, 18, 14 y 13 kDa, es 100% específica y llega a tener 98% de sensibilidad cuando los enfermos tienen dos o más cisticercos en el cerebro (5;33). Este ensayo tiene ciertas limitantes, que incluyen el formato de ensayo que no es cuantitativo, la purificación de la fracción LLGP que varía según el lote de cisticercos que se use, requiere de equipo sofisticado y experiencia técnica, además la fracción antigénica LLGP sólo funciona para el WB y no para el ELISA.

Aunque el WB es una técnica muy útil para el diagnóstico de la cisticercosis, se ha propuesto desarrollar un método sencillo, menos costoso, rápido y simple de manipular que no requiera equipo de laboratorio sofisticado ni personal altamente capacitado. Esta propuesta consiste en incorporar antígenos recombinantes o sintéticos, evitando así el costo y las dificultades de purificación, por lo que la fracción antigénica LLGP, como se menciona antes, se ha utilizado como blanco para la clonación y expresión de antígenos (12).

Planteamiento del problema

Las fracciones 14, 24 y 50 de la LL-GP en sus formas recombinantes son reconocidas por los sueros de pacientes con neurocisticercosis, y por lo tanto son útiles para el diagnóstico de la cisticercosis, sin embargo no se conoce su localización ni su probable función en el parásito.

Objetivo

Identificar a las formas recombinantes de la LL-GP 14 y 24, así como a la forma nativa de la GP50 en cortes histológicos de cisticercos y proglótidos de *T. solium* utilizando sueros hiperinmunes generados contra estas subunidades glicoproteicas.

Glicoproteínas en parásitos

Existen fuertes evidencias de que los carbohidratos, más que las proteínas son antígenos dominantes de la respuesta inmune a muchos parásitos helmintos. Además, se sabe que participan en la modulación y la evasión de dicha respuesta. Los carbohidratos se caracterizan por ser altamente antigénicos y en algunos casos son responsables de las reacciones cruzadas entre diferentes especies (11;34).

Son pocos los estudios de caracterización de glicoproteínas en helmintos. En 2003, el grupo de Restrepo realizó la primera y única descripción que existe de la localización *in situ* de una glicoproteína de *T. solium* en el cisticerco. Además también analizó la interface hospedero-parásito en tejido de cerdo infectado de manera natural. La distribución de esta glicoproteína fue evaluada con un anticuerpo policlonal contra la glicoproteína de 12 kDa con el propósito de determinar su papel biológico en la cisticercosis. Los resultados de este trabajo muestran la presencia de la glicoproteína de 12 kDa de forma abundante en el fluido vesicular, tegumento de la membrana vesicular, subtegumento, y por debajo del parénquima del canal espiral, ventosas y escólex de cisticercos de *T. solium*, sitios que participan de forma activa en la relación hospedero parásito. Además, los estudios realizados en tejido de cerdos infectados con cisticercos de *T. solium* demuestran que esta glicoproteína puede ser excretada y/o secretada al tejido adyacente del huésped, cuando se forman granulomas y hay eosinófilos abundantes alrededor del parásito (35).

Los mismos autores han caracterizado las glicoproteínas de bajo peso molecular de *T. solium* con el objetivo de elucidar la estructura precisa de los carbohidratos y establecer su papel de antigenicidad (10;35;36). Proponen que los componentes sacarídicos de las glicoproteínas son responsables de la diversidad biológica, incluyendo antigenicidad, como ha sido descrito para otros parásitos (34;37).

Por otro lado, con el objetivo de desarrollar un ensayo de diagnóstico para la cisticercosis, más sencillo que los establecidos, se ha desarrollado una prueba basada en una sola proteína. Para tal fin, se han producido de forma recombinante algunas de las glicoproteínas que se utilizan en el diagnóstico por WB, principalmente la 14, 18, 24 y 50, sin embargo no se ha tenido éxito hasta el momento (8;12;31;32).

En *Taenia crassiceps* se han descrito dos glicoproteínas de 14 y 18 kDa, las cuales presentan una homología parcial con la glicoproteína de 10 kDa de *T. solium*, estas glicoproteínas han sido de gran utilidad para la detección de anticuerpos anti-cisticerco por ELISA en líquido cefalorraquídeo y suero de pacientes con neurocisticercosis (38). Para el diagnóstico de *Echinococcus multilocularis* se ha purificado y caracterizado una glicoproteína denominada *Emgp-89*. Este antígeno se ha utilizado para la detección del parásito en sueros de perros experimentalmente infectados. La prueba mostró gran sensibilidad y baja especificidad al analizar sueros de perros con otras helmintiasis (83%) (39).

Los parásitos helmintos generan arreglos en la estructura de carbohidratos, esto incluye regiones N y O de glicanos de superficie y glicoproteínas de excreción con

estructuras similares a las que se encuentran en mamíferos; así como glicolípidos y otros componentes cuya base es un polisacárido (11).

En nemátodos como *Heligmosomoides polygyrus* y en *Haemonchus contortus* se han descrito antígenos O-glicosilados, y se propone que son importantes en las interacciones huésped-parásito (40). En *Trichinella spiralis*, las cadenas polipeptídicas se encuentran conjugadas a un glicano único e inmunodominante (tivelosa), siendo éste un blanco para estudios de protección (41), *Haemonchus contortus*, *Trichinella spiralis* y algunos tremátodos como *Schistosoma*, sintetizan N-glicanos con residuos α -3 unidos a fucosa; ésta es una modificación limitada a invertebrados y plantas (11). *Toxocara canis* libera 2 oligosacáridos metilados y altamente antigénicos (42). La larva de *Trichostrongylus colubriformis* expresa una glicoproteína resistente a proteasas que ha sido considerada como blanco para protección (43). Otra molécula fuertemente asociada a parásitos helmintos es la fosforilcolina, la cual está asociada a proteoglicanos de alto peso molecular (44).

Glicoproteínas recombinantes de T. solium

El grupo del Dr Tsang, empleando oligonucleótidos degenerados, amplificaron, clonaron y secuenciaron los cDNAs que representan a los polipéptidos 14 y 18. Se evaluó su potencial diagnóstico tanto en ELISA como en western blot y se demostró su alta sensibilidad y especificidad. Las clonas *T. solium* 14 (TS14) y *T. solium* 18 (TS18) codifican para proteínas maduras cuyo peso molecular es cercano a 8 kDa, las cuales contienen de 1 a 3 sitios potenciales de N-glicosilación. Aunque comparten un grado de homología mayor al 70%, TS14 parece ser más inmunoreactiva que TS18.

Los sueros que no reaccionaron con la subunidad 14 sólo reaccionaron con glicoproteínas mayores de la fracción LLGP como GP50, GP42-39 y GP24 (8). Se han descrito secuencias de la región amino terminal de GP24 y GP39-42 que son idénticas a la secuencia N-terminal de la clona TS14 (45). Estos datos sugieren que todas las proteínas diagnósticas, excepto GP50, están relacionadas estructural y antigénicamente (8).

La GP50 ha sido clonada, secuenciada y caracterizada, la proteína madura contiene seis residuos de cisteína, 7 sitios potenciales de glicosilación y es una proteína de anclaje a membrana (12). En un gel de electroforesis, la proteína nativa migra a 50 kDa, aunque la predicción de su peso molecular es de 29 kDa, mucho menor que la proteína nativa, debido al gran número de sitios de glicosilación. La GP50 se expresó de forma recombinante en un sistema de baculovirus y se demostró su capacidad antigénica. La actividad antigénica de la proteína nativa y de la recombinante depende de la formación correcta de enlaces disulfuro, el tratamiento de GP50 con DTT resulta en la pérdida de su antigenicidad frente a sueros positivos a cisticercosis. La proteína madura GP50 tiene dos proteínas homólogas en el parásito adulto de *T. solium* la TSES33 y la TSES38. Estas son proteínas diagnósticas para teniosis, presentan un 33% de aminoácidos idénticos, son proteínas de anclaje a membrana y conservan las 6 cisteínas como la GP50 nativa (12;24;46). La GP50 es reconocida por el 53-84% de los sueros positivos a cisticercosis. Sin embargo el uso de la GP50 recombinante expresada en células de insecto da reacción cruzada con sueros de pacientes con otras parasitosis (32).

El tercer antígeno en ser clonado, expresado y caracterizado fue la TS24, una proteína de membrana que pertenece a la superfamilia de las tetraspaninas, migra a la posición de 24 kDa en geles de poliacrilamida y es homodímero de la GP42. Una porción de la TS24 está representada por una asa extracelular y tiene características hidrofílicas, fue expresada en células de insecto (*Drosophila*-SFM) y evaluada por WB con sueros positivos a cisticercosis y sueros controles. Su especificidad fue del 98%, por lo que la TS24 recombinante (rT24H) es un antígeno muy útil para diagnóstico de cisticercosis en el formato de ELISA, siendo éste un ensayo diagnóstico colateral al western blot de LL-GP (31).

