



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Análisis de la presencia de carbohidratos en la  
calreticulina de *Taenia solium***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:  
ULISES GONZÁLEZ GONZÁLEZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
M. EN C. MAYRA YOLANDA CRUZ  
RIVERA**

**2015**

Ciudad Universitaria, D. F.



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  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
Secretaría General  
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

**DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ**  
Director General  
Dirección General de Administración Escolar  
**Presente**

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**Análisis de la presencia de carbohidratos en la calreticulina de *Taenia solium*.**

realizado por **GONZÁLEZ GONZÁLEZ ULISES** con número de cuenta **3-0626069-0** quien ha decidido titularse mediante la opción de **tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario	Dr. Edgar Zenteno Galindo	
Propietario	M. en C. Fela Mendlovic Pasol	
Propietario	M. en C. Mayra Yolanda Cruz Rivera	
Tutora		
Suplente	Biól. Saúl Cano Colín	
Suplente	Dr. José Pablo Maravilla Campillo	

Atentamente  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU "**  
 Ciudad Universitaria, D. F., a 17 de octubre de 2014  
**EL JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES**

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.  
 MAG/MGM/mdm

## Hoja de datos del jurado

### 1.- Datos del alumno

Ulises González González (uligonzalez@ciencias.unam.mx)  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
306260690

### 2.- Datos del tutor

M. en C. Mayra Yolanda Cruz Rivera (mayracr@yahoo.com)  
Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM

### 3.- Datos del sinodal 1

Dr. Edgar Zenteno Galindo (ezenteno@unam.mx)  
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM

### 4.- Datos del sinodal 2

Dra. Fela Mendlovic Pasol (fmendlo@yahoo.com)  
Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM

### 5.- Datos del sinodal 3

Biól. Saúl Cano Colín (saulcc@unam.mx)  
Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
UNAM

### 6.- Datos del sinodal 4

Dr. José Pablo Maravilla Campillo (maravillap@yahoo.com)  
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

### 7.- Datos del trabajo escrito

“Análisis de la presencia de carbohidratos en la calreticulina de *Taenia solium*”

58p

2015

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunomodulación y Agentes Patógenos de la Dra. Ana Flisser en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica

PAPIIT

Clave del proyecto: IN214813

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>RESUMEN.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b><i>Taenia solium</i> .....</b>	<b>10</b>
2.1.1	Cisticerco .....	12
2.1.2	Ciclo de vida de <i>T. solium</i> .....	13
<b>2.2</b>	<b>Moléculas que participan en la interacción hospedero-parásito.....</b>	<b>14</b>
2.2.1	Proteínas .....	14
2.2.2	Carbohidratos.....	16
2.2.3	Glicoconjugados .....	16
2.2.4	Glicosilación y glicoproteínas .....	18
2.2.5	Glicanos antigénicos en infecciones parasitarias.....	20
2.2.6	Glicoproteínas como inmunomoduladores en helmintos .....	22
2.2.7	Glicoproteínas en cisticerco, oncósfera y céstodo de <i>T. solium</i> .....	22
<b>2.3</b>	<b>Lectinas.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4</b>	<b>Calreticulina.....</b>	<b>24</b>
2.4.1	Calreticulina de <i>T. solium</i> .....	26
<b>3</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
<b>5.1</b>	<b>Objetivo general .....</b>	<b>28</b>
<b>5.2</b>	<b>Objetivos particulares.....</b>	<b>28</b>
<b>6</b>	<b>DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>29</b>
<b>7</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
<b>7.1</b>	<b>Extractos crudos de los diferentes estadios de <i>T. solium</i> .....</b>	<b>29</b>
7.1.1	Parásitos.....	29
7.1.2	Evaginación de cisticercos.....	30
7.1.3	Obtención de productos de excreción-secreción de la tenia.....	30
7.1.4	Preparación del antígeno de cisticerco, cisticerco evaginado y tenia.....	30
7.1.5	Cuantificación de los extractos proteicos .....	31
<b>7.2</b>	<b>Obtención de la rTsCRT.....</b>	<b>31</b>
7.2.1	Centrifugación diferencial para la separación de la rTsCRT.....	31
7.2.2	Tinción negativa “zinc-imidazol” .....	31
7.2.3	Electroelución para la purificación de la rTsCRT .....	31
<b>7.3</b>	<b>Producción de anticuerpos anti-rTsCRT .....</b>	<b>32</b>
7.3.1	Inmunización de ratones Balb/c con rTsCRT.....	32
7.3.2	Titulación de anticuerpos anti-rTsCRT .....	32
<b>7.4</b>	<b>Identificación, desglicosilación y análisis de carbohidratos presentes en la TsCRT.....</b>	<b>32</b>
7.4.1	Identificación de la TsCRT con anticuerpos anti-rTsCRT (“western-blot”).....	32
7.4.2	Tratamiento de desglicosilación general y tipo de glicosilación de la TsCRT.....	33

7.4.3	Identificación del tipo de carbohidratos presentes en la TsCRT con lectinas (“lectin-blot”)	33
7.5	Determinación del peso molecular de la rTsCRT y TsCRT de <i>T. solium</i>	33
8	<b>RESULTADOS</b>	34
8.1	Purificación y cuantificación de la rTsCRT	34
8.2	Título de anticuerpos anti-rTsCRT	35
8.3	Identificación de la TsCRT por “western-blot” utilizando anticuerpos policlonales específicos	36
8.4	Análisis de la presencia de carbohidratos en la TsCRT con glicosidasas en condiciones desnaturalizantes y nativas	38
8.5	Determinación del peso molecular de la TsCRT en los extractos de <i>T. solium</i> no desglicosilados y desglicosilados	40
8.6	Análisis del tipo de glicosilación de la TsCRT mediante el tratamiento con glicosidasas	41
8.7	Identificación de carbohidratos en la TsCRT en los diferentes extractos de <i>T. solium</i> por “lectin-blot”	42
8.7.1	Cisticerco	42
8.7.2	Tenia	44
8.7.3	Productos de excreción-secreción de la tenia	45
8.8	Determinación del peso molecular de la TsCRT en el “western-blot” y “lectin-blot” del extracto de tenia	47
9	<b>DISCUSIÓN</b>	48
10	<b>CONCLUSIONES</b>	54
11	<b>PERSPECTIVAS</b>	55
12	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	56

### Índice de figuras

<b>Figura A.-</b>	Anatomía del estadío adulto y cisticercos de <i>T. solium</i>	11
<b>Figura B.-</b>	Ciclo de vida de <i>T. solium</i>	14
<b>Figura C.-</b>	Monosacáridos más comunes encontrados en los vertebrados	18
<b>Figura D.-</b>	Representación esquemática de la glicosilación tipo <i>O</i> y <i>N</i>	19
<b>Figura E.-</b>	Estructura general de la calreticulina humana	25
<b>Figura F.-</b>	Predicción de sitios de glicosilación en la calreticulina de <i>T. solium</i>	26
<b>Figura G.-</b>	Diseño experimental para el análisis de la presencia de carbohidratos en la TsCRT	29
<b>Figura 1.-</b>	Purificación y cuantificación de la rTsCRT	34
<b>Figura 2.-</b>	Gráfica del título de anticuerpos anti-rTsCRT	35
<b>Figura 3.-</b>	Identificación de la TsCRT con anticuerpos anti-rTsCRT	37
<b>Figura 4.-</b>	Análisis de la presencia de carbohidratos en la TsCRT con glicosidasas	39
<b>Figura 5.-</b>	Desglicosilación de la TsCRT en los diferentes extractos de <i>T. solium</i>	40
<b>Figura 6.-</b>	Peso molecular de la TsCRT en los extractos de <i>T. solium</i> no desglicosilados y desglicosilados	41

<b>Figura 7.-</b> Análisis del tipo de glicosilación de la TsCRT .....	42
<b>Figura 8.-</b> Identificación de carbohidratos de la TsCRT en el extracto de cisticerco de <i>T. solium</i> con 11 lectinas diferentes .....	43
<b>Figura 9.-</b> Identificación de carbohidratos de la TsCRT en el adulto de <i>T. solium</i> con lectinas .....	44
<b>Figura 10.-</b> Identificación de carbohidratos de la TsCRT en los productos de E-S del adulto de <i>T. solium</i> con lectinas.....	46
<b>Figura 11.-</b> Peso molecular de la TsCRT peso molecular de la TsCRT en el “western-blot” y “lectin-blot” del extracto de tenia.....	47

### Índice de cuadros

<b>Cuadro A.-</b> Características generales de los diferentes tipos de glicosilación .....	20
<b>Cuadro 1.-</b> Lectinas utilizadas para la identificación de carbohidratos presentes en la TsCRT del cisticerco .....	43
<b>Cuadro 2.-</b> Lectinas utilizadas para la identificación de carbohidratos en la TsCRT de la tenia.....	45
<b>Cuadro 3.-</b> Lectinas usadas en la identificación de carbohidratos presentes en la TsCRT de los productos de E-S .....	46

## 1 RESUMEN

*Taenia solium* es un parásito que causa cisticercosis humana y porcina. El ciclo de vida de *T. solium* tiene como hospedero intermediario al cerdo, el cual se infecta al ingerir heces donde hay huevos del parásito adulto, cada huevo puede convertirse en un cisticerco, originando cisticercosis porcina. El hospedero definitivo es el humano, donde el parásito adulto habita en su intestino produciendo teniosis. Cuando el humano consume carne de cerdo con cisticercos vivos, estos evaginan y se fijan en las paredes del intestino, donde maduran hasta convertirse en tenias. El parásito cuenta con proteínas que participan en la regulación de diversos procesos, tanto intracelulares como extracelulares y una de ellas es la calreticulina de *T. solium* (TsCRT) que se expresa diferencialmente en los diferentes estadios de desarrollo del parásito y presenta en su estructura dos sitios potenciales de glicosilación. Se ha demostrado que los glicoconjugados participan en la respuesta inmune hacia los parásitos que afectan a animales y humanos está directamente determinada por carbohidratos en la superficie celular de los mismos y glicoconjugados secretados. Así mismo, los parásitos dependen de las proteínas de unión a carbohidratos en el hospedero para cumplir su ciclo de vida, promover su parasitismo y desarrollar su patología. Debido a la importancia de los carbohidratos dentro de las proteínas en el parasitismo, en el presente trabajo se identificaron los carbohidratos de la TsCRT. Para ello se produjeron anticuerpos anti-rTsCRT en ratones Balb/c inmunizados con TsCRT recombinante (rTsCRT) y los extractos crudos de los diferentes antígenos de *T. solium* se analizaron por “western-blot” usando estos anticuerpos específicos para identificar esta proteína. Se observó el reconocimiento de dos bandas diferentes, una de ellas de mayor peso molecular que presenta una variación de intensidad en los extractos de los diferentes estadios de *T. solium*. En los extractos de cisticerco es casi inapreciable, aumenta de intensidad en el cisticerco evaginado y en la tenia y productos de E-S es muy intensa. Posteriormente, se llevó a cabo la desglicosilación de la TsCRT con diferentes glicosidasas y el tratamiento con PNGasa F resultó en la desaparición de la banda de alto peso molecular, lo que indica una glicosilación de tipo N. Por último, se realizó un “lectin-blot” de la TsCRT para analizar el tipo de carbohidratos presentes. La composición principal de carbohidratos de la TsCRT es Gal $\beta$ 1-3GalNAc (identificada con PNA),  $\alpha$ -LFuc (LTL y UEA-1), Gal, GalNAc (SBA, VVA y AIA) y en menor proporción la Gal $\beta$ 1-4GlcNAc (Allo A). Se puede sugerir que esta composición de carbohidratos de la TsCRT le puede ayudar a la tenia a mantener su homeostasis dentro del hospedero definitivo para mantener su parasitismo.

## 1.1 ABSTRACT

*Taenia solium* is a helminth whose intermediate host is the pig, which becomes infected by ingesting feces with *T. solium* eggs, producing porcine cysticercosis. Humans are the definitive host and become infected after ingestion of pork meat with live cysticerci. The cysts evaginate and attach to the intestinal mucosa where they differentiate into tapeworms producing taeniosis. The parasite relies on cellular regulating proteins including glycoproteins that are described to be important in the host-parasite interaction; one of them is *T. solium* calreticulin (TsCRT). This protein is differentially expressed during each stage of development and presents two sites of glycosylation. Mice were immunized with recombinant TsCRT (rTsCRT) to produce specific anti-rTsCRT antibodies. Western-blot of the crude extracts of the different stages of the parasite were subjected to deglycosylation with PNGase F, O-glycosidase and Sialidase-A were performed and the anti-rTsCRT antibodies were used to identify the native TsCRT. We also carried out a lectin-blot of the extracts to analyze the carbohydrates in the native TsCRT. Invaginated and recently evaginated cysticerci show predominantly one band when probed with the anti-rTsCRT antibodies whereas in tapeworm crude extracts and excretion-secretion products a second heavier predominant isoform appears. When the extracts were PNGase-F deglycosylated, expression of the high molecular weight band disappeared, suggesting that TsCRT is N-linked glycosylated. The main carbohydrate composition of TsCRT was: Gal $\beta$ 1-3GalNAc,  $\alpha$ -LFuc, Gal, GalNAc and to a lesser extent Gal $\beta$ 1-4GlcNAc as revealed by lectin-blot analysis. These results show that TsCRT is glycosylated during the transformation from cysticerci to tapeworm. The specific function of TsCRT at the different stages could be regulated by the presence or absence of N-linked carbohydrates. The appearance of the glycosylated form implies a role for this protein during parasite differentiation. TsCRT glycosylation is supported by the presence of two N-glycosylation sites in the amino acid sequence of the protein.

## 2 INTRODUCCIÓN

### 2.1 *Taenia solium*

*Taenia solium* es un parásito obligado que causa cisticercosis humana y porcina. Pertenece al grupo de los platelmintos que son gusanos planos con cuerpo blando y en forma de cinta o listón. Son organismos triblásticos acelomados con simetría bilateral y pseudometaméricos (Brusca y Brusca, 2003). Su excreción es protonefridial y tienen un sistema nervioso ganglionar, este parásito corresponde a la clase Cestoidea que incluye organismos con cuerpo generalmente multisegmentado.

Clasificación de *T. solium* (Brusca y Brusca, 2003):

**Reino:** Animalia

**Phylum:** Platyhelminthes

**Clase:** Cestoidea

**Sub-clase:** Eucestoda

**Orden:** Cyclophyllidae

**Familia:** Taeniidae

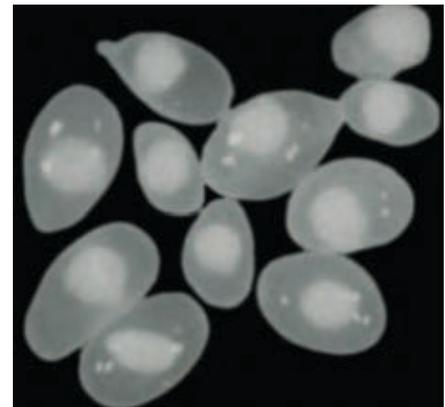
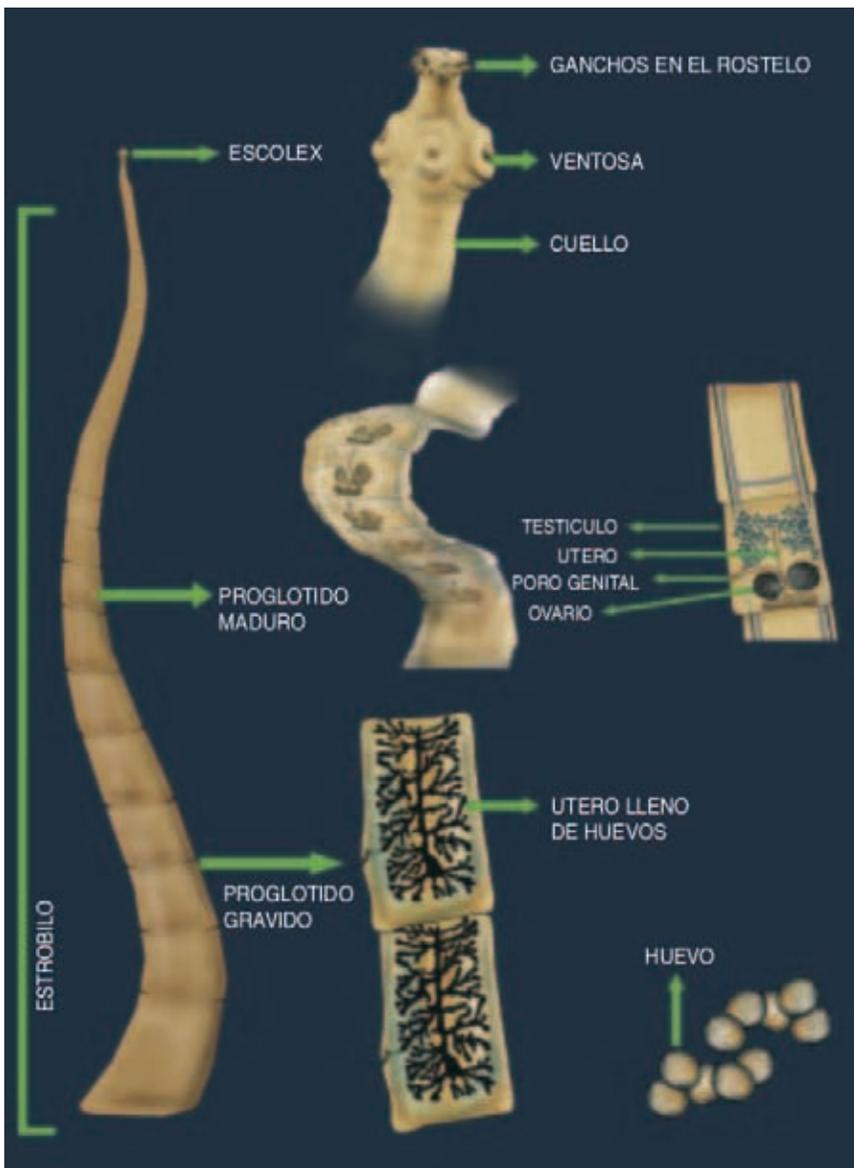
**Género:** *Taenia*

**Especie:** *Taenia solium* (Linnaeus, 1758)

*T. solium* mide entre 2 y 4 m de longitud, está formado por un escólex que posee cuatro ventosas y un rostelo coronado por dos hileras de ganchos que le sirven como estructuras de fijación y que le permiten a la tenia mantenerse anclada en la pared del yeyuno de su hospedero. El escólex es seguido por el cuello donde se forma el cuerpo o estróbil. El proceso de estrobilación (producción de proglótidos) ocurre en la región distal del cuello donde se ha demostrado la presencia de células totipotenciales (Willms *et al.*, 2001). Los proglótidos son segmentos independientes pero unidos entre si y están recubiertos por un tegumento con microtricas en su superficie exterior, constituyendo un tejido sincicial con funciones de secreción y absorción (Larralde, C., y Aluja, 2006). Esta estructura se parece a un listón con 700 a 1,000 proglótidos inmaduros, maduros y grávidos (Figura A).

Los proglótidos inmaduros aún no han desarrollado los órganos sexuales, el parénquima de éstos es de tamaño variable, cuentan con abundantes fibras musculares lisas y bolsas de glucógeno, estructuras que son menos abundantes conforme se van desarrollando los órganos genitales. La presencia de abundantes partículas de glucógeno distribuidas entre todas las estructuras, sugiere que la glucosa es la fuente de energía más importante para el céstodo (Larralde, C., y Aluja, 2006).

Los proglótidos maduros se encuentran entre los inmaduros y los grávidos, miden alrededor de 2 mm de largo y 3 mm de ancho. Las tenias son organismos hermafroditas y cada proglótido maduro al poseer órganos genitales masculinos y femeninos, puede considerarse como unidad reproductora independiente. Cada segmento maduro contiene entre 350 y 600 testículos, los cuales se desarrollan primero y un ovario trilobulado situado en la base del útero en el extremo posterior del proglótido (Flisser, 2013; Larralde, C., y Aluja, 2006).



**Figura A .- Anatomía del estadio adulto y cisticercos de *T. solium*.**

**A).** El escólex está formado por los ganchos del rostellum, cuatro ventosas y el cuello o región germinal donde se desarrollan los proglótidos. El cuerpo del gusano recibe el nombre de estrobilo formado por los proglótidos. Los proglótidos maduros contienen órganos sexuales masculinos y femeninos. Los proglótidos más alejados del escólex son grávidos y están llenos de huevos, los cuales se expulsan al medio por medio de las heces humanas. **B)** Cisticercos o estadio larvario de *T. solium*. (Flisser, 1991).

Los proglótidos grávidos parecen sacos llenos de huevos que se liberan con las heces del humano a partir de 3 a 5 meses después de la infección y cada proglótido contiene alrededor de 60,000 huevos situados en el interior del útero multilobulado. Conforme va creciendo el parásito adulto, los proglótidos se localizan más lejos del escólex y cada vez se hacen más grandes. Los proglótidos grávidos miden de 3 a 10 mm de longitud y 4 a 9 mm de ancho (Flisser, 2013). La ingestión de un proglótido grávido o partes de éste puede dar lugar a numerosos cisticercos en el hospedero intermediario (cerdo) y accidentalmente en el humano.

Los huevos de *T. solium* contenidos en los proglótidos grávidos se encuentran en distintos grados de maduración y alrededor del 50% contienen oncosferas infectivas totalmente desarrolladas. Los huevos inmaduros pueden madurar fuera del huésped y permanecer viables e infectivos en aguas negras, ríos o pasturas por semanas (Larralde, C., y Aluja, 2006). Los huevos son esféricos y tienen una apariencia radial, su tamaño varía desde 26 hasta 34 micrómetros. Están conformados por la oncosfera, o embrión hexacanto, y el embrióforo que lo rodea. Cuando un cerdo ingiere huevos, la bilis y enzimas disgregan los bloques embriofóricos y digieren la membrana oncosferral; de esta manera la oncosfera se libera y con la ayuda de sus ganchos y enzimas, puede cruzar la mucosa y circular por el torrente sanguíneo hasta que se transforma en la etapa larvaria o cisticerco (Flisser, 2013; Mendlovic *et al.*, 2014).

### **2.1.1 Cisticerco**

El cisticerco es el estado larvario de *T. solium*. Los cisticercos se establecen principalmente en el músculo esquelético y cardíaco, así como en el cerebro de sus hospederos y se desarrollan en aproximadamente 3 meses. En los seres humanos hay 2 tipos morfológicos de cisticerco: celuloso y racemoso (Rabiela *et al.*, 1989). El primero es una vesícula pequeña, esférica u ovalada, de color blanco o amarillo, que mide entre 0.5 y 1.5 cm y tiene una pared translúcida, a través de la cual se ve el escólex como un pequeño gránulo excéntrico sólido. Este tipo de cisticercos están generalmente separados de los tejidos del hospedero por una cápsula delgada de colágena, en donde se mantienen vivos. Los cerdos sólo contienen este tipo de cisticercos. El cisticerco racemoso sólo se encuentra en el cerebro humano, se asemeja a un racimo de uvas, y mide hasta 10 o incluso 20 cm y puede contener 60 ml de líquido vesicular. Se conforma por 2 cámaras; una interna que contiene al escólex y el canal espiral y está rodeado por el compartimento exterior que contiene el líquido vesicular, por lo general menos de 0.5 ml (Rabiela *et al.*, 2000).

La superficie que presenta el cisticerco a su hospedero humano o porcino es un tegumento citoplasmático, sincicial y continuo en toda la cara externa de la pared vesicular. Puesto que los céstodos carecen de tracto digestivo, obtienen sus nutrientes y excretan sus desechos a través de la superficie tegumental. Los cisticercos utilizan tanto rutas metabólicas anaeróbicas como aeróbicas dependiendo de la disponibilidad de oxígeno en el medio y obtienen sus nutrientes por difusión facilitada a través de la pared vesicular. Se han identificado distintas glicoproteínas en la superficie tegumentaria de la pared vesicular de los cisticercos, incluyendo inmunoglobulinas del hospedero (Larralde, C., y Aluja, 2006).

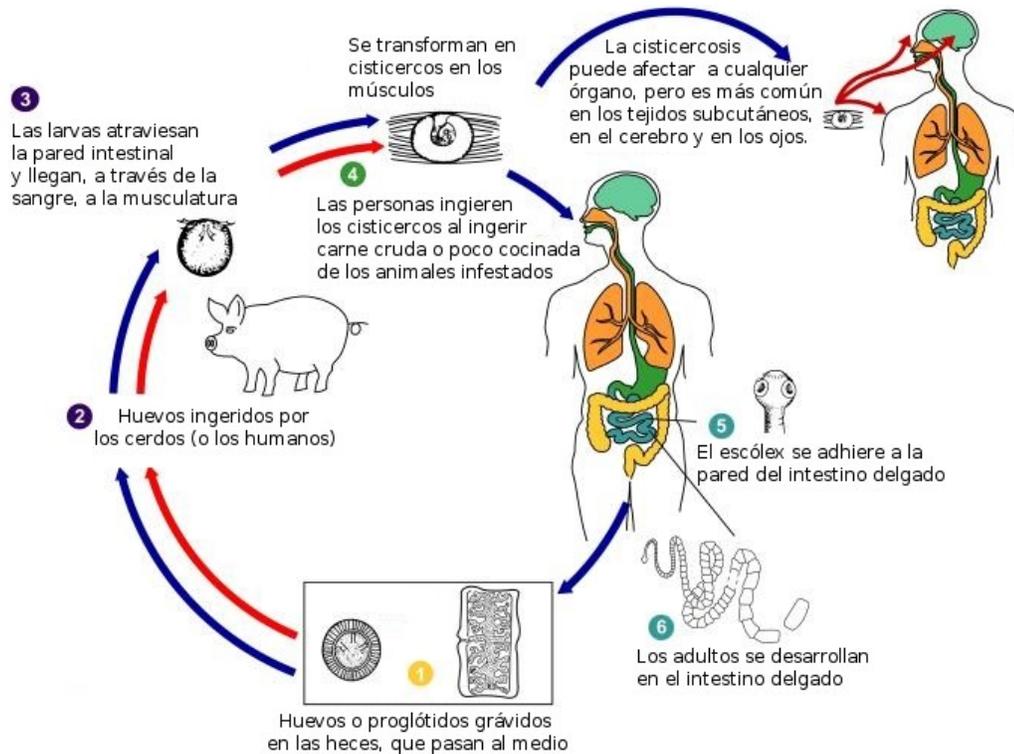
### **2.1.2 Ciclo de vida de *T. solium***

El ciclo de vida de *T. solium* incluye dos hospederos mamíferos: humanos, como hospederos definitivos y cerdos, como hospederos intermediarios. Sin embargo, el ser humano se considera un hospedero intermediario accidental, ya que puede adquirir la cisticercosis después de ingerir accidentalmente huevos de *T. solium*, pero no participa en el mantenimiento del ciclo de vida del parásito, el cual incluye la etapa adulta, el huevo y la fase larvaria (cisticerco) (Figura B).

En las heces del individuo parasitado con la tenia se liberan los huevos libres del proglótido o aún dentro de ellos, son ingeridos por los cerdos, una vez dentro del aparato digestivo de los cerdos, por acción de los jugos digestivos se separan los bloques embriofóricos, la oncosfera eclosiona y se activa al estar en contacto con el contenido duodenal. Una vez activadas, las oncosferas destruyen la mucosa intestinal mediante sus tres pares de ganchos y la liberación de enzimas hidrolíticas y penetran en la pared intestinal hasta alcanzar los vasos sanguíneos ó linfáticos, donde son transportados a diversos órganos y tejidos (músculo y sistema nervioso central) y al cabo de diez semanas se desarrolla completamente el cisticerco (Flisser, 1991; Gómez-García *et al.*, 2005). Los cisticercos en los seres humanos se desarrollan principalmente en el sistema nervioso central, ojos, músculo estriado, corazón, y tejido subcutáneo. En el cerebro, los parásitos se pueden encontrar en el parénquima, tejido subaracnoideo y los ventrículos causando neurocisticercosis, una de las principales parasitosis del sistema nervioso central (Flisser, 1988).

El ser humano desarrolla teniosis cuando alberga la forma adulta o tenia después de ingerir carne de cerdo cruda o semicocida con cisticercos vivos. Los cisticercos llegan al estómago y posteriormente llegan al intestino delgado donde por acción de los jugos gástricos y biliares el escólex evagina, la pared vesicular y el líquido vesicular se desintegran en el intestino, se fija por su doble corona de 22 a 32 ganchos y 4 ventosas a la mucosa en el primer tercio de la pared el intestino delgado (duodeno-yeyuno),

en 3-4 meses la tenia se desarrolla en su totalidad convirtiéndose así en el hospedero definitivo (Flisser, 2013; Rabiela *et al.*, 2000). Las personas con teniosis pueden estar conscientes de la enfermedad porque los proglótidos grávidos son liberados en las heces y pueden verse a simple vista. Sin embargo, no produce sintomatología (Flisser, 1988).



**Figura B.- Ciclo de vida de *T. solium*.** 1. Los proglótidos grávidos llenos de huevos pasan al medio ambiente (agua, suelo o pasto) a través de las heces. 2. Los huevos encontrados en el medio son ingeridos por los cerdos o humanos. 3. Las larvas atraviesan la pared intestinal y llegan a través del sistema circulatorio a diversos órganos y tejidos (más común en los tejidos subcutáneos, cerebro y ojos); posteriormente se transforman en cisticercos. 4. Las personas adquieren cisticercosis al ingerir carne cruda o poco cocinada de los cerdos infectados y atraviesan el tracto digestivo. 5. El escólex se adhiere a la pared del intestino delgado con ayuda de su corona de ganchos y ventosas. 6. Las tenias se desarrollan en el intestino delgado y es donde sueltan los huevos y proglótidos para comenzar un nuevo ciclo de vida. Imagen tomada de: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Cysticercosis.htm>.

## 2.2 Moléculas que participan en la interacción hospedero-parásito

### 2.2.1 Proteínas

Las proteínas son las biomoléculas más abundantes en los organismos. Se presentan en todas las células y tienen una gran variedad en tamaño, desde pequeños péptidos hasta grandes polímeros y también muestran una gran diversidad en cuanto a su función biológica. Las proteínas son polímeros que resultan de una reacción de condensación entre dos o más aminoácidos, estando cada residuo de aminoácido

unido al siguiente por medio de un enlace peptídico. Se definen normalmente cuatro niveles de estructura de las proteínas. La estructura primaria es la secuencia lineal de los residuos de aminoácidos, descrita desde el residuo de amino terminal hasta el último residuo que lleva el carboxilo terminal. La estructura secundaria se refiere a las disposiciones particularmente estables de los residuos de aminoácidos en el esqueleto de la proteína, sin participación de las cadenas laterales, que dan lugar a patrones estructurales repetitivos, tales como la alfa hélice y la configuración beta plegada. La estructura terciaria describe todos los aspectos del plegamiento tridimensional de un polipéptido. Cuando una proteína posee dos o más subunidades polipeptídicas, su disposición en el espacio se denomina estructura cuaternaria (Nelson *et al.*, 2013).

Una preparación pura de las proteínas es esencial para determinar sus propiedades y actividad biológica; éstas pueden purificarse gracias a las diversas propiedades en las que difieren. El primer paso en cualquier procedimiento de purificación para poder extraer una proteína de origen intracelular, es romper la célula, liberando a la proteína de interés en una solución llamada extracto crudo. Si es necesario, se puede realizar una centrifugación diferencial para preparar fracciones subcelulares o separar organelos específicos. Una vez extraída la proteína, se dispone de varios métodos para purificar una o más proteínas del medio en el que se contiene. De la variedad de procedimientos, los cromatográficos aprovechan las diferencias en tamaño, afinidad de unión, carga y otras propiedades de las proteínas (Nelson *et al.*, 2013). La electroforesis es una técnica para la separación de proteínas basada en la migración de las proteínas cargadas en un campo eléctrico y es usada principalmente como método analítico. Tiene la ventaja de que las proteínas se pueden visualizar bien y separadas, permitiendo al investigador estimar rápidamente el número de las proteínas diferentes en una mezcla o la proporción de la purificación de una proteína en particular, dentro de una preparación, de igual manera se puede determinar su punto isoeléctrico y peso molecular aproximado, si se realiza en presencia de SDS (Nelson *et al.*, 2013).