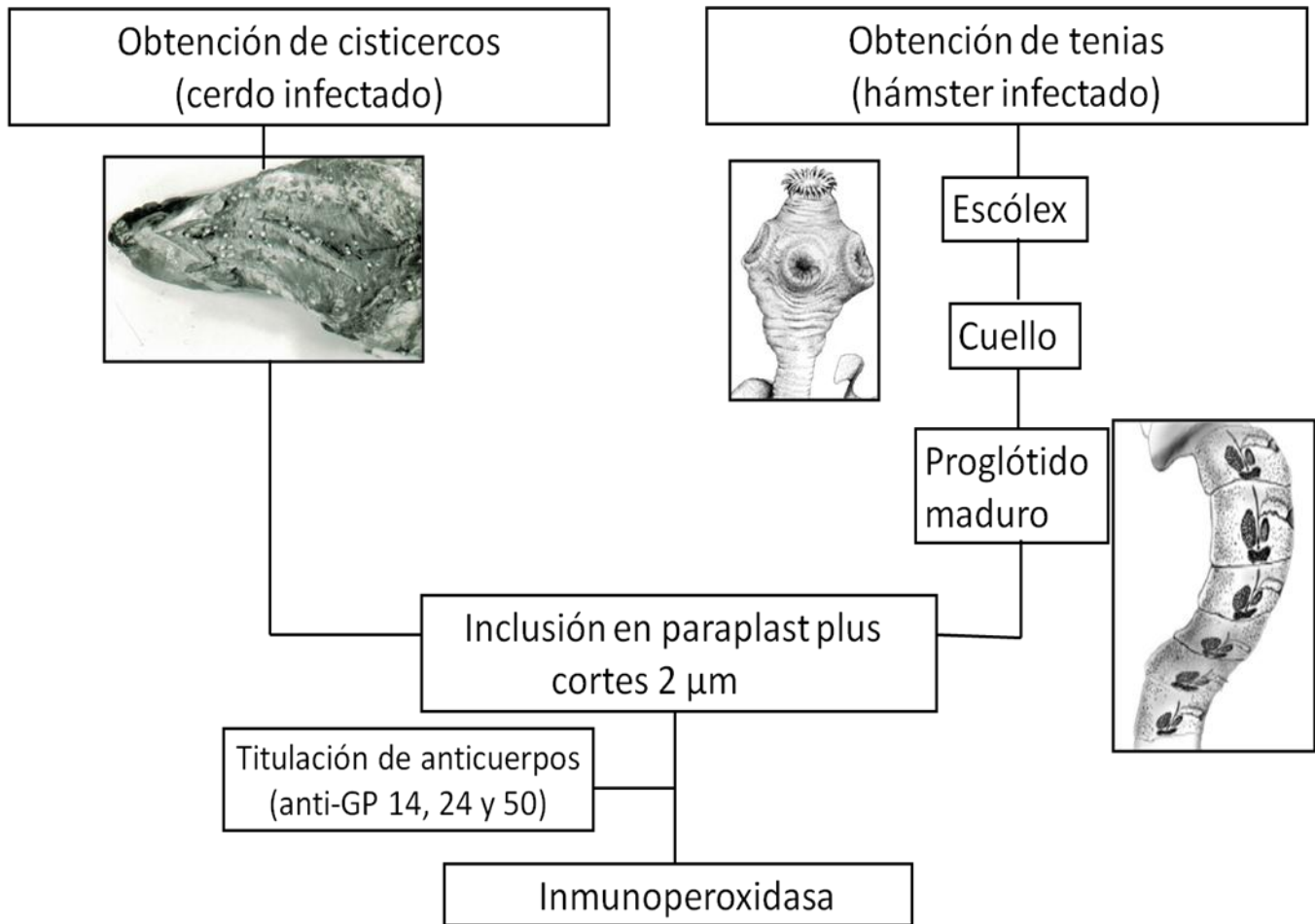


Figura 3. Diseño experimental

Obtención de parásitos

Se obtuvieron cisticercos de cerdos con infecciones naturales y tenias del modelo experimental del hámster dorado (47) y de humano. Los cisticercos se lavaron con PBS, cuidando de no romper la vesícula para mantener su integridad, se fijaron en PBS-formol al 4%, se deshidrataron y fueron embebidos en Paraplast plus. Las tenias se lavaron con PBS y se observaron al microscopio para determinar el grado de madurez, se cortaron fragmentos de aproximadamente 1 cm de longitud de escólex, cuello, proglótidos inmaduros y maduros. Asimismo se procesaron algunos proglótidos gravidos provenientes de una infección natural. Las tenias se fijaron y procesaron como los cisticercos.

Proteínas recombinantes y anticuerpos anti GP 14, 24 y 50

El grupo de la Dra. Patricia Wilkins que trabaja en la División de Enfermedades Parasitarias y Malaria de los Centers for Diseases Control and Prevention (Atlanta GA), expresó a las glicoproteínas 14 (TS14) y 24 (TS24) que se utilizan para el WB de cisticercosis y produjo antisueros contra estas formas recombinantes, asimismo se produjeron anticuerpos contra la GP50 nativa.

A continuación se enlistan los sueros que se utilizaron para los ensayos de inmunolocalización.

1. Suero de cabra anti-TS24 recombinante, preinmune y al día 66 post-inmunización.
2. Suero de cabra anti-TS14 recombinante, preinmune y al día 56-57 post-inmunización.

3. Suero de conejo anti-GP50 nativa, mezcla de sangrados finales de varios conejos.
4. Suero de conejo normal, mezcla de varios conejos sanos.

Titulación de anticuerpos.

Los sueros hiperinmunes se titularon por western blot para encontrar la dilución óptima que se usó en los ensayos de inmunolocalización. Para esto se corrió un extracto de glicoproteínas de cisticercos de *T. solium* purificadas por lenticil lectina (LL-GP) por electroforesis (Mini Protean III, BioRad) en geles de poliacrilamida al 12% bajo condiciones de fraccionamiento de 100 V durante 2 h y se transfirió a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF, Millipore) previamente activada con metanol en una cámara de transferencia semiseca (Amersham Biosciences), 15 min a 10 V. La solución amortiguadora de transferencia que se empleó fue Tris 48mM, glicina 39mM pH 9.2, dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0.375% y metanol al 20% (48). Las membranas se bloquearon con albúmina sérica bovina al 1% (Sigma) en PBS-Tween 0.1% y se incubaron con los sueros anti glicoproteínas a diferentes diluciones: anti GP50 (1:8000, 1:16000, 1:32000, 1:64000); anti GP24 (1:200, 1:400, 1:800) y anti GP14 (1:200, 1:400). Posteriormente las membranas se incubaron con un conjugado anti-cabra o anti-conejo según el caso, unido a peroxidasa (1:2000) y la reacción se visualizó por inmunoprecipitación con 3,3 diaminobenzidina (Sigma) y peróxido de hidrógeno.

Tinción de PAS

Se realizaron cortes de cisticercos y tenias de aproximadamente 2 μm de grosor, se montaron en portaobjetos electrocargados (HIER Slides Biocare Medical, USA) se desparafinaron y se rehidrataron; se enjuagaron con agua destilada, se agregó ácido peryódico y se incubó durante 5 min, se lavó con agua del grifo y después con agua destilada, se incubó el reactivo de Schiff durante 15 min, y se lavó como se explicó en el paso anterior. Por último, se agregó la solución de hematoxilina modificada según Gill, se incubó durante 2 min y se lavó, se trataron las muestras en serie creciente de alcoholes y se montaron para observarse al microscopio de luz.

Ensayos de inmunolocalización

Las laminillas se desparafinaron, rehidrataron y se procesaron para inmunohistoquímica. Se desenmascararon los epítomos con Trilogy (Cell Marque, Hot Springs, Arkansas USA) a 97°C en un vaporizador durante 10 min. Se dejó enfriar el tejido 20 min antes de incubarlo con peróxido de hidrógeno al 3% a temperatura ambiente para inactivar la peróxidasa endógena. Para prevenir la unión inespecífica del anticuerpo, se bloqueó el tejido con Universal Blocking Reagent (Biogenex, San Ramón, California) durante 10 min. El suero hiperinmune se usó a la dilución óptima según los ensayos de western blot y se incubaron durante 10 min con el tejido. La reacción se identificó con un segundo anticuerpo biotinilado, seguido de estreptavidina-HRP y finalmente se reveló con 3-3 diaminobenzidina que resulta en un precipitado de color café. Se realizaron

lavados con PBS-Tween 0.1 % después de cada incubación. Las laminillas se contra-tiñeron con hematoxilina para identificar las estructuras internas y los diferentes estados de desarrollo del parásito y se observaron por microscopía de luz.

Titulación de anticuerpos.

Con el propósito de saber la dilución de trabajo de cada anticuerpo en los ensayos de inmunohistoquímica y obtener reacciones similares con los 3 anticuerpos (anti GP14, 24 y 50) se realizó la titulación de estos por western blot. En la figura 4 se observa que los sueros anti-GP50, 24 y 14 reaccionan a diferentes diluciones de trabajo. Con el anticuerpo anti GP-50, la dilución 1:64000 fue la que no mostró fondo y sólo se observa reacción con la banda de 50 kDa. Con el anticuerpo anti GP-24, la dilución (1:400) fue en la que la reacción se vio más limpia y específica para la glicoproteína de interés. Con el anticuerpo anti GP-14 se obtuvo un resultado similar al de anticuerpo anti-GP24.

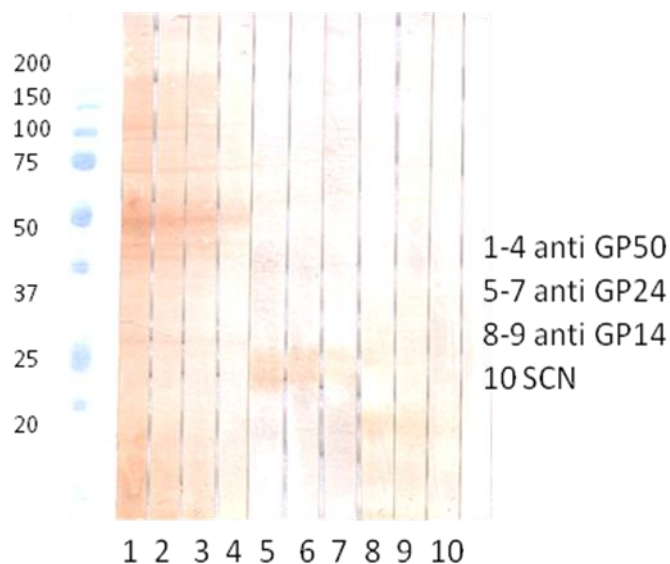


Figura 4. Western Blot para sueros anti-glicoproteínas (50,24 y14). Carriles 1-4 suero anti GP50 (1:8000, 1:16000, 1:32000, 1:64000); carriles 5-7 suero anti GP24 (1:200, 1:400, 1:800) y carriles 8-9 suero anti GP14 (1:200, 1:400) contra un extracto de glicoproteínas purificadas por lentil lectina a partir de cisticercos de *Taenia solium*, carril 10 mezcla de sueros de conejo normal.

Las diluciones empleadas para cada anticuerpo fueron: anti GP50 a 1:64,000, anti GP24 a 1:400 y anti GP14 a 1:400.

Tinción de PAS

En la figura 5 se muestra una tinción de PAS del escólex de un cisticerco evaginado, en la que se aprecian estructuras como las ventosas (**V**), el tegumento (**T**) y el parénquima (**P**). En la figura 5B está a mayor aumento la tinción del cuello del cisticerco, y se observan estructuras como miocitones subtegumentarios (**cST**), fibras musculares (**FM**) y parénquima (**P**).