Las diferencias en la función de las proteínas son el resultado de las diferencias en su composición y secuencia de aminoácidos, así como de las modificaciones que sufren después de ser sintetizadas. Algunos ejemplos de las modificaciones postraduccionales que presentan las proteínas pueden ser la acilación (adición de grupos acilo), fosforilación (adición de grupos fosfato), metilación (adición de grupos metilo), hidroxilación (adición de grupos hidroxilo), glicosilación (adición de carbohidratos), prenilación (adición de moléculas hidrofílicas derivadas de isopreno) y nitrosilación (adición de un grupo nitroxilo) (Nelson *et al.*, 2013). Tales cambios químicos se pueden presentar en

todas las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos de los cuales se componen las proteínas y ocurren dentro del retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi, organelos membranosos encontrados en todas las células eucariontes que contienen más de la mitad de la membrana en una célula animal (p.e. 56% en un hepatocito) (Alberts *et al.*, 2008).

### **2.2.2 Carbohidratos**

Los carbohidratos son las biomoléculas más abundantes de la Tierra. Existen tres clases principales de carbohidratos: monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Los monosacáridos o azúcares simples consisten de un único polihidroxi aldehído o unidad de cetona. El monosacárido más abundante en la naturaleza es el azúcar de seis carbonos D-glucosa; son sólidos, incoloros y cristalinos solubles en agua e insolubles en solventes no polares, la mayoría tienen sabor dulce y los que se componen de más de cuatro carbonos presentan una estructura cíclica. Los oligosacáridos consisten de cadenas cortas de residuos de monosacáridos unidos por enlaces covalentes específicos llamados glicosídicos. Los más abundantes son los disacáridos, tal como la sacarosa que se compone de D-glucosa y D-fructosa. Los polisacáridos son polímeros que contienen 20 o más unidades de monosacáridos. Muchos polisacáridos tal como la celulosa, son cadenas lineales, otros como el glucógeno se encuentran ramificados. Ambos casos, la celulosa y el glucógeno se componen de D-glucosa, pero al diferir del tipo de enlaces glicosídicos, tienen diferentes propiedades y funciones biológicas (Nelson *et al.*, 2013).

Considerando la forma de la cadena abierta en los carbohidratos, uno de los átomos de carbono está unido a un átomo de oxígeno por un doble enlace, formando un grupo carbonilo; cada uno de los demás átomos de carbono tiene un grupo hidroxilo. Si el grupo carbonilo se halla en un extremo de la cadena carbonada, el monosacárido es un aldehído y recibe el nombre de aldosa; si el grupo carbonilo se encuentra en cualquier otra posición, el monosacárido es una cetona y se denomina cetosa. Los monosacáridos que poseen cuatro, cinco, seis y siete átomos de carbono en su cadena carbonada se denominan, respectivamente, tetrasas, pentosas, hexosas y heptosas (Nelson *et al.*, 2013).

### **2.2.3 Glicoconjugados**

Además de su función importante como combustibles de reserva (almidón, glucógeno) y como material estructural (celulosa, quitina, peptidoglicano), los polisacáridos y oligosacáridos son transportadores de información biológica. Una variedad de modificaciones y diversidad en la naturaleza, sirve frecuentemente para mediar funciones biológicas específicas. Por ejemplo, los grupos hidroxilo de diferentes monosacáridos pueden ser sometidos a fosforilación, sulfatación, metilación, O-acetilación y

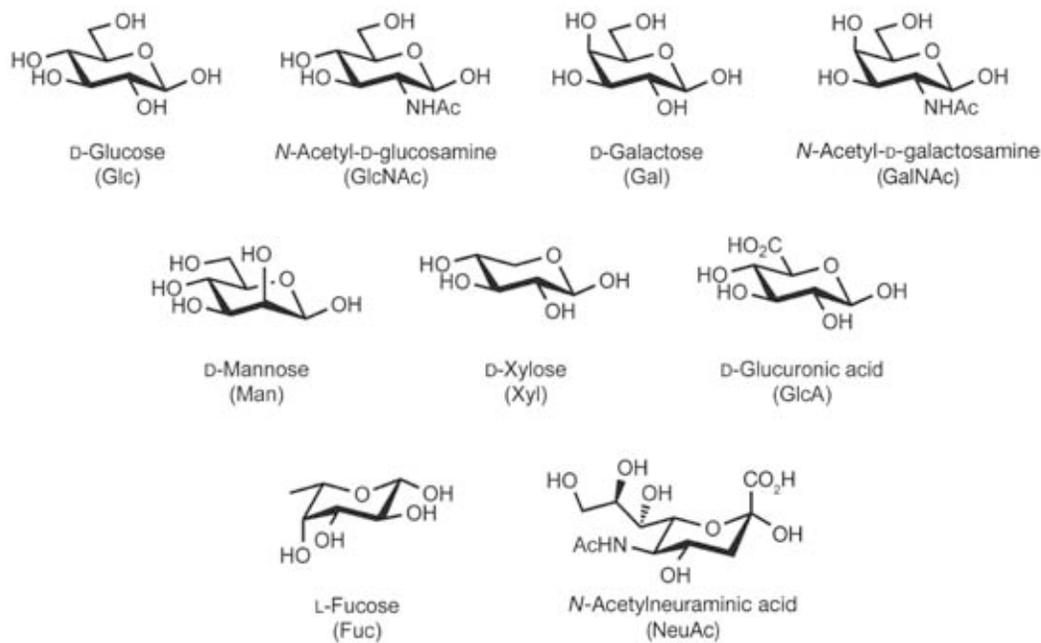
acilación-grasa. Grupos amino pueden permanecer libres o ser N-acetilados o N-sulfatados. Grupos carboxilo son ocasionalmente sometidos a lactonización de grupos hidroxilo cercanos. Los glicanos interactúan con muchos tipos de proteínas como enzimas, anticuerpos y proteínas de unión a glicanos (GBPs), que difieren en los tipos de glicanos que reconoce y en su afinidad de unión. La unión de glicanos a proteínas (glicoproteínas) representa el principal camino en cual la información contenida en las estructuras de los glicanos es reconocida, descifrada y puesta dentro de la acción biológica (Varki y Chrispeels, 1999). Otras moléculas que contienen carbohidratos específicos actúan en el reconocimiento intercelular y en la adhesión célula-célula, en la migración celular que se produce durante el desarrollo embrionario, en la coagulación sanguínea, en la respuesta inmunitaria y otras funciones específicas (Nelson *et al.*, 2013).

Unidades monosacáridas comunes de los glicoconjugados de animales (Figura C):

- **Ácido siálico:** familia de azúcares de nueve carbonos acídicos (Sia), en el cual el más común es el ácido N-acetil neuroamínico (Neu5Ac, NeuNAc, NeuAc o NANA).
- **Hexosas:** seis carbonos de azúcares neutros, incluyendo glucosa (Glc), galactosa (Gal), manosa (Man).
- **Hexosaminas:** Hexosa con grupo amino en la posición 2, que puede encontrarse libre o más comúnmente como N-acetilado: N-acetilglucosamina (GalNAc) y N-acetilgalactosamina (GalNAc).
- **Desoxihexosas:** azúcar neutral con seis carbonos sin el grupo hidroxilo en la posición 6, fucosa (fuc).
- **Pentosas:** azúcar con cinco carbonos, xilosa (Xyl)
- **Ácidos Urónicos:** Hexosa con un carboxilato cargado negativamente en la posición 6, ácido glucurónico (GlcA) y ácido idurónico (IdA).

-

Este limitado conjunto de monosacáridos parece dominar en la glicobiología de animales vertebrados, pero otros monosacáridos diferentes se pueden encontrar en animales no vertebrados tales como (tivelosa), en bacterias (ácido ceto-desoxioctulosónico, rhamnosa, heptosa y ácido muriámico), o en plantas (apiosa y ácido galacturónico) (Varki y Chrispeels, 1999).



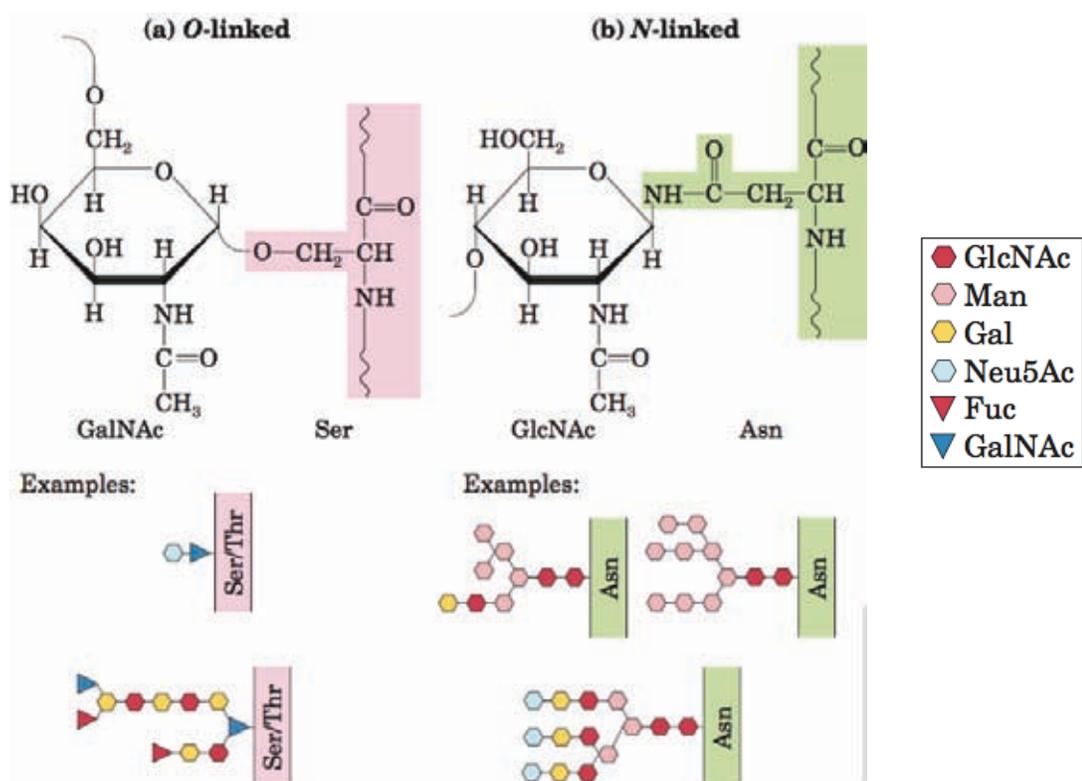
**Figura C.- Monosacáridos más comunes encontrados en los vertebrados.** Se muestra la fórmula conformacional en forma de silla de los anillos monosacáridos D-glucosa, N-Acetil-D-glucosamina, D-Galactosa, N-Acetil-D-galactosamina, D-Manosa, D-Xilosa, ácido-D-glucurónico, L-Fucosa y ácido N-Acetilneuramínico (Varki y Chrispeels, 1999).

#### 2.2.4 Glicosilación y glicoproteínas

La glicosilación es una modificación postraduccional de las proteínas. La adición covalente de azúcares a proteínas es uno de las principales funciones biosintéticas del retículo endoplásmico (RE) (Alberts *et al.*, 2008). Esto se hace por cuatro procesos de glicosilación enzimática: *N-glicosilación*, *O-glicosilación* (Figura D), *C-glicosilación* (*C-manosilación*), y glicosilfosfatidilinositol (GPI). La secuencia de glicosilación, sitios aceptores de cada tipo de glicosilación y organismos en el cual se presenta el tipo de glicosilación se resumen en el Cuadro A (Mazola *et al.*, 2011).

Algunas glicoproteínas tienen una sola cadena de oligosacáridos y otras tienen más de una; el carbohidrato puede constituir desde 1% hasta el 70% o más de la masa molecular de la glicoproteína. Las agrupaciones de carbohidratos muy hidrofílicos modifican la polaridad y la solubilidad de las proteínas con las que se conjugan, también las cadenas de oligosacáridos recién sintetizadas en el RE y modificadas en el complejo de Golgi, pueden influir en la frecuencia del plegamiento polipeptídico que determina la estructura terciaria de la proteína; las interacciones estéricas entre los péptidos y los oligosacáridos pueden imposibilitar una ruta de plegamiento y favorecer otra (Nelson *et al.*, 2013).

Muchos parámetros de glicosilación incluyen el número de carbohidratos unidos, la posición de los sitios de glicosilación y las características del carbohidrato, tales como peso molecular, secuencia y carga. Los carbohidratos pueden incrementar la estabilidad y solubilidad de la proteína, así como reducir inmunogenicidad y susceptibilidad a proteólisis (Mazola *et al.*, 2011).



**Figura D. Representación esquemática de la glicosilación tipo O y N.** A) En la *O-glicosilación* la cadena de carbohidratos se une en el grupo hidroxilo en la secuencia Ser/Thr (rosa) y contiene anclado al núcleo a la GalNAc. B) En la *N-glicosilación* la cadena de carbohidratos se une al grupo amino en la secuencia Asn-Ser/Thr (verde) y contiene comúnmente unido al núcleo la GlcNAc (Nelson *et al.*, 2013).

La importancia de la estructura de los oligosacáridos en el reconocimiento biológico ha sido una fuerza impulsora para desarrollar métodos de análisis de la estructura y estereoquímica de los oligosacáridos (Mazola *et al.*, 2011). Para tales análisis, los oligosacáridos se separan generalmente de su proteína mediante enzimas o glicosidasas que rompen específicamente enlaces tipo O ó tipo N de las cadenas de azúcar, ya sea en el extremo terminal exterior (exoglicosidasas) o interior (endoglicosidasas). Algunas otras unidades pueden ser removidas o volverse a unir sin degradación de la cadena subyacente. La degradación completa de muchos glicanos es generalmente llevada a cabo por una serie de glicosidasas (Varki y Chrispeels, 1999).

Características generales de los diferentes tipos de glicosilación			
Tipo de glicosilación	Motivos de secuencia de glicosilación	Sitio aceptor de glicosilación	Organismo
N-glicosilación	En eucariontes, los glicanos se unen en el residuo de Asn, en la secuencia Asn-x-Ser y Asn-x-Thr; raramente en Asn-x-Cys donde x no es un residuo de prolina. En procariontes la secuencia se extiende en Asp/Glu-z-Asn-x-Ser y Asp/Glu-z-Asn-x-Thr, donde x y z no son residuos de prolina.	Átomos de nitrógeno del grupo amida en el residuo de aspargina	Eucariontes y procariontes
O-glicosilación	Azúcares se unen a residuos de serina y treonina usualmente encontrados en conformación beta y cerca de la región de residuos de prolina.	Átomos de oxígeno del grupo hidroxil en residuos de serina y treonina.	Eucariontes y procariontes
C-glicosilación	Los carbohidratos se unen en el primer residuo de triptófano de los siguientes motivos: Trp-x-x-Trp, Trp-x-x-Phe, Trp-x-x-Cys.	Átomo de carbono (C2) del grupo indol en el residuo del triptófano.	Eucariontes excepto levadura
Ancla GPI	Una secuencia señal específica es reconocida y rota, creando una nueva proteína C-terminal (sitio w). La molécula GPI se adhiere al sitio w. Los residuos en el sitio w incluyen: cisteína, ácido aspártico, glicina, aspargina y serina.	Átomo de carbono del grupo C-terminal carbonilo en el sitio w.	Eucariontes y un subconjunto reducido de arqueas

**Cuadro A. Características generales de los diferentes tipos de glicosilación.** Se resume el tipo de glicosilación, sitios aceptores de glicosilación y los organismos en el cual generalmente se presenta (Mazola *et al.*, 2011).