A)

B)

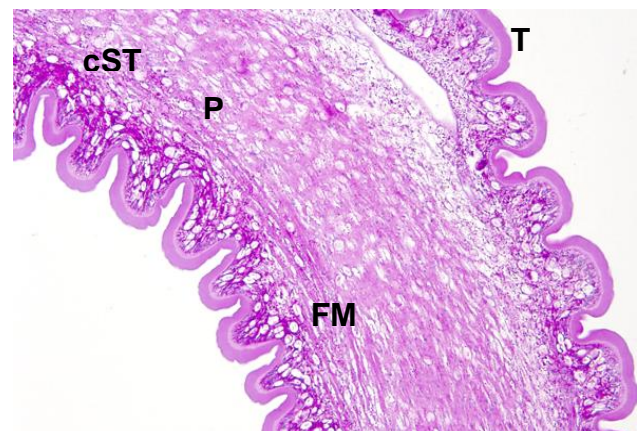


Figura 5. Tinción PAS en cisticerco evaginado. **A)** escólex 10X, **B)** cuello 20X.

Se observa la presencia de carbohidratos (coloración morada) prácticamente en todo el parásito (escólex y cuello) la cual es muy abundante en miocitones subtegumentarios, y miocitones de las ventosas, aunque en fibras musculares y en parénquima no hay marca.

Inmunolocalización

GP-14 en cisticercos de *T. solium*

En la figura 6A se muestra la distribución de GP14 en el escólex de un cisticerco evaginado (6A y 6C) y en canal espiral (6E). Se observan estructuras como róstelo (R), ganchos (g), ventosas (V), parénquima (P), tegumento (T), glicocálix (G) y corpúsculos calcareos (CC).

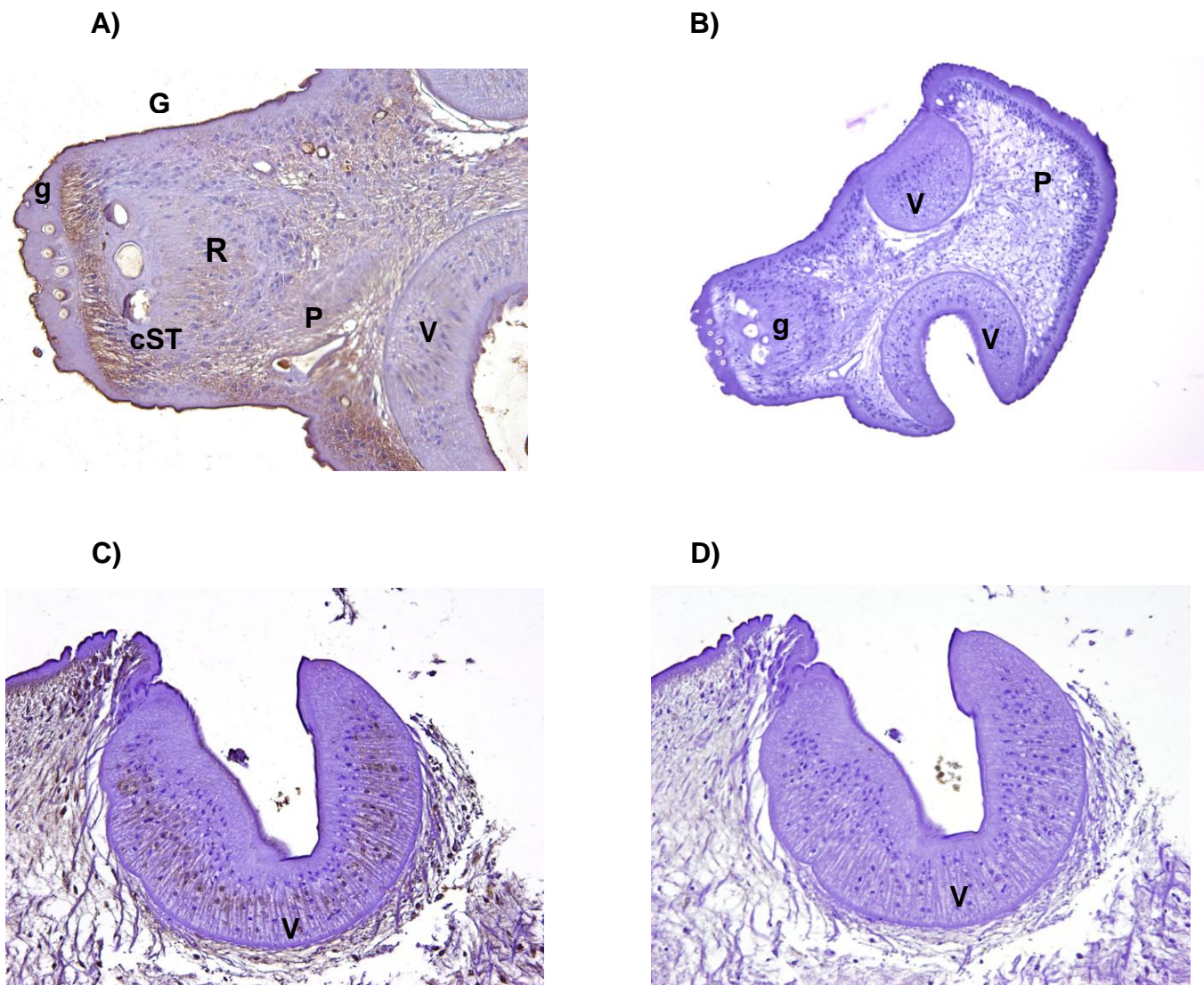


Figura 6a. Inmunolocalización de GP14 (1:400) en cisticercos evaginados. **A)** escólex 20X, **B)** escólex 10X incubado con suero de cabra preinmune (1:400), **C)** ventosa 40X, **D)** ventosa 40X, incubado con suero de cabra preinmune (1:400).

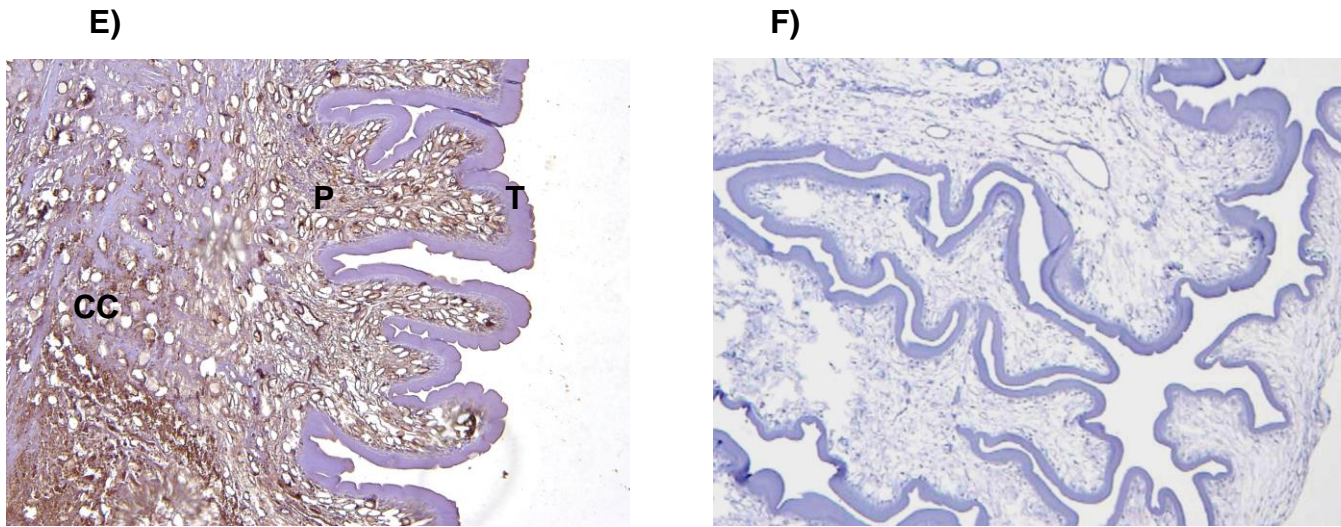


Figura 6b. Inmunolocalización de GP14 (1:400) en cisticercos evaginados. **E)** canal espiral 20X, **F)** canal espiral 20X incubado con suero de cabra preinmune (1:400).

La expresión de GP14 es moderada en parénquima del escólex, así como en un grupo celular de róstelo (fig 6A) y ventosas (fig 6C), además es abundante en parénquima de canal espiral (fig 6E), estructura que vemos sin tinción en fig 6F por ser el control con suero preinmune.

GP-14 en proglótididos maduros y grávidos de *T. solium*.

En la figura 7 se muestra la localización de GP-14 en cortes del parásito adulto, que corresponden a proglótididos maduros, donde se observa una baja expresión de ésta glicoproteína en estructuras reproductoras (fig 7A) como: testículos (**T**), utero (**U**), vagina (**Vg**), y ovarios (**O**). No hay expresión de GP-14 en proglótididos grávidos llenos de oncosferas (**Onc**) inmaduras (fig 7B) ni en proglótididos grávidos donde observamos huevos totalmente desarrollados (fig 7C).