### 2.2.5 Glicanos antigénicos en infecciones parasitarias

Las infecciones por parásitos protistas y helmintos son de los principales problemas de salud a nivel mundial. Se estima que más de 15 millones de muertes relacionadas con enfermedades infecciosas o parasitarias ocurren cada año, lo que representa alrededor del 25% de muertes a nivel mundial, sobre todo en los países en vías de desarrollo. A pesar de este problema, no existen vacunas eficaces para contrarrestar o evitar las principales enfermedades parasitarias en humanos, por lo tanto, es importante enfocarse en esta área de investigación para comprender mejor la glicobiología de parásitos y su bioquímica en la interacción con sus hospederos (Nyame *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que existe una respuesta inmune hacia los parásitos que infectan a animales y humanos, directamente determinada por glicanos en su superficie celular y glicoconjugados secretados (Nyame *et al.*, 2004). Las células presentadoras de antígenos (APCs) tales como células dendríticas y macrófagos reconocen específicamente muchos glicanos derivados de parásitos, en parte a través de los receptores tipo *Toll* y lectinas tipo *C*. Otra evidencia del papel de los glicoconjugados es en la respuesta inmune humoral, por ejemplo, en la infección de esquistosoma en humanos y animales se induce una respuesta humoral de diferentes clases de anticuerpos (IgM, IgG e IgA) y los títulos de anticuerpos hacia los antígenos glicanos comparado con los proteicos son mayores además de que los glicoconjugados que

despiertan una respuesta inmune humoral eficiente, están en la superficie del parásito (Nyame *et al.*, 2004). Estos glicoconjugados son importantes en la interacción hospedero-parásito, ya que los parásitos los pueden utilizar para cumplir su ciclo de vida, promover su patogenicidad. Tal es el caso de los tripanosomas africanos que viven libremente en el torrente sanguíneo de los animales infectados y producen una gran cantidad de proteínas de anclaje a GPI, siendo estas glicoproteínas variantes de superficie (VSG) las cuales son altamente inmunogénicas, sin embargo, el parásito las cambia periódicamente para evadir el sistema inmunológico del hospedero y mantener una infección crónica (Nyame *et al.*, 2004).

Muchos de los esfuerzos para generar nuevas vacunas se enfocan en el descubrimiento de nuevos péptidos, proteínas o DNA antigénicos, pero han tenido un éxito muy limitado principalmente en parásitos (Nyame *et al.*, 2004). La inefectividad de estas estrategias probablemente se debe al poco entendimiento de la interacción del parásito con el hospedero, al igual que el de los glicanos relevantes y antígenos proteicos, cambios en los niveles de expresión de los antígenos durante el desarrollo del parásito en la infección, la complejidad de la presentación y disponibilidad de los antígenos específicos del parásito para la interacción con la respuesta inmune generada a través de estos. Por lo señalado, es necesario identificar y definir mejor las estructuras e inmunogenicidad de las moléculas sintetizadas por parásitos y su interacción con el sistema inmune. Esta respuesta puede conducir o atenuar infecciones parasitarias, convirtiendo a los antígenos glicanos de los parásitos un blanco para desarrollar vacunas conjugadas basadas en su composición y estructura (Nyame *et al.*, 2004).

Los glicoconjugados son material para la preparación asequible de vacunas, por varias razones:

- i) Para muchos parásitos, y ciertamente para muchos helmintos, los principales glicanos antigénicos se presentan en muchas especies de glicoproteínas, mejorando así la detección y multiplicidad de los antígenos dirigidos por anticuerpos.
- ii) Los glicoconjugados se presentan en el exterior de la superficie de los parásitos, siendo blancos preferidos por su habilidad de interacciones directas con los efectores del hospedero.
- iii) El promedio de densidad de los antígenos glicanos es probable que sea mucho mayor que la densidad de los antígenos proteicos específicos, ya que una sola glicoproteína puede contener múltiples epítomos glicanos.

- iv) Anticuerpos contra antígenos glicanos en animales experimentales infectados pueden fijar el complemento y causar una lisis parasitaria.
- v) Ahora es posible sintetizar glicanos complejos por combinaciones químicas y métodos enzimáticos, y adaptarlos para la conjugación específica a la proteína portadora.

### **2.2.6 Glicoproteínas como inmunomoduladores en helmintos**

Los parásitos helmintos generan glicoproteínas *N* y *O* glicosiladas con estructuras similares a las que se encuentran en las glicoproteínas de mamíferos. Sin embargo, los helmintos introducen modificaciones que son únicas a los parásitos y que interactúan con el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo en el hospedero intermediario y en el hospedero definitivo. Estos glicoconjugados representan un reservorio de componentes inmunomoduladores no explotados, que tienen el potencial de tratar los desórdenes autoinmunes e inflamatorios, tales como las moléculas antiinflamatorias producidas por parásitos (Nyame *et al.*, 2004; Prasanphanich *et al.*, 2013).

Los glicanos de helmintos comúnmente terminan con uniones  $\beta$ -GalNAc, a menudo con secuencia GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc, el cual no se presenta comúnmente en glicanos de vertebrados. Muchos helmintos usan azúcares tales como tivelosa, encontrada en *N*-glicanos de *Trichinella spiralis*, pueden generar modificaciones de azúcares tales como la fosforilcolina (PC) una modificación de glicanos de *Equinococcus granulosus* y la 2-O-metilación de fucosa y 4-O-metilación de galactosa en glicanos antigénicos de *Toxocara* (Prasanphanich *et al.*, 2013). Se ha demostrado que la inmunidad de los ratones con *Taenia crassiceps*, puede inducir citocinas tipo Th2 dependientes de glicanos, además de que se pueden encontrar en el hospedero anticuerpos anti-glicanos por infecciones debidas a helmintos (Gómez-García *et al.*, 2005). Los glicanos de los helmintos están involucrados en el establecimiento de diferentes nichos, ya que dichos organismos usan mecanismos especiales para invadir y establecerse en los órganos y tejidos del hospedero, para su supervivencia a largo plazo cuando aún no infectan o para permitir el paso de los huevos fuera del hospedero hacia el medio ambiente (Prasanphanich *et al.*, 2013).

### **2.2.7 Glicoproteínas en cisticerco, oncósfera y céstodo de *T. solium***

Dentro de la neurocisticercosis porcina se ha detectado *in vivo* la TSG de 12 KDa, la cual es una glicoproteína altamente antigénica que está aparentemente asociada con otras cuatro (16, 18, 24 y 28 KDa), útil para el diagnóstico serológico del metacéstodo de *T. solium*, así mismo se ha explorado la detección de otros glicoconjugados en el cisticerco y en el tejido del cerdo adyacente a éste para

entender su papel potencial en la patogénesis (Obregón-Henao *et al.*, 2003). Los glicoconjugados de carbohidratos ricos en unión tipo *N*, son detectados en el fluido vesicular y tegumento de la membrana vesicular y escólex, donde el parásito está en contacto directo con el tejido del hospedero durante la cisticercosis (Obregón-Henao *et al.*, 2003). Cuando la respuesta inflamatoria progresa, las glicoproteínas antigénicas son detectadas también en el citoplasma de las células inflamatorias en el granuloma que lo rodea. Por otro lado, el canal del tegumento espiral, el cual es expuesto a las enzimas intestinales en teniasis, tiene mucinas ricas en *N*-acetil-galactosamina. Esta composición diferencial en las estructuras del metacéstodo de *T. solium* pueden ser importantes para la supervivencia del parásito en los diferentes sitios del hospedero, ya que le podrían ayudar a proteger al parásito de ciertas enzimas (Obregón-Henao *et al.*, 2003).

En la detección de la composición de carbohidratos en la oncósfera de *T. solium*, se revela que los residuos de  $\alpha$ -D-manosa,  $\alpha$ -D-glucosa,  $\alpha$ -D-galactosa y la *N*-acetil-D-galactosamina son los constituyentes más abundantes de cadenas de carbohidratos en la superficie de la oncósfera. En cambio en las estructuras internas se puede encontrar abundantemente  $\alpha$ -GalNAc,  $\alpha$ -D-Gal y en menor proporción GlcNAc, sirviendo esta información para poder diferenciar la composición de carbohidratos de un estadio a otro en el ciclo de vida de *T. solium* (Arana *et al.*, 2013).

También en un análisis de la caracterización estructural de glicanos de unión *-N* del metacéstodo de *T. solium*, se llegó a la conclusión que el alto nivel de la unión-3,6- $\alpha$  Man y unión 4-GlcNAc son constituyentes esenciales del núcleo de la mayoría de los *N*-glicanos (Haslam *et al.*, 2003). Los altos niveles de las terminales de manosa concuerdan con alta abundancia de manosa y estructuras truncadas. La fucosa y GlcNAc fueron otros principales azúcares terminales con Gal y GalNAc, estando presentes como constituyentes terminales de menor importancia. La presencia de altos niveles de unión-2 Man con bajos niveles de unión-2,6 Man fue consistente con la mayoría de los glicanos complejos que son biantenarios con menor cantidad de glicanos triantenarios; el residuo de la unión 4,6-GlcNAc era consistente con la presencia de núcleos fucosilados (Fuc) (Haslam *et al.*, 2003).

### 2.3 Lectinas

Las lectinas son proteínas de unión a carbohidratos, se describieron por primera vez hace más de 100 años en plantas y ahora se sabe que están presentes en casi todos los organismos. Las lectinas son clasificadas de acuerdo con las secuencia de carbohidratos a la cual se une mejor. La primera clasificación se basa en algunos motivos de aminoácidos altamente conservados en el dominio de

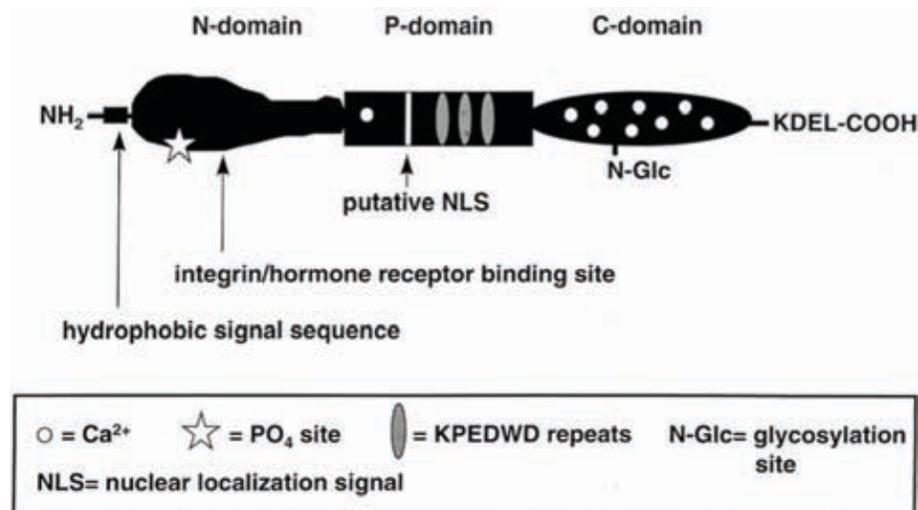
reconocimiento del carbohidrato en dos grupos de lectinas: el primer grupo requiere calcio para el reconocimiento y son llamados lectinas de tipo C, el otro grupo requiere “tioles” libres para su estabilidad y se llaman lectinas de tipo S. Mientras tanto, las lectinas que reconocen Man-6-P si se les hace secuenciación, se encuentra una homología distinta de todas las demás lectinas, lo que justifica su designación como lectinas de tipo P. Otro grupo de lectinas que son miembros de la familia de las inmunoglobulinas que reconocen carbohidratos son las lectinas de tipo I, estas moléculas pueden reconocer grupos específicos de ácido siálico (Varki y Chrispeels, 1999).

Anticuerpos anti-glicanos y lectinas son comúnmente usados en el análisis de carbohidratos debido a su especificidad que les permite discriminar entre una variedad de estructuras de glicanos y a su multivalencia que le proporciona una alta afinidad de unión, incluyendo a los carbohidratos de las superficies celulares. Muchas de las lectinas usadas como herramienta en glicobiología provienen directamente de plantas y están comercialmente disponibles. Las lectinas son agrupadas dependiendo su especificidad a los monosacáridos por los cuales muestran una alta afinidad y preferencia entre anómeros  $\alpha$ - o  $\beta$ - en el azúcar (Varki y Chrispeels, 1999). Las lectinas pueden usarse en un “western-blot” (“lectin-blot”) para caracterizar la glicosilación de un lípido o carbohidrato, en el cual lectinas biotinizadas se aplican a un material transferido a nitrocelulosa después de una electroforesis o cromatografía. Las lectinas unidas a la muestra son visualizadas por la unión de estreptavidina fosfatasa alcalina y conversión de substratos luminiscentes (Varki y Chrispeels, 1999).

## 2.4 Calreticulina

La calreticulina (CRT) es una proteína multifuncional, ubicua, se encuentra en una alta gama de especies y en todos los tipos celulares nucleados, excepto en levaduras. Une calcio intracelular con alta afinidad y es muy conservada, con alrededor de 90% de identidad de aminoácidos en las formas existentes entre humanos, conejos, ratas y ratones (Coppolino y Dedhar, 1998). La estructura primaria de la CRT en humanos está bien caracterizada (Figura E). El primer tercio de la proteína se conoce como dominio *N*, es una estructura globular con una lámina plegada  $\beta$  de ocho hebras antiparalelas y un motivo estructural de hélice-giro-hélice en su extremo *N*-terminal. El segundo tercio es el dominio *P* que se compone de un segmento cargado seguido por prolina, serina y rico en treonina. Este dominio es de alta afinidad y baja capacidad de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  (1 mol  $\text{Ca}^{2+}$ /mol de proteína,  $K_d = \sim 1 \mu\text{M}$ ). El tercer dominio es su *C* terminal, tiene una alta carga negativa donde 37 de sus 57 residuos finales son de ácido aspártico o ácido glutámico. Este dominio de la CRT es de baja afinidad y alta capacidad de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  (25 mol

$\text{Ca}^{2+}$ /mol de proteína,  $K_d = \sim 250 \mu\text{M}$ ). Contiene un sitio potencial de unión de glicosilación tipo *N* (Asn-327) (Coppolino y Dedhar, 1998). Cuando la CRT es madura contiene 400 residuos de aminoácidos, un peso molecular calculado de 46.6 kDa y un punto isoeléctrico de 4.7. Sin embargo, en la migración electroforética en un gel aparece con un peso molecular aproximado de 60 kDa. Esta anomalía de migración puede ser explicada por tener un alto contenido de residuos de aminoácidos ácidos que interfieren con la unión a SDS (Michalak *et al.*, 1999).



**Figura E.- Estructura general de la calreticulina humana.** Los tres dominios de la calreticulina destacan: el dominio *N* con una lámina  $\beta$  plegada globular que contiene extremo amino terminal; el dominio *P* rico en prolinas y el dominio *C* cargado negativamente que contiene el extremo carboxilo terminal (Coppolino y Dedhar, 1998).

La CRT fue inicialmente descrita en el lumen del RE y su principal función es la regulación de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, con influencia sobre diversos procesos celulares (Michalak *et al.*, 1999). Sin embargo, también se ha identificado en la superficie de varias células, así como en productos de excreción/secreción (E/S) de algunos nemátodos y tremátodos (Suchitra y Joshi, 2005). La CRT interacciona con el sistema inmunológico del hospedero, pues los pacientes con tripanosomosis, esquistosomosis y oncocercosis tienen anticuerpos anti-CRT (Marcelain *et al.*, 2000) y se sobreexpresa en parasitosis crónicas intestinales en el ratón. Adicionalmente, en *Heligmosomoides polygyrus*, además de ser secretada, induce la producción de IL-4 e IL-10 que representan citocinas tipo Th2 e inmunomoduladoras, respectivamente (Rzepecka *et al.*, 2009).



Se ha reportado que la inmunización oral con la CRT recombinante de *T. solium* (rTsCRT) induce la reducción de aproximadamente el 37% de la carga parasitaria de gusanos adultos en el modelo experimental de teniasis intestinal en hámster. Además de que las tenias recuperadas de los animales vacunados presentaron una disminución en su longitud (Leon-Cabrera *et al.*, 2012).

Se ha realizado un análisis de la expresión diferencial de la TsCRT en estadios de desarrollo de *T. solium* usando anticuerpos específicos para localizar esta proteína (Mendlovic *et al.*, 2006). La TsCRT se localiza preferencialmente en el tegumento y músculos de los citones de las ventosas y el rostelo. En proglótidos maduros obtenidos de humanos infectados, se pudo observar en las espermatogonias, ovogonias, epitelio uterino y en células de conductos deferentes. En el útero grávido, la mórula y estadios tempranos de embriones fueron altamente positivos a la TsCRT. La expresión disminuyó a medida de que avanzaba el desarrollo embrionario y estuvo ausente en oncosferas plenamente desarrolladas que estaban rodeadas por un embrióforo. Durante la espermatogénesis se observó una regulación baja de la proteína y aunque los primeros espermatoцитos mostraron una alta expresión de la TsCRT, los espermatozoides maduros presentes en el conducto deferente fueron negativos para la proteína. Estos datos indican que la expresión de la TsCRT se expresa temporal y espacialmente durante el desarrollo de *T. solium* especialmente en células germinales y durante la embriogénesis (Mendlovic *et al.*, 2006).

Al hacer los análisis de la TsCRT con “western-blot” en extractos del adulto, cisticercos, cisticercos evaginados y productos de excreción-secreción (E-S) de la tenia, se observó una banda de mayor peso molecular en la tenia adulta y los productos E-S. Esta observación originó la hipótesis de que la TsCRT podía estar glicosilada al tener dos sitios potenciales de glicosilación en su secuencia. El análisis de los carbohidratos presentes en la TsCRT podrían ser de gran importancia para comprender mejor su comportamiento dentro de la tenia, además de que la presencia de los carbohidratos en ella podría tener importancia y relevancia para el área de la inmunomodulación y en la relación hospedero-parásito.

### **3 JUSTIFICACIÓN**

Ya que los glicoconjugados juegan un papel importante en la biología y bioquímica en los organismos, y que dentro de los parásitos algunas glicoproteínas son antigénicas e inmunomoduladoras, puede ser que la TsCRT de *T. solium* al ser una proteína multifuncional localizada específicamente en ciertos tejidos dependiendo la fase del parásito, tenga modificaciones postraduccionales y esté glicosilada, dando origen a isoformas en los diferentes estadios del desarrollo de *T. solium*, ayudándole a mantener una homeostasis adecuada para su supervivencia dentro de sus hospederos.

### **4 HIPÓTESIS**

Debido a que la secuencia de la TsCRT presenta dos sitios potenciales de glicosilación, las isoformas en los diferentes estadios de *T. solium* podrían deberse a adición de glicanos durante el proceso de diferenciación de cisticerco a tenia.

### **5 OBJETIVOS**

#### **5.1 Objetivo general**

Comprobar si la TsCRT se encuentra glicosilada en los diferentes estadios de *T. solium* y qué tipo de glicosilación presenta.

#### **5.2 Objetivos particulares**

1. Purificar la rTsCRT producida en bacterias BL21 transformadas con el plásmido pET23a-CRT.
2. Producir anticuerpos específicos contra la TsCRT e identificar su especificidad por “western-blot”.
3. Extraer las proteínas totales del metacéstodo y parásito adulto de *T. solium*, así como productos de excreción-secreción de la tenia.
4. Analizar la presencia de carbohidratos y tipo de glicosilación de la TsCRT mediante tratamiento con glicosidasas.
5. Identificar el tipo de carbohidratos presentes en la TsCRT con uso de lectinas.

## 6 DISEÑO EXPERIMENTAL

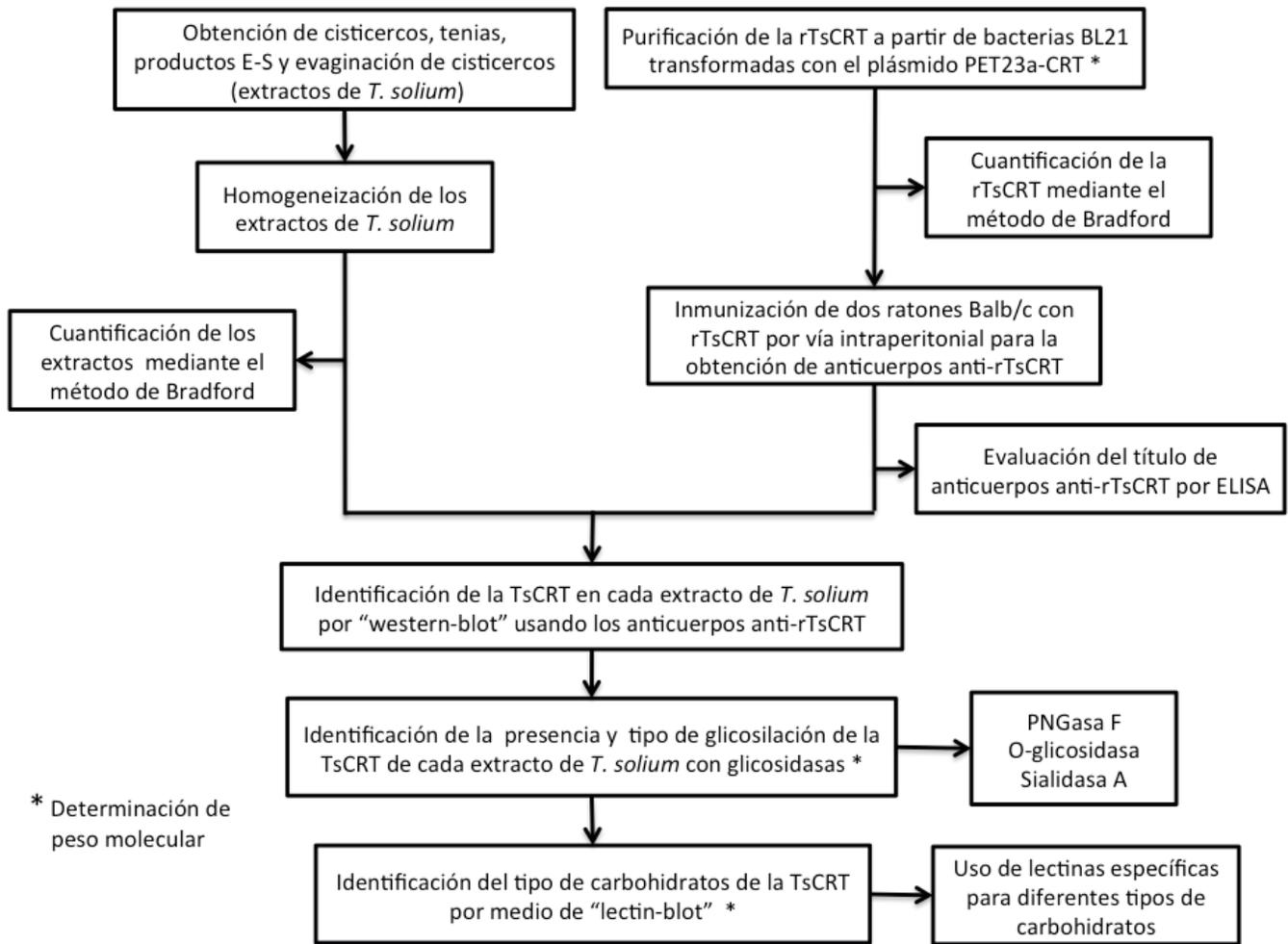


Figura G.- Diseño experimental para el análisis de la presencia de carbohidratos en la TsCRT.

## 7 MÉTODOS

### 7.1 Extractos crudos de los diferentes estadios de *T. solium*

#### 7.1.1 Parásitos

Se recolectaron cisticercos de *T. solium* del músculo esquelético de cerdos infectados naturalmente, se lavaron 5 veces con PBS (buffer de fosfatos 0.01 M, 0.15% cloruro de sodio) y se almacenaron congelados a -70 °C hasta su uso.

Para la obtención de parásitos adultos de *T. solium*, se infectaron hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*) inmunosuprimidos (acetato de metilprednisolona) de nueve meses de edad con ocho cisticercos de *T. solium* recolectados del músculo esquelético de cerdos infectados naturalmente. Los hámsteres se mantuvieron en condiciones de bioterio *ad libitum*, después de 4 semanas se sacrificaron, se removió el intestino delgado, se colocó en cajas de Petri con PBS y se cortó longitudinalmente con ayuda de un bisturí. Se separaron las tenias adultas adheridas al intestino delgado, se lavaron con PBS para quitar la mayor contaminación posible y se almacenaron congeladas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso (León-Cabrera *et al.*, 2009).

### **7.1.2 Evaginación de cisticercos**

Posterior a la obtención de cisticercos, se les realizó una evaginación *in vitro* incubando 50 parásitos en 25% de bilis de cerdo en RPMI (Gibco), la mezcla se dejó en incubación durante 4 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , posteriormente se contó el número de cisticercos evaginados que presentaban movimientos y se almacenaron congelados a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso (Correa *et al.*, 1987).

### **7.1.3 Obtención de productos de excreción-secreción de la tenia**

Las tenias se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en cajas de Petri con medio RPMI con antibiótico (penicilina  $1 \times 10^6$  U/L y estreptomycinina 2 g/L, SIGMA). El medio se cambió cada 8 horas en el primer día de incubación y cada 20 horas durante los siguientes 3 a 4 días. El medio recuperado se centrifugó a 2500 (rpm) durante 20 minutos y el sobrenadante se dializó contra PBS, se concentró por centrifugación, se le agregaron inhibidores de proteasas (Complete 1X, ROCHE) y se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso (Ochoa-Sánchez *et al.*, 2011).

### **7.1.4 Preparación del antígeno de cisticerco, cisticerco evaginado y tenia**

Los cisticercos se pesaron y se colectaron 5 g en un tubo Falcon de 15 ml, se resuspendieron en 3 ml de buffer de fosfatos (6.7mM con 0.04M KCl y 1mM  $\text{MgCl}_2$ ) con inhibidores de proteasas (Complete 1X, ROCHE). Los cisticercos se homogeneizaron con ayuda de un homogeneizador eléctrico (Fisher Scientific, PowerGen) en ciclos de dos minutos, con 30 segundos de pausa. El homogeneizado se sonicó cuatro veces con intervalos de 1 minuto, sobre hielo, con ayuda de un sonicador (OMNI-ruptor 250) a una potencia de salida de 50W. Posteriormente, las muestras se centrifugaron las muestras para quitar el tejido insoluble a 2000 rpm durante 5 minutos, se recuperó el sobrenadante, se hicieron alícuotas y se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Se realizó el mismo procedimiento para la obtención del antígeno de las tenias y los cisticercos evaginados.

### **7.1.5 Cuantificación de los extractos proteicos**

En todos los casos se cuantificaron las proteínas totales del antígeno por el método de Bradford. Se realizó el ensayo en microplaca haciendo diluciones de 1:5, 1:10 y 1:20 de cada muestra por triplicado. La curva estándar se realizó con albúmina sérica bovina (BSA) en diferentes concentraciones (100, 200, 300, 400 y 500 µg/ml) y se realizó la lectura a 595 nm en un lector de ELISA.

## **7.2 Obtención de la rTsCRT**

### **7.2.1 Centrifugación diferencial para la separación de la rTsCRT**

Se agregaron 6 ml de buffer A (sacarosa 20% + Tris 20 mM) a un botón de bacterias BL21 transformadas con el plásmido pET23a-CRT y se resuspendió hasta tener una muestra homogénea, se dejó reposar por 10 minutos en hielo y se centrifugó a 8500 rpm durante 15 minutos. Se guardó el primer sobrenadante (S1). El botón restante se volvió a resuspender en 6 ml de agua bi-distilada (ddH<sub>2</sub>O), se dejó reposar en hielo por 10 minutos y se centrifugó a 8500 rpm durante 15 minutos. Se guardó el segundo sobrenadante (S2). El nuevo botón se resuspendió en 2 ml de buffer P (PBS + inhibidores de proteasas Complete 1x) y se sonicó a 50 W cuatro veces por 30 segundos en hielo, se agregó 1.2 µl de DNAsa (10mg/ml) y 1.2 µl de RNAsa (10mg/ml) y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. La muestra se centrifugó de nuevo a 10500 rpm durante 30 minutos. Se separó el sobrenadante (S3) y se guardó el botón restante de bacterias en congelación. La evaluación de la separación de la rTsCRT se evaluó por electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida al 12 %.

### **7.2.2 Tinción negativa “zinc-imidazol”**

Se realizó la electroforesis del S3 en un gel preparativo de poliacrilamida al 12% de 1.5 milímetros de grosor. El gel se lavó con ddH<sub>2</sub>O en agitación durante 5 minutos. Se incubó en la solución A (imidazol 0.2 M + SDS 0.1%) durante 15 minutos, se lavó con ddH<sub>2</sub>O 3 veces durante 5 minutos. El gel se incubó en la solución B (sulfato de zinc 0.2 M) hasta que se comenzaron a ver las bandas de las proteínas y la reacción se detuvo haciendo un lavado abundante con ddH<sub>2</sub>O. El gel se colocó sobre una superficie negra y con ayuda de un bisturí se cortó la banda de interés que pertenecía a la rTsCRT, se colocó en un tubo de 15 ml y se almacenó a 4°C hasta su uso.

### **7.2.3 Electroelución para la purificación de la rTsCRT**

Las bandas de gel que contienen la rTsCRT se pasaron por una jeringa y colocaron en los tubos de una cámara de electroelución (Bio-Rad), se electroeluyeron en presencia de buffer (Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.02%) durante tres horas a 10 miliamperes (mA) por tubo. Se drenó el primer

buffer, se adicionó el segundo buffer (Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM) y se corrió al mismo voltaje durante 1 hora para retirar el SDS. Se obtuvo la rTsCRT electroeluida, se cuantificó y se realizó una electroforesis de poliacrilamida al 12% para confirmar su pureza.

### **7.3 Producción de anticuerpos anti-rTsCRT**

#### **7.3.1 Inmunización de ratones Balb/c con rTsCRT**

Dos ratones Balb/c de 6-8 semanas de edad mantenidos en condiciones de bioterio *ad libitum*, se inmunizaron tres veces con intervalos de 15 días por vía intraperitoneal con 100 µg de rTsCRT con adyuvante completo de Freund (1:1) en la primera inmunización y con adyuvante incompleto de Freund en la segunda y tercera inmunización. Se tomaron muestras de sangre antes de cada inmunización (suero preinmune, 2º y 3º inmunización) así como, una semana después de la tercera inmunización. Al final del protocolo, los ratones se sangraron por punción cardiaca y se colectó el suero. La evaluación del título de anticuerpos anti-rTsCRT se realizó por ELISA.

#### **7.3.2 Titulación de anticuerpos anti-rTsCRT**

Los sueros hiperinmunes de ratón se titularon por ELISA para encontrar la dilución óptima que se usó en los ensayos de “western-blot”. Se forró una placa con rTsCRT (10µg/ml), se bloqueó con leche semidescremada (5%) en PBS-Tween (0.3%) y se incubaron los sueros anti-rTsCRT (dilución 1:500 hasta 1:16 384 000). La placa se incubó con anti-IgG de ratón acoplada a peroxidasa y se reveló con OPD (orto-fenilendiamina) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La lectura se realizó a 595 nm.

### **7.4 Identificación, desglicosilación y análisis de carbohidratos presentes en la TsCRT**

#### **7.4.1 Identificación de la TsCRT con anticuerpos anti-rTsCRT (“western-blot”)**

Se realizó una electroforesis de poliacrilamida al 12% con 30 µg de los antígenos de cisticerco, cisticerco evaginado, tenia y productos de E-S y se electrotransferieron las proteínas a una membrana PVDF usando una cámara de electrotransferencia semihúmeda (Amersham Biosciences, TE 70 ECL Semi-Dry Transfer Unit), a 15 V durante 15 minutos. La membrana se bloqueó con PBS 1X-Tween (0.3%)-Leche (5%) y se incubó durante toda la noche a 4°C. Se adicionó el anticuerpo primario (anti-rTsCRT, 1:128 000) y se dejó incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. Se agregó el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa, 1:2000) y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Por último, se reveló la membrana con una solución de PBS 1X, 3,3-Diaminobencidina y peróxido de hidrógeno. Entre cada incubación se realizaron lavados con PBS 1X-Tween (0.3%) para quitar los residuos de cada reacción.

#### **7.4.2 Tratamiento de desglicosilación general y tipo de glicosilación de la TsCRT**

Las desglicosilaciones enzimáticas se llevaron a cabo con PNGasa F (rompe los enlaces de glicosilación tipo *N*), O-glicosidasa (rompe enlaces de glicosilación tipo *O*) y  $\alpha$ -(2→3,6,8,9)-Neuraminidasa (Silalidasa A), siguiendo el procedimiento del proveedor (Enzymatic Protein Deglycosylation Kit, SIGMA-Aldrich). Se realizaron dos condiciones de desglicosilación: i) condiciones nativas (Nat) (buffer de reacción 5x, glicosidasas e incubación de 5 días a 37°C) y ii) condiciones desnaturalizantes (Des) (buffer de reacción 5x, solución desnaturalizante, glicosidasas, TritonX-100 e incubación de 3 horas a 37°C). La eficiencia de las reacciones se evaluó observando si existen modificaciones en el peso molecular del antígeno de interés (TsCRT) por electroforesis de poliacrilamida y “western-blot”. Como control positivo y negativo de las desglicosilaciones se usó Fetuina, ya que era el estándar requerido dentro del Kit de desglicosilación.