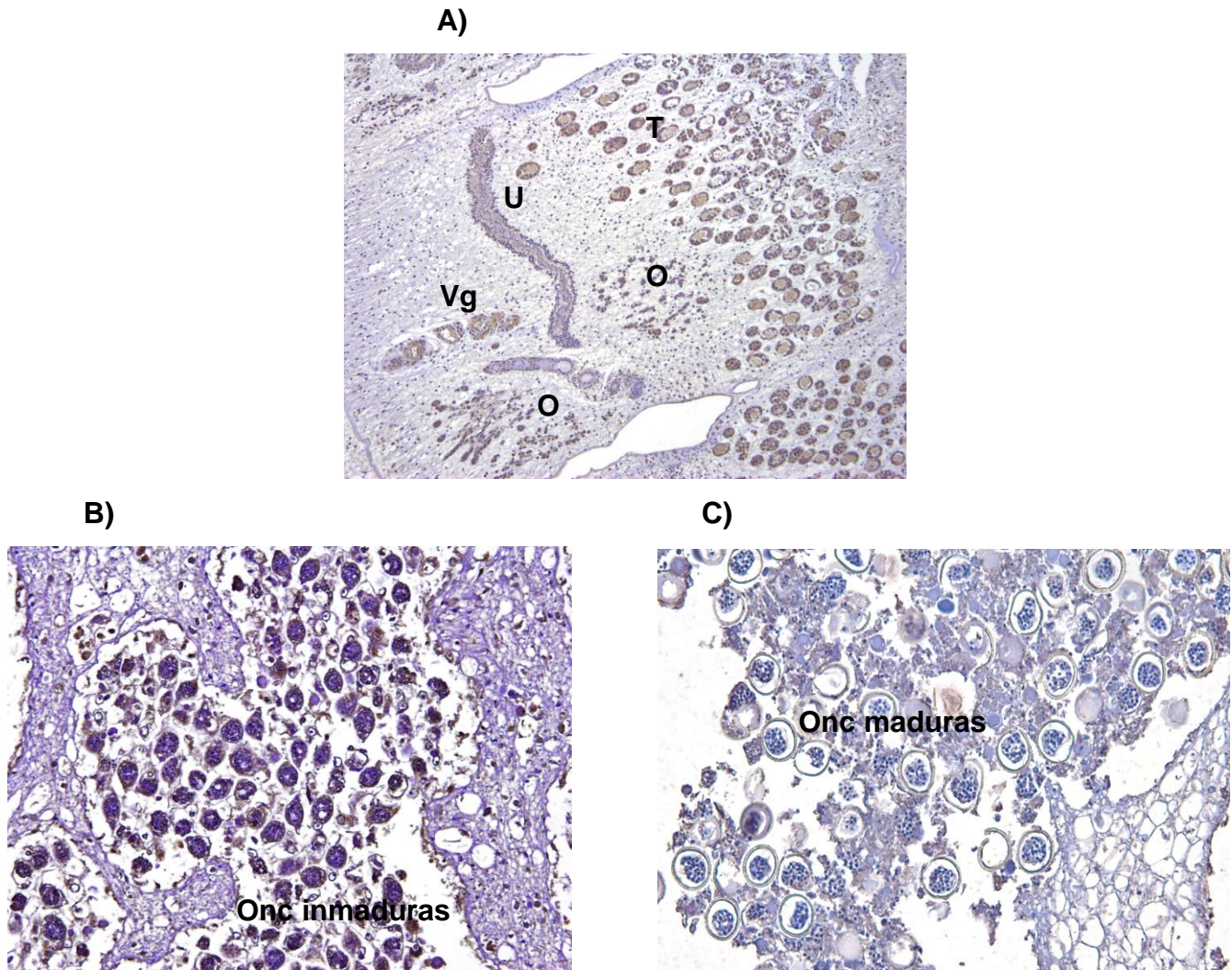


Figura 7. Inmunolocalización de GP14 (1:400) en el parásito adulto. **A)** proglótidos maduros 10X, **B)** proglótidos pregrávidos 20X, **C)** proglótidos grávidos 20X.

GP-24 en cisticercos de *T. solium*

En la figura 8 se muestra la distribución de GP24 en el escólex de un cisticerco evaginado, la expresión de esta glicoproteína es intensa sobre corpúsculos calcáreos (**CC**) presentes en escólex (fig 8A), y en el estróbilo (fig 8B). En la membrana vesicular (fig 8D y 8E) se observa una marca intensa en los conductos

excretores y células subtegumentarias, marca que no se observa con el suero preinmune (fig 8F).

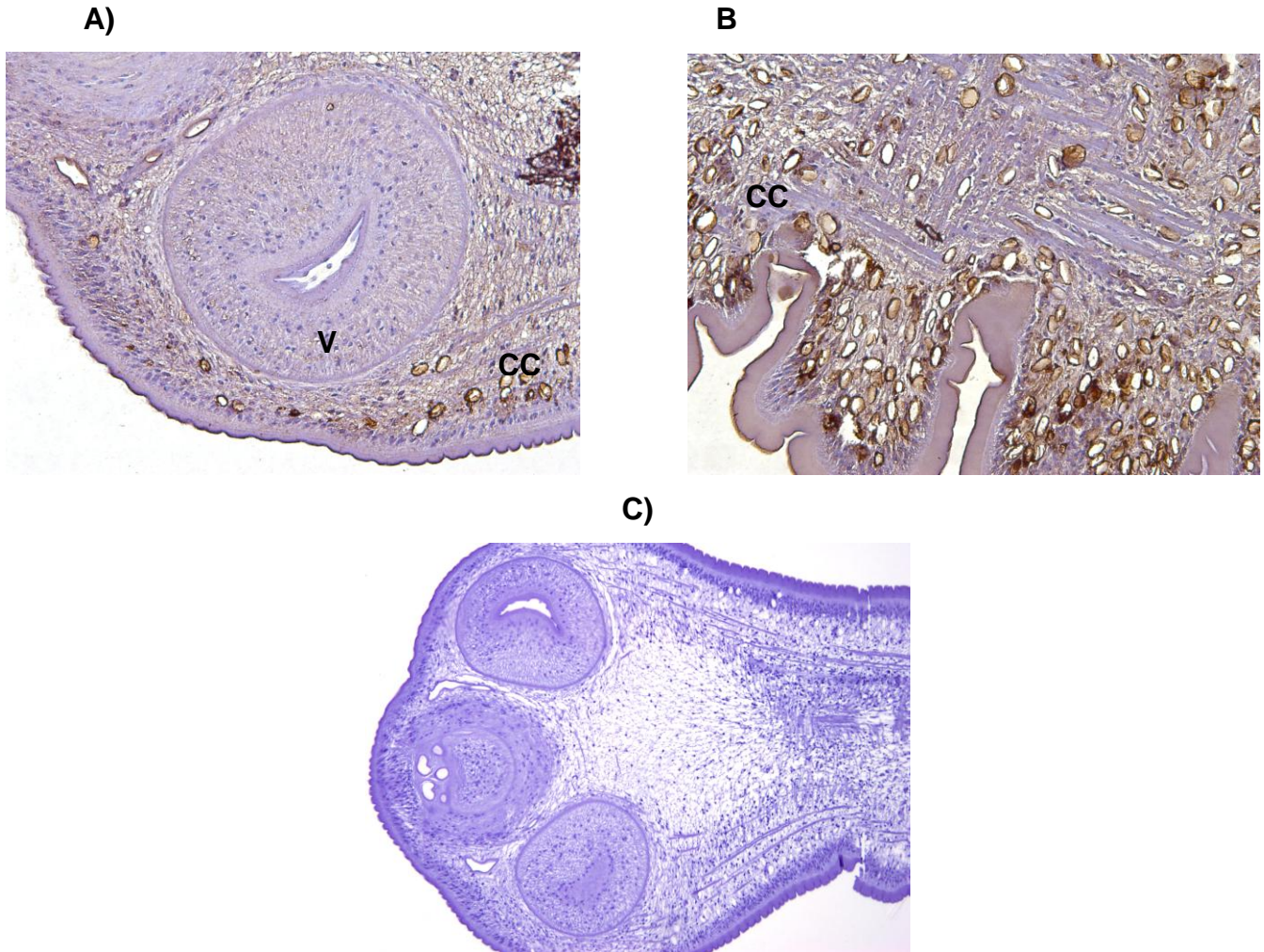


Figura 8a. Inmunolocalización de GP24 (1:400) en cisticercos evaginados. **A)** escólex 20X, **B)** estróbilo 20X. **C)** escólex 10X, incubado con suero de cabra preinmune (1:400).

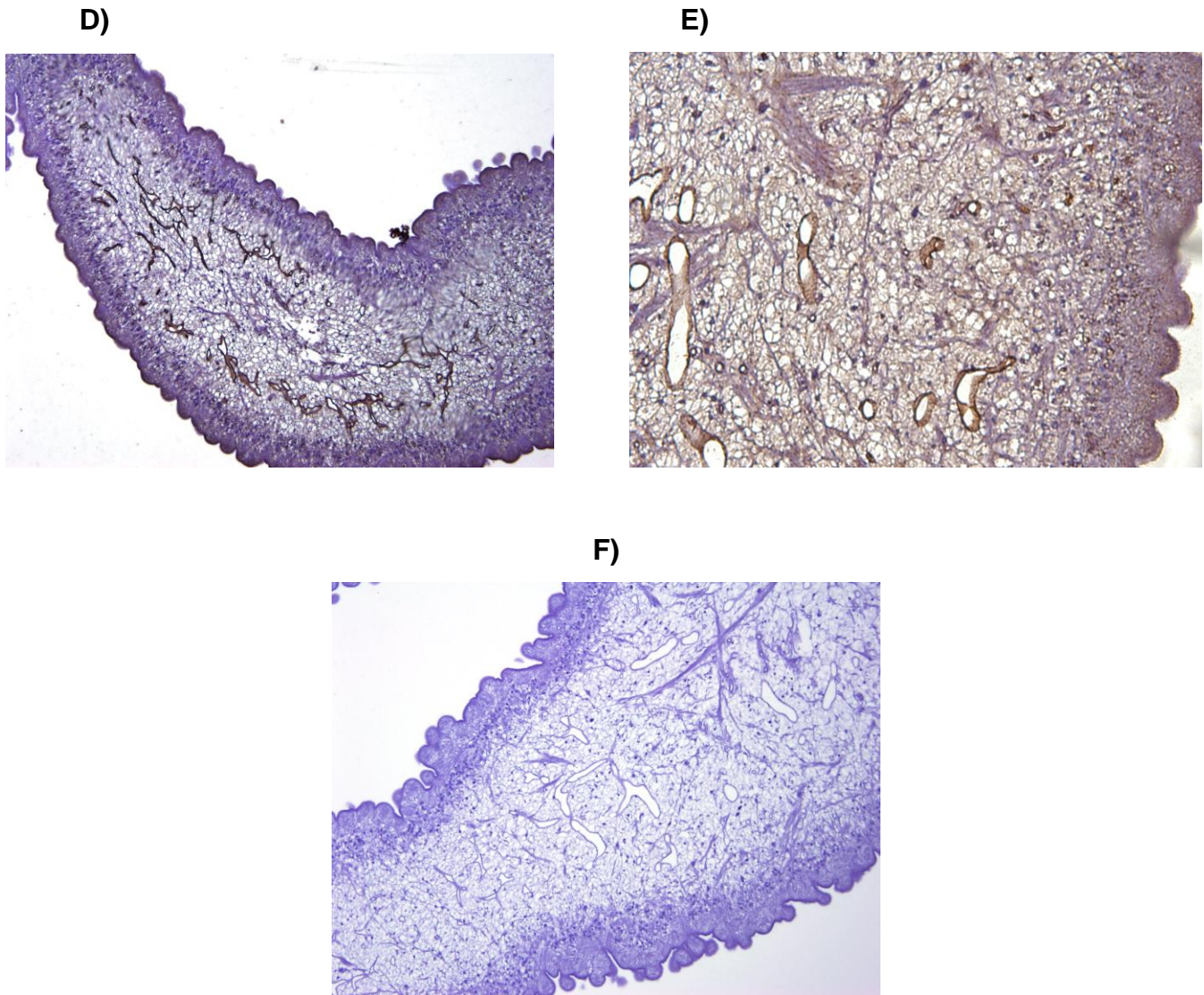


Figura 8b. Inmunolocalización de GP24 (1:400) en cisticercos evaginados. **D)** y **E)** membrana vesicular 10X y 20X respectivamente. **F)** membrana vesicular 10X, incubado con suero de cabra preinmune (1:400).

GP-24 en proglótidos maduros y grávidos de *T. solium*.

En la figura 9A se observa la localización de GP-24 en cortes del parásito adulto, la cual es clara sobre diferentes estructuras reproductoras: espermatozoides (**T**), conducto deferente (**Cdef**), ovarios (**O**), útero (**U**) y vagina (**Vg**). Al igual que GP-14, no hay expresión de GP-24 en proglótidos pregrávidos llenos de oncósferas (**Onc**) en desarrollo (fig 9E) ni en proglótidos grávidos donde observamos huevos totalmente desarrollados en los que se pueden identificar oncosferas rodeadas del embrióforo (fig 9F).

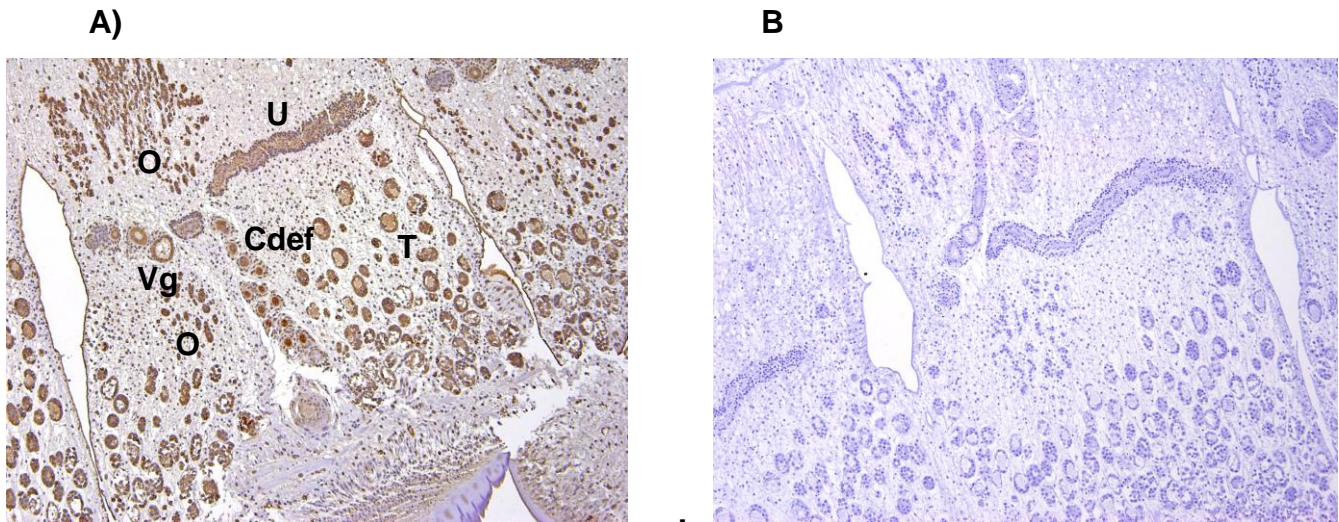


Figura 9a. Inmunolocalización de GP24 (1:400) en el parásito adulto. **A)** proglótidos maduros 10X, **B)** proglótido maduro incubado con suero de cabra preinmune (1:400) 10X.

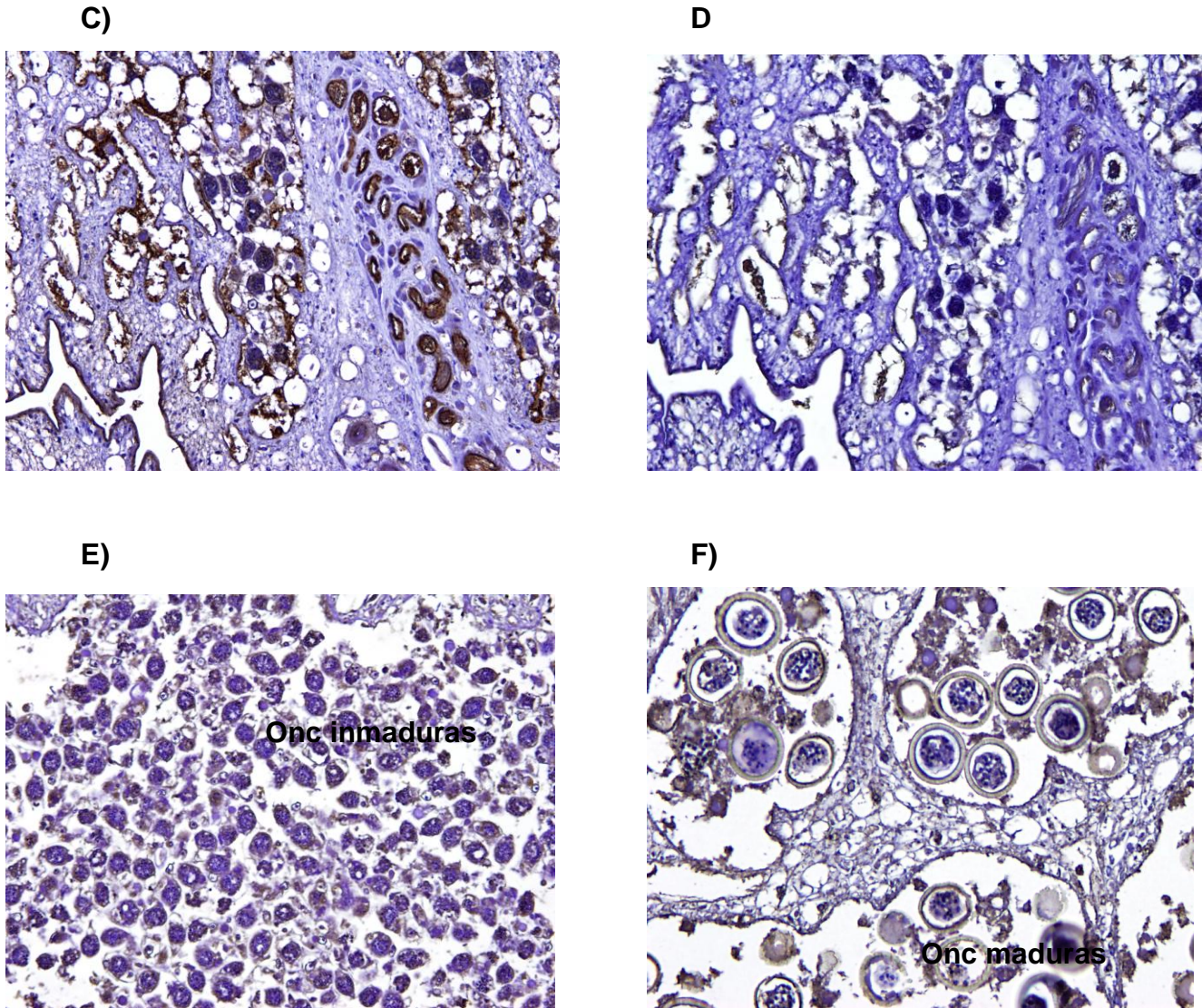
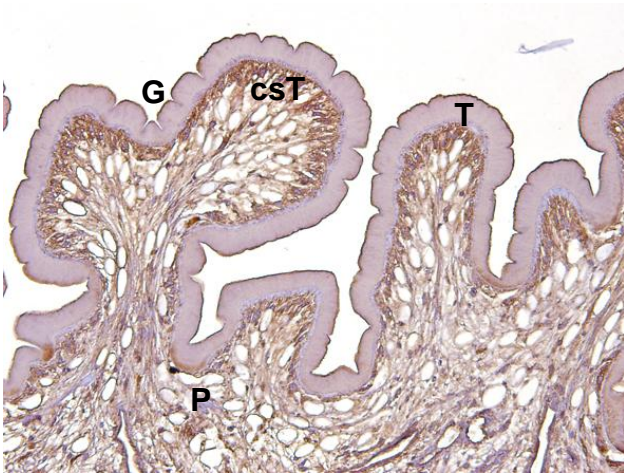


Figura 9b. Inmunolocalización de GP24 (1:400) en el parásito adulto. **C y E)** proglótidos pregrávidos 20X, **D)** proglótido pregrávido incubado con suero de cabra preinmune (1:400) 20X., y **F)** proglótidos grávidos 20X.

GP-50 en cisticercos de *T. solium*.

En la figura 10A se muestra la distribución de GP50 en el canal espiral de un cisticerco invaginado la cual es muy intensa en el glicocálix (**G**), en miocitones subtegumentarios (**cST**) y en tegumento (**T**) en donde hay marca aunque es menos intensa. En la figura 10C se observa con claridad la localización de GP50 en el glicocálix (**G**) y parénquima (**P**) del escólex, no hay marca en células musculares presentes en ventosas (**V**) y rostelo (**R**).

A)



B)

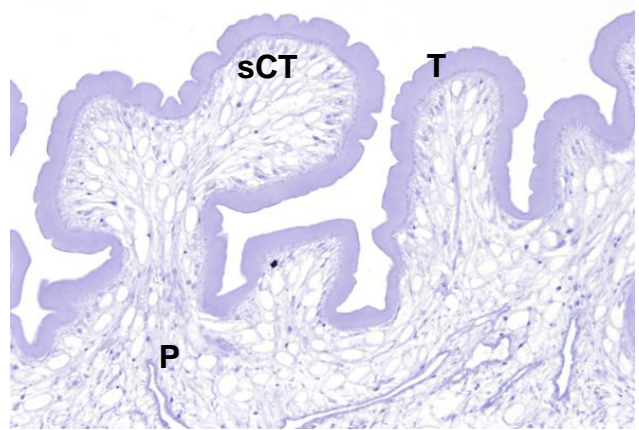
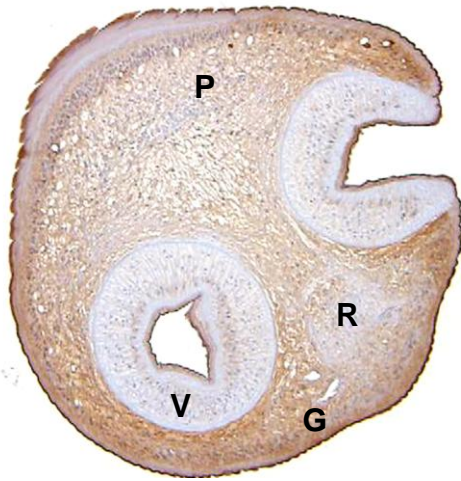


Figura 10a. Inmunolocalización de GP50 (1:64000) en cisticercos evaginados. **A)** canal espiral 20X, **B)** canal espiral incubado con suero de conejo preinmune.