#### **7.4.3 Identificación del tipo de carbohidratos presentes en la TsCRT con lectinas (“lectin-blot”)**

Se realizaron tres electroforesis con geles preparativos de poliacrilamida al 12 %, un gel con 30  $\mu$ g del antígeno de cisticerco, otro con 60  $\mu$ g del antígeno de tenia y el último con 30  $\mu$ g de antígeno de los productos de E-S. Se transfirieron las proteínas de cada antígeno a una membrana PVDF con ayuda de una cámara de transferencia a 15 V durante 15 minutos. Se bloquearon las membranas con PBS 1X-Tween(0.3%)-albúmina(1%). Cada membrana se recortó en tiras de 4 mm de grosor para los ensayos individuales. Los blots se incubaron con las lectinas biotiniladas a las siguientes diluciones: *Arachis hipogaea* (PNA) 1:750, *Lotus tetragonolobus* (LTL) 1:500, *Ulex europaeus* (UEA-I) 1:500, *Glycine max* (SBA) 1:500, *Vicia villosa* (VVA) 1:500, *Artocarpus integrifolia* (AIA) 1:250, *Allomyrina dichotoma* (Allo A) 1:500, *Tricum vulgare* (WGA) 1:4000, *Lycopersicon esculentum* (LEL) 1:500, *Bandeiraea simplicifolia* (BSL) 1:250, *Datura stramonium* (DSA) 1:250, *Limulus polyphemus* (LPA) 1:100, *Canavalia ensiformis* (Con A) 1:500 y *Lens culinaris* (LCA) 1:750, diluidas en la solución bloqueadora durante 1:30 horas a 37°C. Los blots se lavaron 3 veces con PBS 1X-Tween(0.3%)-albúmina(1%) y se incubaron durante una hora a 37°C con estreptavidina-fosfatasa alcalina (1:7500), diluida en la solución bloqueadora. La reacción de revelado se desarrolló con una solución de PBS 1X, 3,3-diaminobencidina y peróxido de hidrógeno.

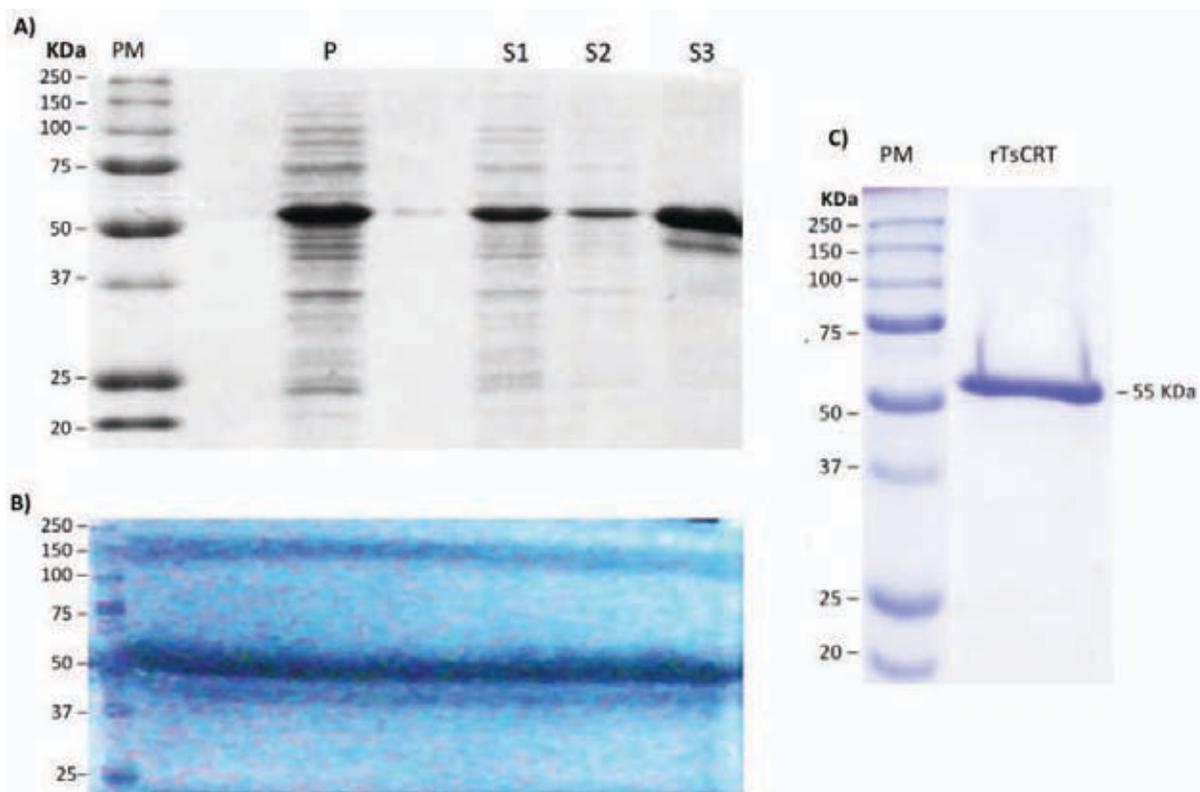
#### **7.5 Determinación del peso molecular de la rTsCRT y TsCRT de *T. solium***

La determinación del peso molecular de la calreticulina recombinante y nativa de *T. solium* se realizó con el software PDQuest versión 7.4.0 en el fotodocumentador ChemiDoc XRS – BioRad.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Purificación y cuantificación de la rTsCRT

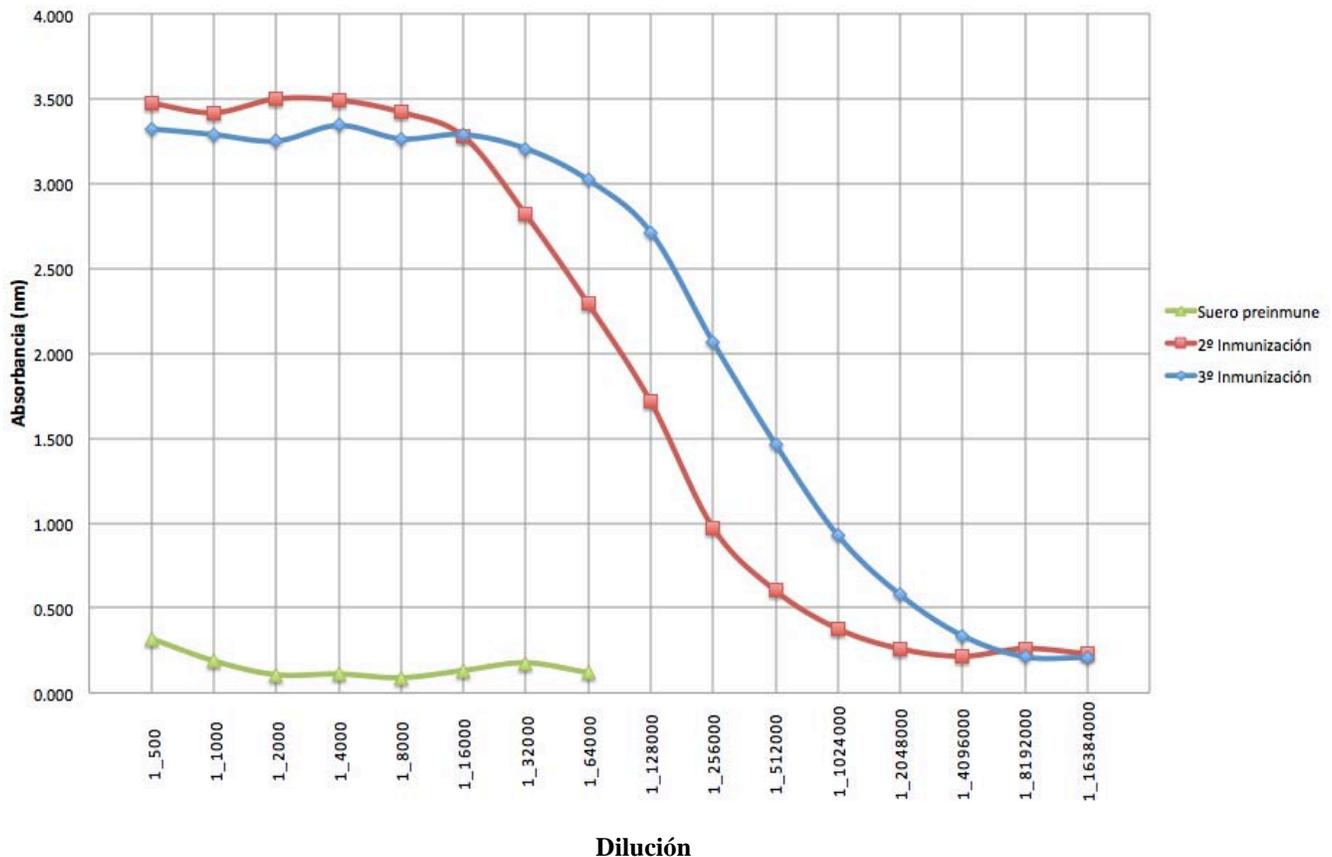
En la centrifugación diferencial se observaron fracciones de proteínas que corresponden a las de bacterias, pero en especial se observó una de mayor concentración con un peso molecular de 55 KDa, la cual corresponde a la rTsCRT, que se sobreexpresó al realizar la transformación y el cultivo de bacterias (Figura 1). En todos los sobrenadantes S1, S2 y S3 se observó la rTsCRT sobreexpresada, que es hasta S3 donde se apreciaron dos bandas definidas en el gel (Figura 1A). Se continuó con la tinción negativa (Figura 1B) y la electroelución de la proteína. Finalmente se realizó una electroforesis de poliacrilamida al 12% a la muestra electroeluida, se demostró que la proteína quedó totalmente purificada y con un peso molecular de 55 KDa (Figura 1C). La concentración final de la rTsCRT purificada fue de 314.8  $\mu\text{g/ml}$ .



**Figura 1.- Purificación y cuantificación de la rTsCRT.** A) Electroforesis de la centrifugación diferencial de las bacterias BL-21 transformadas con el plásmido pET23a-CRT. B) Electroforesis y tinción negativa del sobrenadante 3 (S3). C) Electroforesis de la rTsCRT electroeluida con peso molecular de 55 KDa. La cuantificación se realizó por el método de Bradford. P= pellet. S1= sobrenadante 1. S2= sobrenadante 2. PM= Peso molecular en Kilodaltons.

## 8.2 Título de anticuerpos anti-rTsCRT

En la figura 2 se muestra el resultado de la titulación de anticuerpos anti-rTsCRT por ELISA. El suero preinmune de ratón se mantuvo constante con una densidad óptica baja en todas sus diluciones (0.5). El suero de la segunda inmunización presenta una densidad óptica de 3.5 y se mantuvo constante hasta la dilución 1:8000, a partir de esa dilución empezó a bajar hasta llegar a la dilución 1:102 400 donde se mantuvo a menos de 0.5. Mientras que el suero obtenido de la tercera inmunización, la curva empezó a bajar en la dilución 1:3200 hasta llegar a la dilución 1:4 096 000 donde no subió a más de 0.5. No se tomaron datos de la primera inmunización.

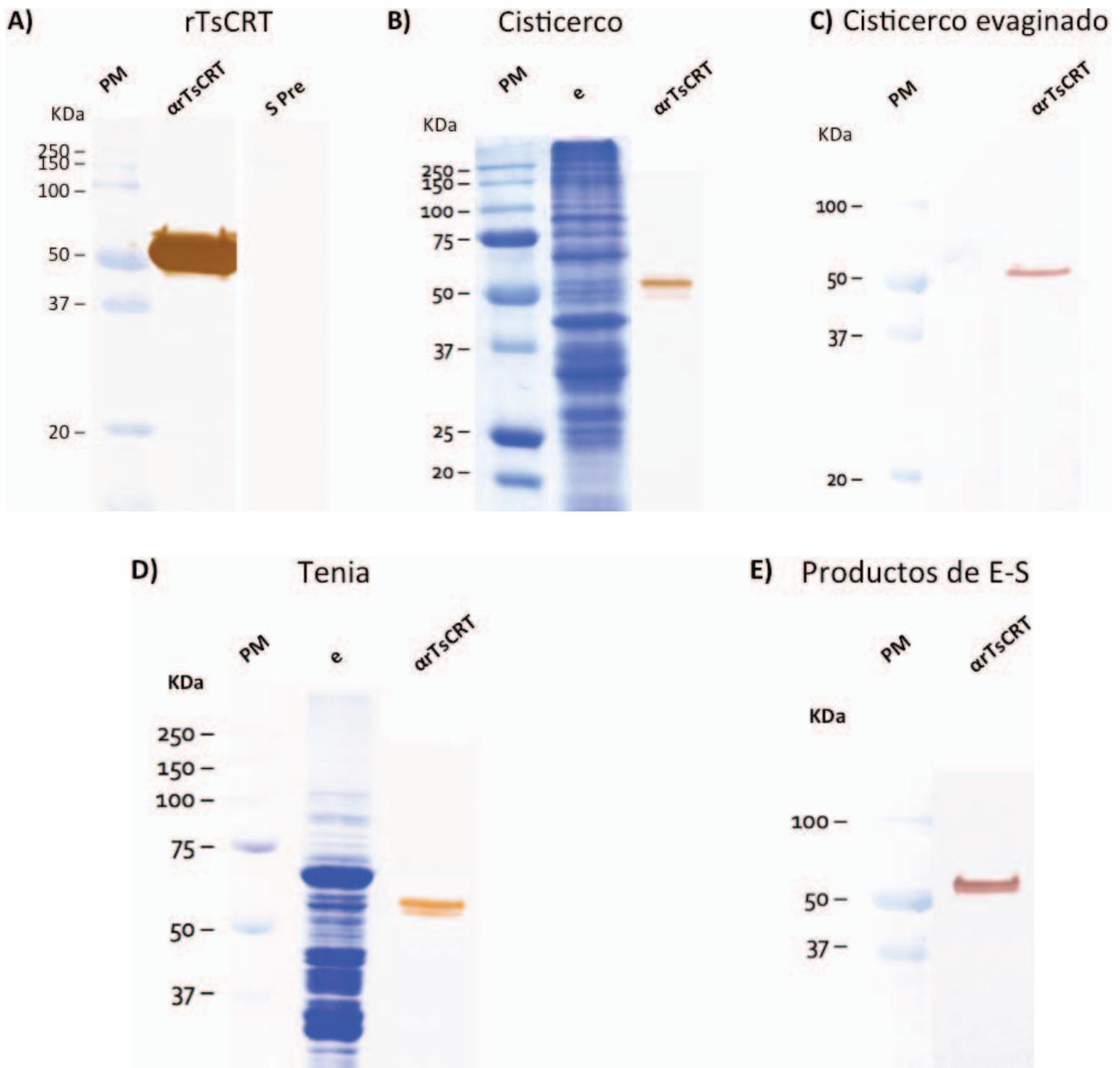


**Figura 2.- Gráfica del título de anticuerpos anti-rTsCRT.** Se muestra la absorbancia contra la dilución y las curvas de titulación de anticuerpos de las diferentes inmunizaciones de los ratones Balb/c con rTsCRT y adyuvante de Freund (1:1) evaluados por ELISA. Título del suero preinmune (verde), título de la segunda inmunización (rojo) y título de la tercera inmunización (azul). Realizado en Microsoft Excel, 2011.

Se decidió trabajar con la dilución 1:128 000 de la tercera inmunización de los ratones para realizar los ensayos de identificación de la TsCRT en todos los antígenos de *T. solium*.

### 8.3 Identificación de la TsCRT por “western-blot” utilizando anticuerpos policlonales específicos

En el control positivo, en donde solamente se usó la rTsCRT con la cual se inmunizaron los ratones, se observó que los anticuerpos anti-rTsCRT fueron altamente específicos para la rTsCRT, la cual se muestra con un peso molecular de 55 KDa (Figura 3A). En este caso se observó una banda gruesa debido a que el carril contenía mucha proteína y la reacción fue muy intensa. Como control negativo se realizó el mismo procedimiento con suero de ratón pre-inmune (SR Pre) y no se identificó la rTsCRT (Figura 3A). En la electroforesis del antígeno de cisticerco, se muestran las proteínas teñidas con azul de Coomassie y la identificación de la TsCRT con anticuerpos anti-rTsCRT (Figura 3B). Se observaron tres bandas, una en el centro con mayor intensidad, una más delgada de menor peso molecular y otra apenas visible de mayor peso molecular que la central; este patrón de bandas no se repitió en los otros antígenos. En la fracción del cisticerco evaginado, se observó una banda de TsCRT bien definida y una delgada, apenas visible, de mayor peso molecular; aquí ya no se encuentra la de menor peso molecular como en la fracción del cisticerco. Las bandas presentes en la fracción del cisticerco evaginado coinciden con las dos de mayor peso molecular en la de cisticerco (Figura 3C). En la fracción de tenia, se detectaron dos bandas de la TsCRT: una delgada de aproximadamente 50 KDa y otra más gruesa de mayor peso molecular (Figura 3D). Esta isoforma de la TsCRT no se observa en las fracciones del cisticerco ni de la de cisticerco evaginado, solamente en la etapa madura de *T. solium*. En los productos de E-S, la TsCRT se comportó de manera similar que en el adulto (Figura 3E).