C)



D)

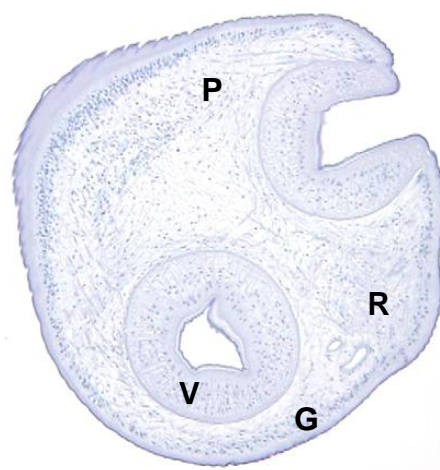


Figura 10b. Inmunolocalización de GP50 (1:64000) en cisticercos evaginados. **C)** escólex 10X y **D)** escólex incubado con suero de conejo preinmune.

GP-50 en proglótidos maduros y grávidos de *T. solium*

En la figura 11A se muestra la distribución de GP50 en el adulto de *T. solium* siendo muy extensa en algunas estructuras reproductoras (fig 11A y 11C) como son: conductos seminíferos (**CS**) los cuales están llenos de espermatozoides que expresan a GP50, también hay marca en miocitones subtegumentarios (**cST**), parénquima (**P**), y corpúsculos calcáreos (**CC**). Se logra ver una estructura (flecha) que corresponde al conducto de la vagina (**Vg**) cortada transversalmente (fig 11C), la cual se encuentra justamente por debajo del poro genital (**PG**), así como fibras musculares (**FM**) que corren longitudinal y transversalmente en el parénquima del proglótido, estructuras que no expresan GP50 (fig 11C).

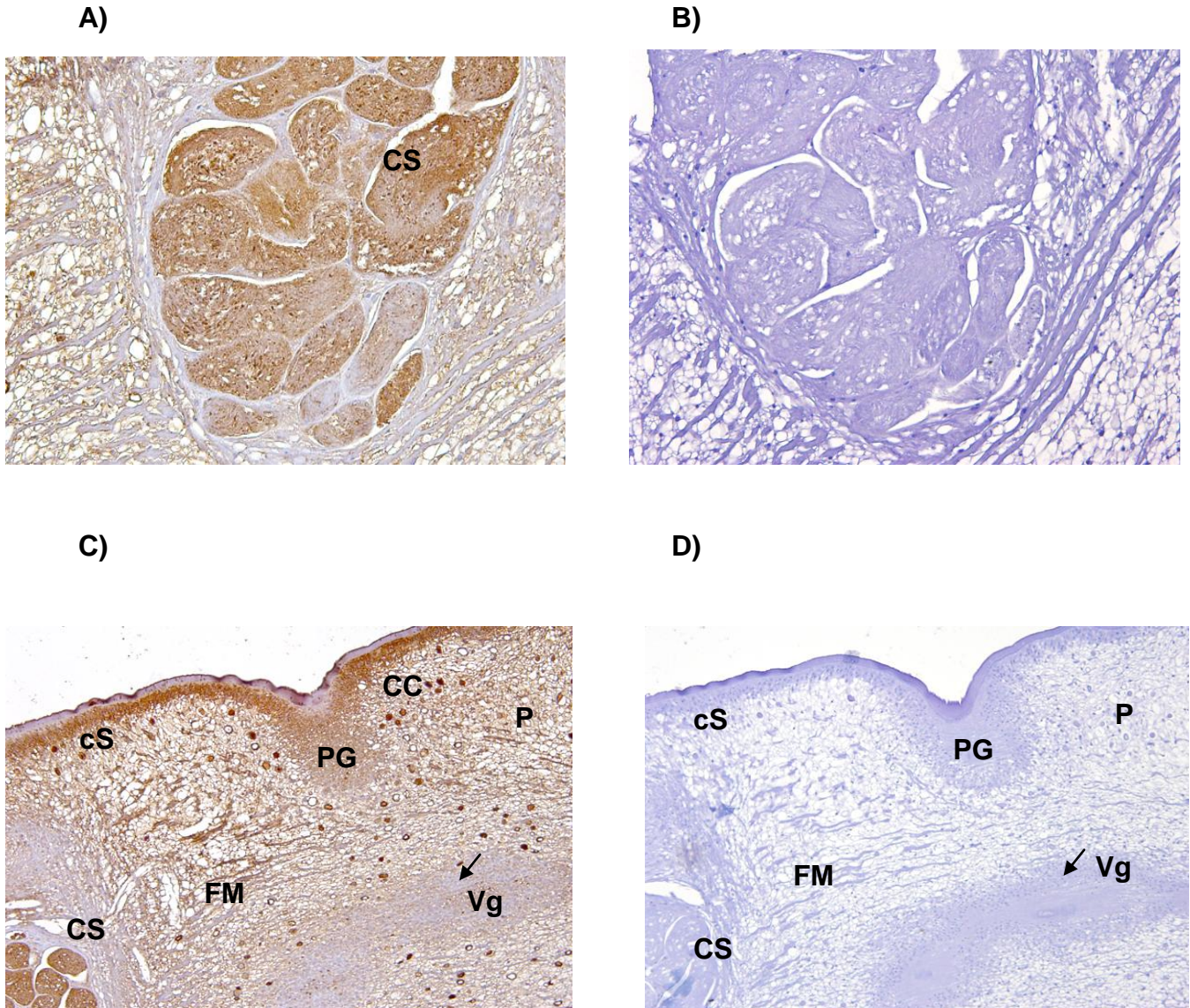


Figura 11a. Inmunolocalización de GP50 (1:64,000) en el parásito adulto. **A y C)** proglótido maduro 20X, **B y D)** proglótido maduro incubado con suero de conejo preinmune10X.

En la figura 11E se observa la reacción sobre una estructura fuertemente teñida que al verse en el microscopio de luz (fig 11F), se logra ver en su interior estructuras filiformes que corresponden a los espermatozoides.

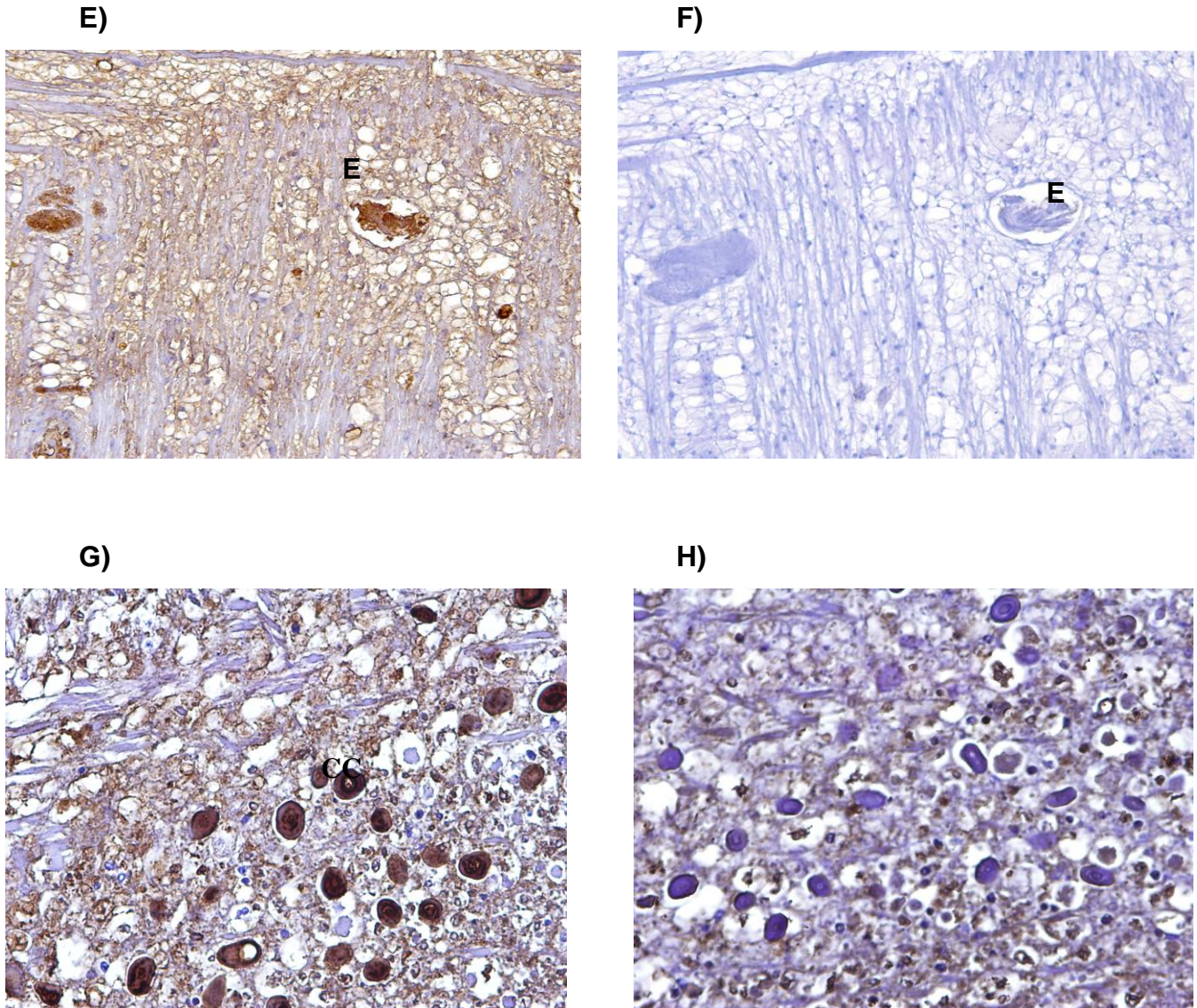


Figura 11b. Inmunolocalización de GP50 (1:64,000) en el parásito adulto. **E)** proglótido pregrávido 20X **F)** proglótido pregrávido incubado con suero de conejo preinmune 20X **G)** proglótido pregrávido 40X **H)** proglótido pregrávido incubado con suero de conejo preinmune 40X.

Por último hay una marca intensa de GP50 en parénquima y corpúsculos calcáreos de proglótidos grávidos (fig 11G), así como en las oncosferas (**Onc**) en desarrollo, cuando el huevo está totalmente maduro ya no hay expresión de GP50 (fig 11I).

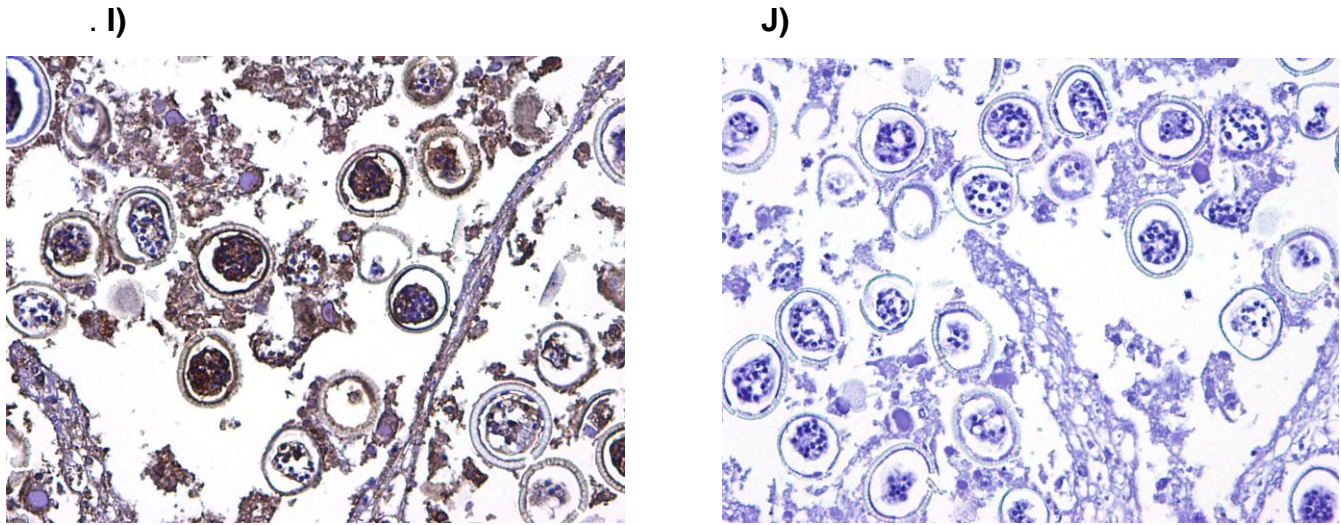


Figura 11c. Inmunolocalización de GP50 (1:64,000) en el parásito adulto. **I)** proglótido grávido 40X. **J)** proglótido grávido incubado con suero de conejo preinmune 40X.

En el siguiente cuadro se resumen los resultados de localización de glicoproteínas 14, 24 y 50 en las estructuras y tejidos de *T. solium*.

Cisticerco

	Glicocáliz	Tegumento	Subtegumento	Parénquima	Corpúsculos calcareos	Escólex
GP14	+	-	-	+	-	-
GP24	-	-	-	+	+	+
GP50	++	++	++	++		

Tenia

	Glicocáliz	Canales de excreción	Conducto deferente	útero	ovarios	vagina	Testículos Espermatozoides	oncosferas
GP14	-	-	-	-	+	+	+	-
GP24	-	+	++	++	++	++	++	
GP50	++	-	++	-	-	-	++	++

Cuadro 1. Resumen de la localización de las glicoproteínas estudiadas.

Las glicoproteínas obtenidas de cisticercos de *T. solium* han sido ampliamente utilizadas para serodiagnóstico (5); consisten en una familia de proteínas de 8 kDa estrechamente relacionadas (49), y tienen de 0 a 3 sitios de N-glicosilación (10). No hay evidencia de O-glicosilación, por lo que se sugiere que los carbohidratos N-ligados contribuyen a la antigenicidad de las glicoproteínas de *T. solium* y son los responsables de la variación entre ellas en el parásito (50).

La glicoproteína de 8 kDa es el componente básico de la mezcla de glicoproteínas (LLGP) de *T. solium* y se encuentra presente en las glicoproteínas 14, 18 y 21, así como, 24, 39 y 42 kDa (45;51), por lo que existe cierta relación entre las glicoproteínas diagnósticas aunque no hay datos que indiquen su posible función.

La familia de genes que codifica para proteínas de 8 kDa está ampliamente distribuida en los ténidos, se sabe que son responsables de las reacciones cruzadas en el diagnóstico de algunas cestodiasis (11). En contraste, los helmintos también pueden sintetizar antígenos glicoproteicos únicos que pueden ser útiles para serodiagnóstico diferencial y específico de infecciones por helmintos (51), además que pueden estar involucradas en diversas funciones biológicas (11;52).

El presente estudio muestra uno de los primeros trabajos de localización de glicoproteínas importantes para el diagnóstico de *T. solium* en los estadios larvario y adulto de este parásito. Los datos son muy interesantes ya que, a pesar de que estas glicoproteínas fueron producidas en bibliotecas de cDNA de cisticerco y han sido de gran utilidad para el diagnóstico de cisticercosis durante

casi dos décadas (5), parecen tener un papel importante también en el parásito adulto, a saber;

La GP14, está asociada al parénquima del cisticerco y poco representada en el parásito adulto y cisticerco.

La GP24, es abundante en parénquima, corpúsculos calcáreos y en los conductos de excreción del cisticerco, lo que sugiere que esta proteína se secreta o excreta. Hasta el momento solo se han descrito glicoproteínas N-glicosiladas en *T. solium*, ésto contrasta con lo descrito para otros parásitos en los que las glicoproteínas de excreción son principalmente O-glicosiladas (53). Con respecto a esto, se sabe que los antígenos de helmintos, que son inmunoestimulantes, provienen de productos secretados. Esto hace a los glicoconjugados especialmente importantes, ya que contienen los determinantes antigénicos que se comparten entre moléculas de secreción y de superficie celular (11). Además esta glicoproteína (GP-24) está asociada al adulto de forma importante ya que se encuentra presente en la mayoría de las estructuras reproductoras, como son los espermatozoides, el conducto deferente, los ovarios, el útero y la vagina.

La GP50, tiene distribución muy extensa; en el cisticerco está localizada en el glicocálix, los miocitones subtegumentarios, el tegumento y el parénquima, sitios que probablemente participan de forma activa en la interacción hospedero-parásito. Esta distribución es muy parecida a la que describió el grupo de la Dra Blanca Restrepo en el 2003 con un anticuerpo contra la glicoproteína de 12 kDa, con el que se reconocen la mayoría de estructuras en el cisticerco: tegumento, subtegumento, parénquima, canal espiral y membrana vesicular, sitios de

interacción directa con el hospedero (35). El anticuerpo anti-GP50 está producido en contra de la glicoproteína nativa, y quizás se estén reconociendo sus epítomos antigénicos en su forma original, a lo que se puede deber su amplia distribución.

En el adulto, la GP50 se encontró asociada a miocitones subtegumentarios, parénquima, corpúsculos calcáreos, así como a los conductos seminíferos, los cuales se encuentran llenos de espermatozoides que expresan la GP50, además se asocian a la etapa de oncosferas en desarrollo, los cuales al estar totalmente maduros y con el embrióforo formado ya no expresan a la glicoproteína, por lo que la GP50 se está expresando de forma diferencial en las etapas de desarrollo del huevo.

La localización de GP50 en estructuras reproductoras masculinas así como en las oncosferas en desarrollo, sugiere su participación en los procesos de reproducción del parásito. En vista de que la GP50 tiene dos proteínas homólogas en el adulto (33 y 38 kDa) (46), quizás la relación entre esta glicoproteína con las proteínas del adulto sea una de las explicaciones a su expresión en órganos reproductores, así como en oncósferas en desarrollo.

Como se mencionó en párrafos anteriores, la GP24 está presente en la mayoría de las estructuras reproductoras del adulto, la explicación entre la relación de la GP50 con las proteínas del adulto pueda retomarse para explicar la presencia de la GP24 en órganos reproductores y proponer que existe una relación más estrecha entre estas dos glicoproteínas de *T. solium*.

Con estos estudios se proporciona información de la localización y el posible papel de estas glicoproteínas en ambos, cisticerco y adulto de *T. solium*;

es un acercamiento al papel que juegan los carbohidratos en este parásito helminto. En resumen, estas glicoproteínas están ampliamente distribuidas en ambos estadios, aunque no se sabe con exactitud su función principal, se puede proponer de acuerdo a su expresión diferencial su posible participación en la relación hospedero parásito y la influencia de cada glicoproteína en esta relación sería proporcional a su antigenicidad y a su vez esta antigenicidad está sujeta a su contenido de carbohidratos.

- (1) Flisser A, Rodriguez-Canul R, Willingham AL, III. Control of the taeniosis/cysticercosis complex: future developments. *Vet Parasitol* 2006 Jul 31;139(4):283-92.
- (2) Flisser A. Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*. *Prog Clin Parasitol* 1994;4:77-116.
- (3) Flisser A. Risk factors and control measures for taeniosis and cisticercosis in Latin America. In: Craig., Pawlowski, Z. Eds, *Cestode Zoonoses: Echinococcosis and Cysticercosis an Emergent and Global Problem*. IOS Press, Amsterdam, pp3-11. 2002.

Ref Type: Generic

- (4) Estrada JJ, Kuhn RE. Immunochemical Detection of Antigens of Larval *Taenia-Solium* and Anti-Larval Antibodies in the Cerebrospinal-Fluid of Patients with Neurocysticercosis. *Journal of the Neurological Sciences* 1985 Nov;71(1):39-48.
- (5) Tsang VC, Brand JA, Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infect Dis* 1989 Jan;159(1):50-9.
- (6) Ito A, Plancarte A, Ma L, Kong Y, Flisser A, Cho SY, et al. Novel antigens for neurocysticercosis: Simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1998 Aug;59(2):291-4.
- (7) Greene RM, Wilkins PP, Tsang VC. Diagnostic glycoproteins of *Taenia solium* cysts share homologous 14- and 18-kDa subunits. *Mol Biochem Parasitol* 1999 Apr 30;99(2):257-61.
- (8) Greene RM, Hancock K, Wilkins PP, Tsang VC. *Taenia solium*: molecular cloning and serologic evaluation of 14- and 18-kDa related, diagnostic antigens. *J Parasitol* 2000 Oct;86(5):1001-7.
- (9) Restrepo BI, Obregon-Henao A, Mesa M, Gil DL, Ortiz BL, Mejia JS, et al. Characterisation of the carbohydrate components of *Taenia solium* metacestode glycoprotein antigens. *International Journal for Parasitology* 2000 May;30(6):689-96.
- (10) Obregon-Henao A, Gil DL, Gomez DI, Sanzon F, Teale JM, Restrepo BI. The role of N-linked carbohydrates in the antigenicity of *Taenia solium* metacestode glycoproteins of 12, 16 and 18 kD. *Mol Biochem Parasitol* 2001 May;114(2):209-15.
- (11) Nyame AK, Kwar ZS, Cummings RD. Antigenic glycans in parasitic infections: implications for vaccines and diagnostics. *Arch Biochem Biophys* 2004 Jun 15;426(2):182-200.