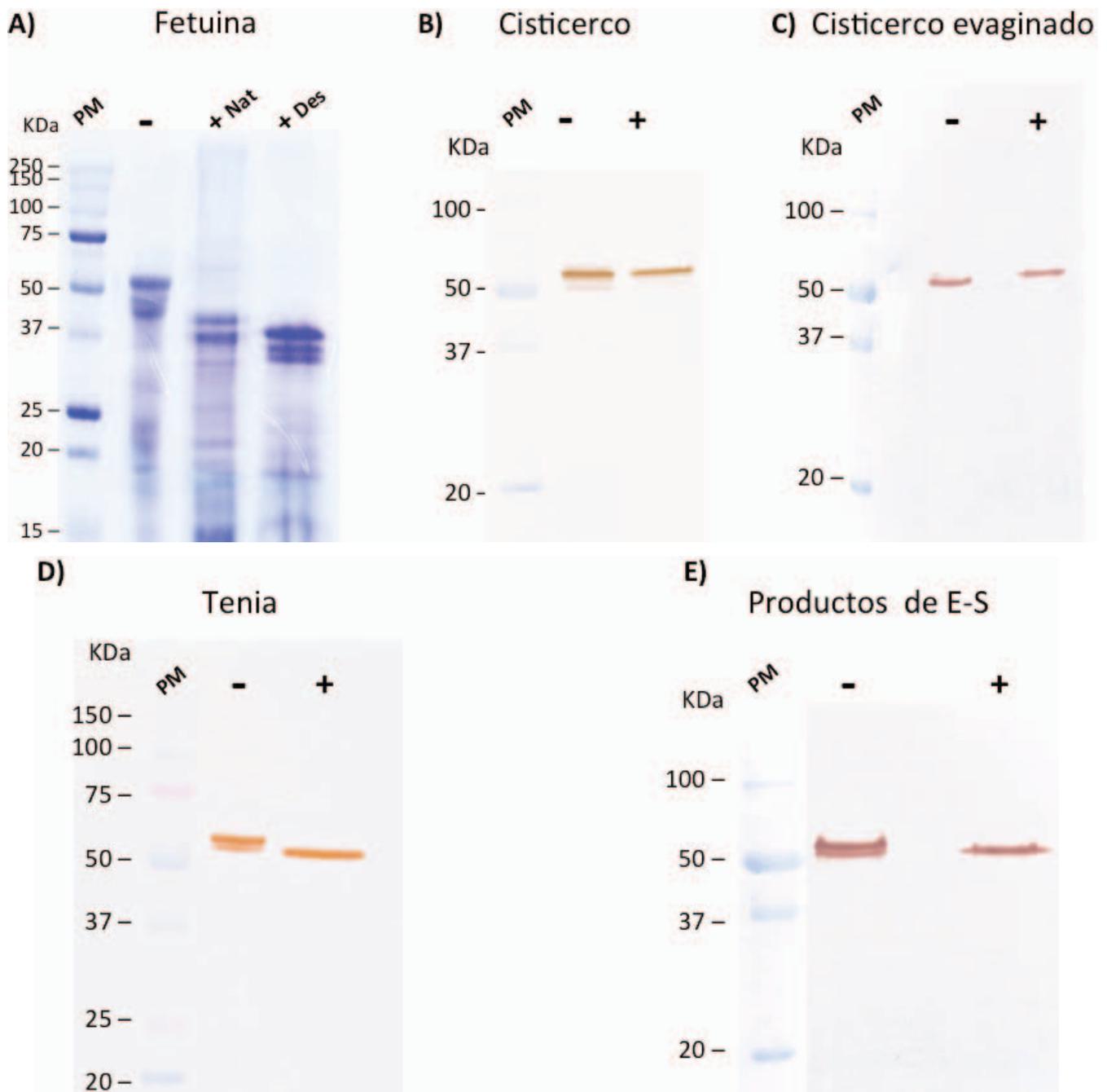


**Figura 3.- Identificación de la TsCRT con anticuerpos anti-rTsCRT.** Se muestra la identificación de la rTsCRT y de *T. solium* nativa (TsCRT) en diferentes fracciones de los estadios del parásito con anticuerpos anti-calreticulina recombinante de *T. solium* (αrTsCRT). **A)** Control positivo, identificación de la rTsCRT con suero de la tercera inmunización y control negativo con suero de ratón pre-inmune (S Pre). Electroforesis (e) de la fracción total e identificación de la TsCRT por “western-blot” (WB) en los extractos de *T. solium*. **B)** cisticercos, **C)** cisticercos evaginados, **D)** tenias, **E)** productos de E-S de la tenia. **PM** = Marcadores de peso molecular en Kilodaltons.

#### **8.4 Análisis de la presencia de carbohidratos en la TsCRT con glicosidasas en condiciones desnaturalizantes y nativas**

Se observó que la Fetuina en el control negativo de desglicosilación (-), las proteínas tuvieron un peso molecular alto comparado con la desglicosilación de la misma proteína como control positivo (+) en condiciones nativas (+Nat) y desnaturalizantes (+Des), demostrando el efecto de desglicosilación de las glicosidasas. En condiciones desnaturalizantes (+Des) se obtuvo un efecto mayor que en las nativas (+Nat), ya que el peso molecular de las proteínas es menor y las bandas se observaron con una mayor definición (Figura 4A).

En el tratamiento de las proteínas del cisticerco se observó que la banda delgada de mayor peso molecular ya no se evidenció, indicando que esta fracción de proteína está glicosilada; no se apreciaron cambios en las otras bandas bajo el mismo tratamiento (Figura 4B). Lo mismo sucedió con la fracción del cisticerco evaginado (Figura 4C). En la fracción de tenia, donde se distinguieron claramente dos bandas, se observó que la banda de mayor intensidad, que corresponde a la de mayor peso molecular tampoco se hizo evidente, indicando que la proteína en esta etapa se encuentra glicosilada en altas proporciones, comparándola con la TsCRT de la fracción de cisticerco (Figura 4D). Los productos de E-S del adulto tuvieron un comportamiento semejante al de la tenia (Figura 4E). Estos resultados se observan de manera general en la Figura 5.



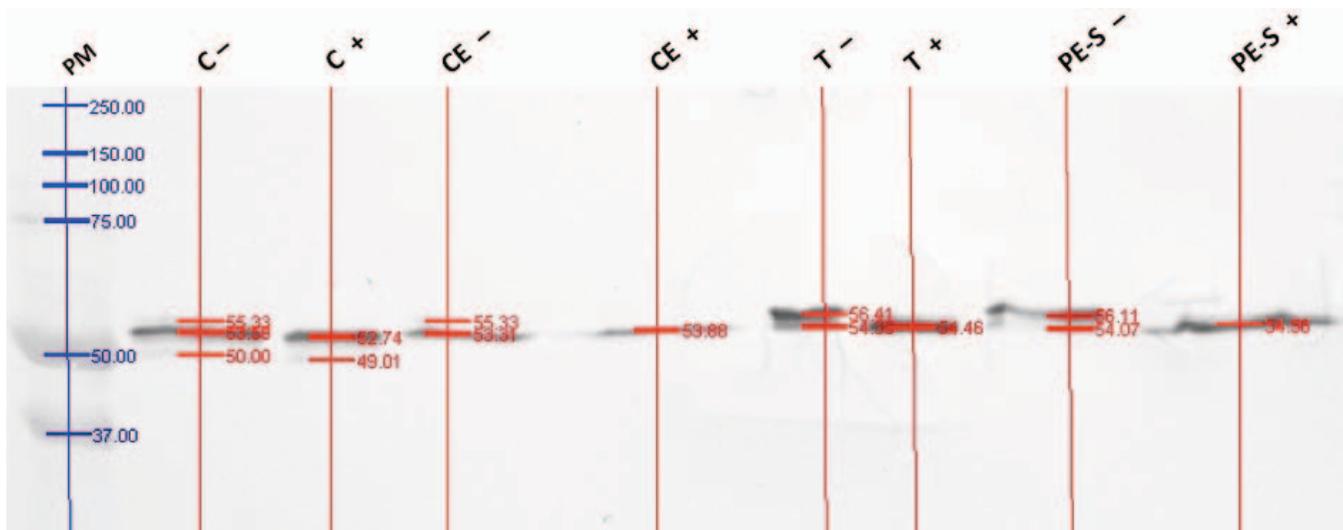
**Figura 4.- Análisis de la presencia de carbohidratos en la TsCRT con glicosidasas.** A) Electroforesis de la Fetuina como control positivo de desglucosilación, no desglucosilado (-), desglucosilado en condiciones nativas (+Nat) y desglucosilación en condiciones desnaturalizantes (+Des). No desglucosilación (-) y desglucosilación (+) en condiciones desnaturalizantes de la TsCRT de las fracciones de: **B)** cisticerco, **C)** cisticerco evaginado, **D)** tenia adulta y **E)** productos de excreción-secreción, identificados por WB. **PM** = Marcadores de peso molecular en Kilodaltons.



**Figura 5.- Desglicosilación de la TsCRT en los diferentes extractos de *T. solium*.** TsCRT de cisticerco no desglicosilado (C-) y desglicosilado (C+); TsCRT de cisticerco evaginado no desglicosilado (CE-) y desglicosilado (CE+), tenia no desglicosilada (T-), tenia desglicosilada (T+), productos de excreción-secreción no desglicosilado (PE-S-) y productos de excreción-secreción desglicosilados (PE-S +). **PM** = Marcadores de peso molecular en Kilodaltons.

### 8.5 Determinación del peso molecular de la TsCRT en los extractos de *T. solium* no desglicosilados y desglicosilados

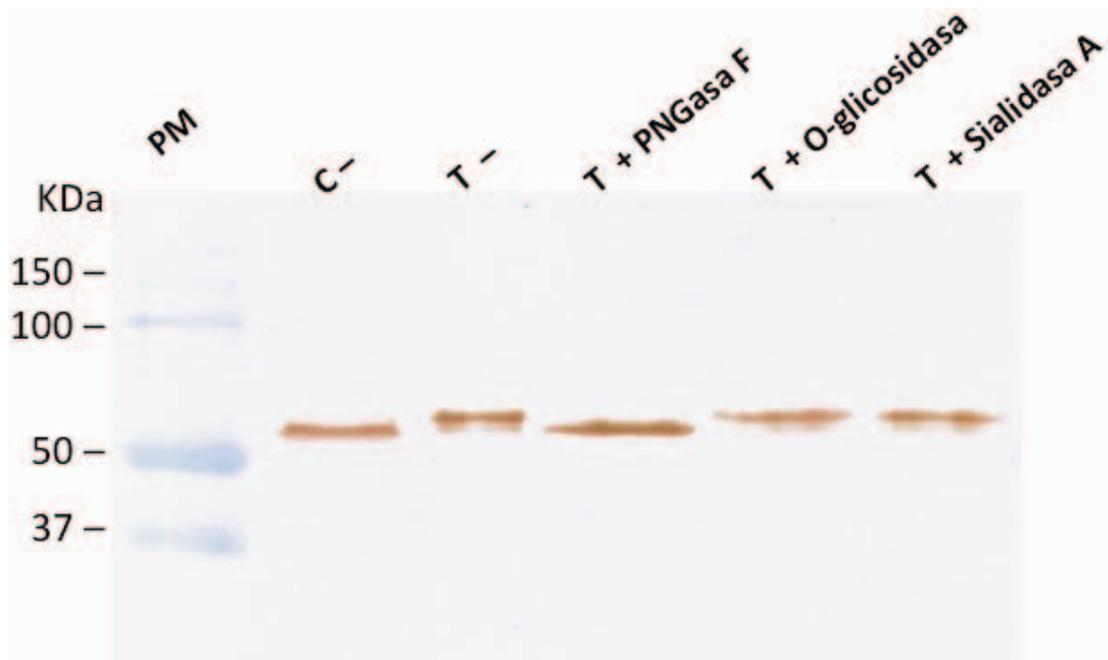
Se tomó la figura 5 para realizar la determinación de los pesos moleculares de los extractos de *T. solium*, ya que se muestra de manera general sus características de glicosilación. En los extractos no desglicosilados, se presentó una fracción con un peso molecular de 55.33 KDa en cisticerco (C-) y cisticerco evaginado (CE-), 56.41 KDa en tenia (T-) y 56.11 KDa en los productos de E-S (PE-S-); esta fracción no aparece en los extractos de *T. solium* desglicosilados (+), ya que desaparece después del tratamiento con las glicosidasas. La siguiente fracción de cada extracto es de 53.59 KDa en cisticerco no desglicosilado (C-), 52.74 KDa en el cisticerco desglicosilado (C+), 53.31 KDa en el cisticerco evaginado no desglicosilado (CE-), 53.88 KDa en el cisticerco evaginado desglicosilado (CE+), 54.35 KDa en la tenia no desglicosilada (T-), 54.46 en la tenia glicosilada (T+), 54.07 KDa en los productos de E-S no desglicosilados (PE-S -) y 54.56 KDa en los productos E-S desglicosilados (PE-S+). De manera particular apareció una tercera fracción de 50 KDa en el extracto de cisticerco no desglicosilado (C-) y de 49.01 KDa en el cisticerco desglicosilado (C+) (Figura 6).



**Figura 6.-** Peso molecular de la TsCRT en los extractos de *T. solium* no desglicosilados y desglicosilados. Se observa el peso molecular de las fracciones de la TsCRT en los extractos de cisticerco no desglicosilado (C-) y desglicosilado (C+), TsCRT de cisticerco evaginado no desglicosilado (CE-) y desglicosilado (CE+), tenia no desglicosilada (T-), tenia desglicosilada (T+), productos de excreción-secreción no desglicosilado (PE-S-) y productos de excreción-secreción desglicosilados (PE-S +). Los pesos moleculares se obtuvieron el software PDQuest versión 7.4.0 en el fotodocumentador ChemiDoc XRS – BioRad. **PM** = Marcadores de peso molecular en Kilodaltons.

### 8.6 Análisis del tipo de glicosilación de la TsCRT mediante el tratamiento con glicosidasas

Como control negativo de presencia de la glicosilación de la TsCRT se incluyó el extracto de cisticerco ya que expresa poco la forma glicosilada de la TsCRT y a la tenia como control positivo sometidos a la desglicosilación con la mezcla de glicosidasas. Se observó que el único cambio fue al desglicosilar la TsCRT de la tenia con PNGasa F, en el cual la banda de mayor peso molecular ya no se hizo evidente, sugiriendo que los carbohidratos presentes en la TsCRT son de una glicosilación tipo *N*. Con la O-glicosidasa y Sialidasa A no se observó ningún cambio en el peso molecular de las bandas del extracto de tenia (Figura 7).