- (12) Hancock K, Pattabhi S, Greene RM, Yushak ML, Williams F, Khan A, et al. Characterization and cloning of GP50, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. *Mol Biochem Parasitol* 2004 Jan;133(1):115-24.
- (13) Hirasaki S, Murakami K, Mizushima T, Hiramatsu K, Hanayama Y, Kanamori T, et al. Long-term *Taenia saginata* infection successfully treated with meglumine/diatrizoate sodium. *Intern Med* 2012;51(2):177-9.
- (14) Laclette JP, Ornelas Y, Merchant MT, Willms K. Ultrastructure of surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. In Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C. ; Beltran, F. (eds). *Cysticercosis: Present states knowledge and perspectives*. Academic Press New York 1982;375-87.
- (15) Flisser AMIDH. *Cisticercosis humana*. Parasitos y ciclos de vida. El Manual Moderno. 1997.
Ref Type: Generic
- (16) Rabiela MT, Hornelas Y, Garcia-Allan C, Rodriguez-del-Rosal E, Flisser A. Evagination of *Taenia solium* cysticerci: a histologic and electron microscopy study. *Arch Med Res* 2000 Nov;31(6):605-7.
- (17) Smyth J.D, McManus D.P. The physiology and biochemistry of cestodes. The adult: special structural features. 1989.
Ref Type: Generic
- (18) Campbell NA. Osmoregulación y excreción. *Biología*. Ed Panamericana. p 922-929. 2005.
Ref Type: Generic
- (19) Willms K, Caro JA, Robert L. Ultrastructure of spermatogonia and spermatocyte lobules in *Taenia solium strobilae* (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae) from golden hamsters. *Parasitology Research* 2003 Aug;90(6):479-88.
- (20) Arme C, Pappas P. Biology of Eucestoda. In: Lumsden, R.D and Hildreth, M.B: *The Fine Structures of Adult Tapeworms*. Volume 1. Academic Press. 1983.
Ref Type: Generic
- (21) Schantz PM, Sarti-Gutierrez E. Diagnostic methods and epidemiologic surveillance of *Taenia solium* infection. *Acta Leiden* 1989;57(2):153-63.
- (22) Allan JC, Avila G, Garcia NJ, Flisser A, Craig PS. Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. *Parasitology* 1990 Dec;101 Pt 3:473-7.
- (23) Flisser A, Plancarte A, Correa D, Rodriguez-del-Rosal E, Feldman M, Sandoval M, et al. New approaches in the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis and taeniasis. *Ann Parasitol Hum Comp* 1990;65 Suppl 1:95-8.

- (24) Levine MZ, Lewis MM, Rodriguez S, Jimenez JA, Khan A, Lin S, et al. Development of an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay using two baculovirus expressed recombinant antigens for diagnosis of *Taenia solium* taeniasis. *J Parasitol* 2007 Apr;93(2):409-17.
- (25) Gonzalez AE, Cama V, Gilman RH, Tsang VC, Pilcher JB, Chavera A, et al. Prevalence and comparison of serologic assays, necropsy, and tongue examination for the diagnosis of porcine cysticercosis in Peru. *Am J Trop Med Hyg* 1990 Aug;43(2):194-9.
- (26) Castillo M, Salgado P, Rojas R, Sotelo J, Sanchez J, Mukherji SK. Unusual imaging manifestations of neurocysticercosis. *International Journal of Neuroradiology* 1996 Mar;2(2):168-75.
- (27) Correa D, Sandoval MA, Harrison LJ, Parkhouse RM, Plancarte A, Meza-Lucas A, et al. Human neurocysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989 Nov;83(6):814-6.
- (28) Flisser A, Gyorkos TW. Contribution of immunodiagnostic tests to epidemiological/intervention studies of cysticercosis/taeniosis in Mexico. *Parasite Immunol* 2007 Dec;29(12):637-49.
- (29) Willms K, Robert L. Ultrastructure of a spermatid transport system in the mature proglottids of experimental *Taenia crassiceps* (WFU strain). *Parasitology Research* 2007 Sep;101(4):967-73.
- (30) Pan American Health Organization. PAHO/WHO informal consultation on the taeniasis/cysticercosis complex. Brasilia, Brazil: Pan American Health Organization. 1997.

Ref Type: Generic

- (31) Hancock K, Patabhi S, Whitfield FW, Yushak ML, Lane WS, Garcia HH, et al. Characterization and cloning of T24, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. *Mol Biochem Parasitol* 2006 May;147(1):109-17.
- (32) Hancock K, Narang S, Patabhi S, Yushak ML, Khan A, Lin SC, et al. False positive reactivity of recombinant, diagnostic, glycoproteins produced in High Five insect cells: effect of glycosylation. *J Immunol Methods* 2008 Jan 31;330(1-2):130-6.
- (33) Wilson M, Bryan RT, Fried JA, Ware DA, Schantz PM, Pilcher JB, et al. Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. *J Infect Dis* 1991 Nov;164(5):1007-9.

- (34) Cummings RD, Nyame AK. Glycobiology of schistosomiasis. *FASEB J* 1996 Jun;10(8):838-48.
- (35) Obregon-Henao A, Londono DP, Gomez DI, Trujillo J, Teale JM, Restrepo BI. In situ detection of antigenic glycoproteins in *Taenia solium* metacestodes. *J Parasitol* 2003 Aug;89(4):726-32.
- (36) Restrepo BI, Obregon-Henao A, Mesa M, Gil DL, Ortiz BL, Mejia JS, et al. Characterisation of the carbohydrate components of *Taenia solium* metacestode glycoprotein antigens. *International Journal for Parasitology* 2000 May;30(6):689-96.
- (37) Cummings RD, Nyame AK. Schistosome glysoconjugates. *Biochim Biophys Acta* 1999 Oct 8;1455(2-3):363-74.
- (38) Peralta RH, Espindola NM, Pardini AX, Iha AH, Moura H, Barr JR, et al. *Taenia crassiceps* cysticerci: Characterization of the 14-kDa glycoprotein with homologies to antigens from *Taenia solium* cysticerci. *Experimental Parasitology* 2010 Mar;124(3):295-300.
- (39) Kouguchi H, Matsumoto J, Yamano K, Katoh Y, Oku Y, Suzuki T, et al. *Echinococcus multilocularis*: Purification and characterization of glycoprotein antigens with serodiagnostic potential for canine infection. *Experimental Parasitology* 2011 May;128(1):50-6.
- (40) Hewitson JP, Filbey KJ, Grainger JR, Dowle AA, Pearson M, Murray J, et al. *Heligmosomoides polygyrus* Elicits a Dominant Nonprotective Antibody Response Directed against Restricted Glycan and Peptide Epitopes. *Journal of Immunology* 2011 Nov 1;187(9):4764-77.
- (41) Denkers EY, Wassom DL, Krco CJ, Hayes CE. The Mouse Antibody-Response to *Trichinella-Spiralis* Defines A Single, Immunodominant Epitope Shared by Multiple Antigens. *Journal of Immunology* 1990 Apr 15;144(8):3152-9.
- (42) Schabussova I, Amer H, van Die I, Kosma P, Maizels RM. O-Methylated glycans from *Toxocara* are specific targets for antibody binding in human and animal infections. *International Journal for Parasitology* 2007 Jan;37(1):97-109.
- (43) Maass DR, Harrison GB, Grant WN, Hein WR, Shoemaker CB. Intraspecific Epitopic Variation in a Carbohydrate Antigen Exposed on the Surface of *Trichostrongylus colubriformis* Infective L3 Larvae. *Plos Pathogens* 2009 Sep;5(9).
- (44) Maizels RM, Burke J, Denham DA. Phosphorylcholine-Bearing Antigens in Filarial Nematode Parasites - Analysis of Somatic Extracts, Invitro Secretions and Infection Sera from *Brugia-Malayi* and *Brugia-Pahangi*. *Parasite Immunology* 1987 Jan;9(1):49-66.

- (45) Plancarte A, Hirota C, Martinez-Ocana J, Mendoza-Hernandez G, Zenteno E, Flisser A. Characterization of GP39-42 and GP24 antigens from *Taenia solium* cysticerci and of their antigenic GP10 subunit. *Parasitol Res* 1999 Aug;85(8-9):680-4.
 - (46) Levine MZ, Calderon JC, Wilkins PP, Lane WS, Asara JM, Hancock K, et al. Characterization, cloning, and expression of two diagnostic antigens for *Taenia solium* tapeworm infection. *J Parasitol* 2004 Jun;90(3):631-8.
 - (47) Flisser A, Avila G, Maravilla P, Mendlovic F, Leon-Cabrera S, Cruz-Rivera M, et al. *Taenia solium*: current understanding of laboratory animal models of taeniosis. *Parasitology* 2010 Mar;137(3):347-57.
 - (48) Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* 1970;227(5259):680-&.
 - (49) Sako Y, Nako M, Ikejima T, Piao XZ, Nakaya K, Ito A. Molecular characterization and diagnostic value of *Taenia solium* low-molecular-weight antigen genes. *Journal of Clinical Microbiology* 2000 Dec;38(12):4439-44.
 - (50) Haslam SM, Restrepo BI, Obregon-Henao A, Teale JM, Morris HR, Dell A. Structural characterization of the N-linked glycans from *Taenia solium* metacestodes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2003 Jan;126(1):103-7.
 - (51) Jia WZ, Yan HB, Lou ZZ, Ni XW, Liu HX, Li HM, et al. Genetic variation of the 8-kDa glycoprotein family from *Echinococcus granulosus*, *Taenia multiceps* and *Taenia hydatigena*. *Chin Med J (Engl)* 2011 Sep;124(18):2849-56.
 - (52) Cummings RD, Turco S. *Parasitic infections. Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor. NY. 2009.
- Ref Type: Generic
- (53) Page AP, Richards DT, Lewis JW, Omar HM, Maizels RM. Comparison of Isolates and Species of *Toxocara* and *Toxascaris* by Biosynthetic Labeling of Somatic and Es Proteins from Infective Larvae. *Parasitology* 1991 Dec;103:451-64.