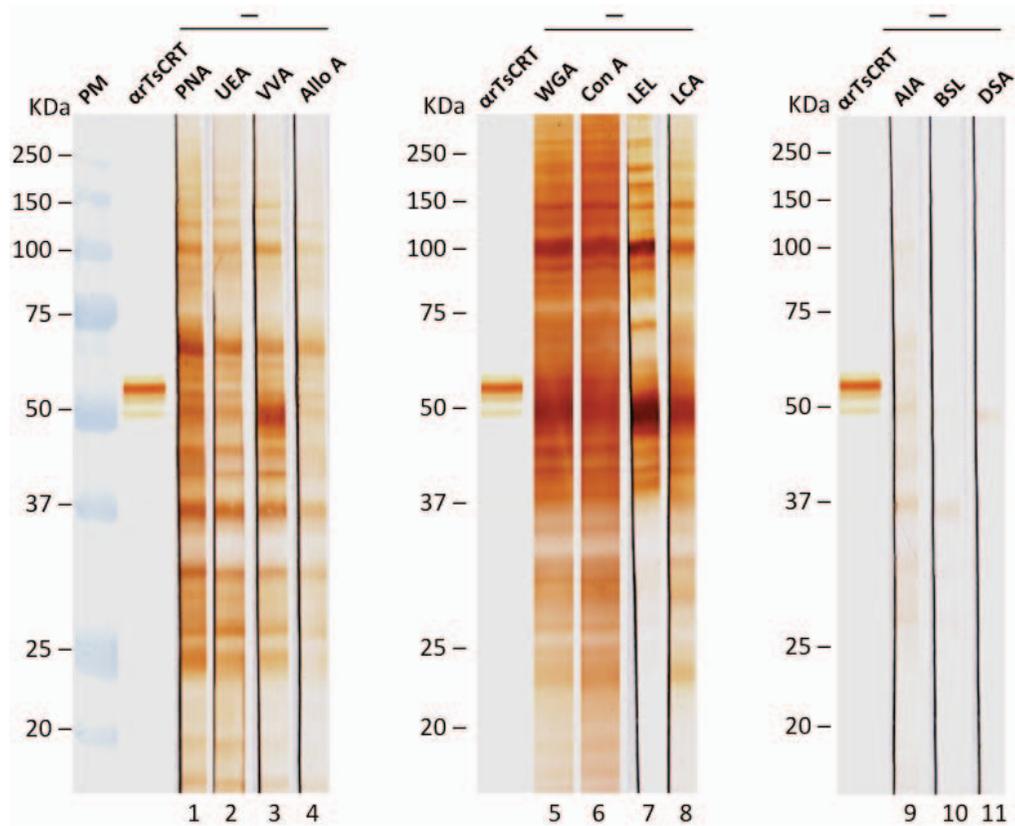
**Figura 7.- Análisis del tipo de glicosilación de la TsCRT.** Se observa el tipo de glicosilación de la TsCRT al someter las fracciones de proteína de manera independiente con PNGasa F, O-glicosidasa y Sialidasa A. Como control negativo se usó el extracto de cisticerco no desglicosilado (C-) y como control positivo el antígeno de tenia no desglicosilado (T-). T+ = tenia desglicosilado. **PM** = Marcadores de peso molecular en Kilodaltons.

## 8.7 Identificación de carbohidratos en la TsCRT en los diferentes extractos de *T. solium* por “lectin-blot”

Se analizaron los carbohidratos presentes en los diferentes extractos (Figuras 8, 9 y 10). Cabe mencionar que se están usando los extractos crudos de cada estadio, así como los productos de excreción del adulto. Todas las lectinas usadas en este trabajo provienen de un organismo diferente (vegetal o animal), muestran diferente actividad y tienen diferentes sitios de unión específicos (Cuadros 1, 2 y 3).

### 8.7.1 Cisticerco

En el análisis del extracto de cisticerco, la TsCRT se identificó con anticuerpos anti-rTsCRT ( $\alpha$ TsCRT) con un peso molecular de 54 KDa, sin embargo en el “lectin-blot” con las 11 lectinas utilizadas, no se observó ninguna reacción en el peso molecular, correspondiente a la TsCRT (Figura 8).



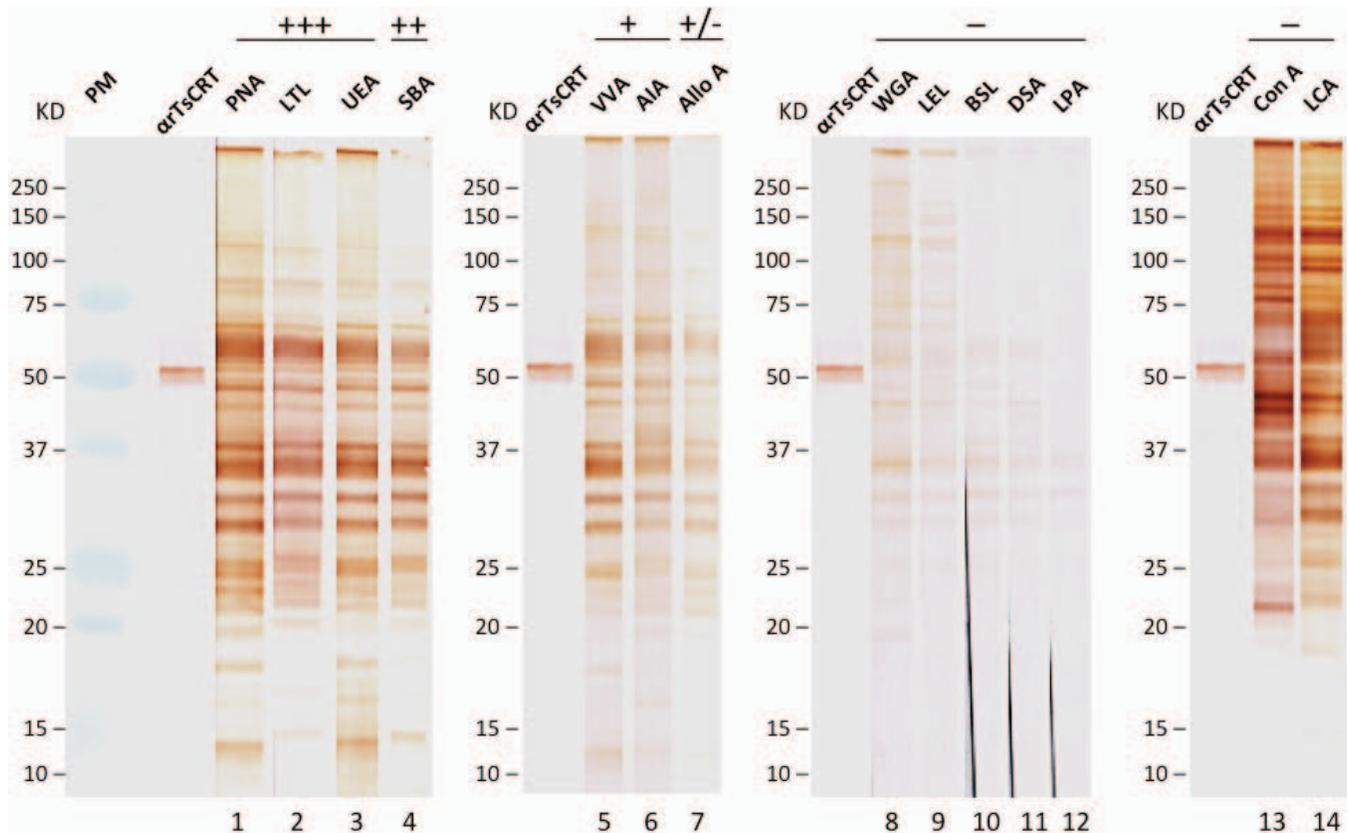
**Figura 8.- Identificación de carbohidratos de la TsCRT en el extracto de cisticerco de *T. solium* con 11 lectinas diferentes.** Se observa la TsCRT identificada con anticuerpos anti-rTsCRT ( $\alpha$ rTsCRT ) a un peso molecular de 54 KDa. **PM** = Marcadores de peso molecular en Kilodaltons.

Lectina	Nombre científico de la especie de origen	Carbohidrato de unión	Dilución usada para los experimentos	Intensidad de reacción a la TsCRT	Concentración usada para los experimentos
PM	αrTsCRT	54 KDa	1 mg/ml	+++	1 mg/ml
1	PNA	GalNAc	1 mg/ml	++	1 mg/ml
2	UEA	Gal	1 mg/ml	++	1 mg/ml
3	VVA	GalNAc	1 mg/ml	++	1 mg/ml
4	Allo A	GalNAc	1 mg/ml	++	1 mg/ml
5	αrTsCRT	54 KDa	1 mg/ml	+++	1 mg/ml
6	WGA	Man	1 mg/ml	++	1 mg/ml
7	Con A	Gal	1 mg/ml	++	1 mg/ml
8	LEL	GalNAc	1 mg/ml	++	1 mg/ml
9	αrTsCRT	54 KDa	1 mg/ml	+++	1 mg/ml
10	AIA	GalNAc	1 mg/ml	++	1 mg/ml
11	BSL	GalNAc	1 mg/ml	++	1 mg/ml
12	DSA	GalNAc	1 mg/ml	++	1 mg/ml

**Cuadro 1.- Lectinas utilizadas para la identificación de carbohidratos presentes en la TsCRT del cisticerco.** Se muestran las lectinas enumeradas según los ensayos de “western-blot”, lectina, nombre científico de la especie de origen, intensidad de reacción a la TsCRT, carbohidrato de unión y dilución usada para los experimentos. Todas las lectinas se usaron una concentración de 1mg/ml.

### 8.7.2 Tenia

Las tiras de PVDF con extracto de tenia se agruparon y enumeraron de manera ascendente según la intensidad de reacción de las lectinas a la TsCRT (intenso +++, medianamente intenso ++, poco intenso +, casi indistinguible +/- e indistinguible -). La TsCRT se identificó con anticuerpos  $\alpha$ TsCRT y muestra un peso molecular de 54 KDa (Figura 9). Las lectinas que presentaron una reacción intensa con la TsCRT fueron PNA con unión específica a Gal $\beta$ 1-3GalNAc, LTL y UEA ambas con unión a  $\alpha$ -LFuc. La lectinas que tuvieron una reacción medianamente intensa con la TsCRT fue la SBA, que identifica carbohidratos de Gal y GalNAc. Con una reacción poco intensa se observó con las lectinas VVA y AIA, las cuales identifican GalNAc y  $\alpha$ -Gal. Por último la Allo A presentó una reacción casi indistinguible (muy tenue) con unión a Gal $\beta$ 1-4GlcNAc (Tabla 3). Las lectinas restantes no presentaron reconocimiento alguno a las fracciones proteicas de interés.



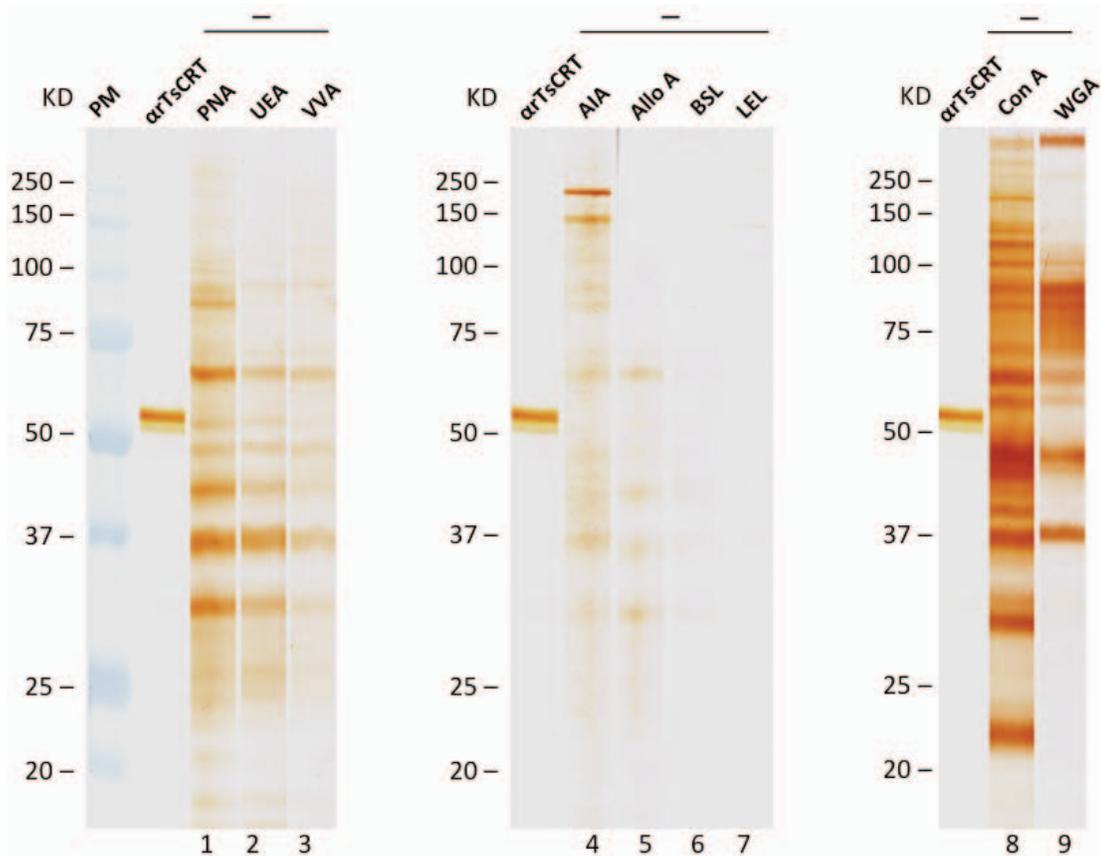
**Figura 9.- Identificación de carbohidratos de TsCRT en el adulto de *T. solium* con lectinas.** Se muestra la TsCRT identificada con anticuerpos  $\alpha$ TsCRT y los carbohidratos reconocidos en la TsCRT con las lectinas del cuadro 2. La TsCRT tiene un peso molecular de 54 KDa. Las tiras se ordenaron, agruparon y enumeraron de forma ascendente según el grado de intensidad de reacción con la TsCRT (+,-). **PM** = Marcadores de peso molecular en Kilodaltons.

#	Lectina	Especie	Reacción con TsCRT	Sitio de unión	Dilución
1	PNA	<i>Arachis hipogea</i>	+++	Gal $\beta$ 1-3GalNAc	1:750
2	LTL	<i>Lotus tetragonolobus</i>	+++	$\alpha$ -LFuc	1:500
3	UEA-I	<i>Ulex europaeus</i>	+++	$\alpha$ -LFuc	1:500
4	SBA	<i>Glycine max (soy bean)</i>	++	Gal, GalNAc	1:500
5	VVA	<i>Vicia villosa</i>	+	GalNAc	1:500
6	AIA	<i>Artocarpus integrifolia</i>	+	$\alpha$ -Gal	1:250
7	Allo A	<i>Allomyrina dichotoma</i>	+/-	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc	1:400
8	WGA	<i>Tricum vulgare</i>	-	$\beta$ -GlcNAc	1:4000
9	LEL	<i>Lycopersicon esculentum</i>	-	$\beta$ -GlcNAc	1:500
10	BSL	<i>Bandeiraea simplicifolia</i>	-	$\alpha$ -Gal, $\alpha$ -GalNAc	1:250
11	DSA	<i>Datura stramonium</i>	-	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc	1:250
12	LPA	<i>Limulus polyphemus</i>	-	Ácido siálico	1:100
13	Con A	<i>Conavalia esiformis</i>	-	$\alpha$ -Man > $\alpha$ -Glc	1:500
14	LCA	<i>Lens culinaris</i>	-	$\alpha$ -Man > $\alpha$ -Glc	1:750

**Cuadro 2.- Lectinas utilizadas para la identificación de carbohidratos en la TsCRT de la tenia.** Se muestra la enumeración de las lectinas según los ensayos de “western-blot”, lectina, nombre científico de la especie de origen, intensidad de reacción a la TsCRT, carbohidrato de unión y dilución usada para los experimentos. La concentración original de todas las lectinas fue de 1mg/ml.

### 8.7.3 Productos de excreción-secreción de la tenia

En los productos de E-S, se identificó a la TsCRT como en los casos anteriores, con el uso de los anticuerpos policlonales específicos  $\alpha$ rTsCRT y al igual que la tenia este extracto presentó dos bandas, siendo la de mayor peso molecular la glicosilada. Al hacer el “lectin-blot”, no se logró identificar a la TsCRT (Figura 10).



**Figura 10.-** Identificación de carbohidratos de TsCRT en los productos de E-S del adulto de *T. solium* con lectinas. Se observa la TsCRT identificada con anticuerpos  $\alpha$ TsCRT con un peso molecular de 54 KDa y los carbohidratos reconocidos en la TsCRT de los productos E-S con las lectinas de la Tabla 4. Al igual que en el cisticerco, las lectinas no reconocen algún carbohidrato en TsCRT. **PM** = Marcadores de peso molecular, **KD** = Kilodaltons.

Figura	Proteína	Carbohidrato	Intensidad	Carbohidrato de unión	Dilución
10	αTsCRT	54	+++	54	1:1000
10	PNA	54	++	54	1:1000
10	UEA	54	++	54	1:1000
10	VVA	54	++	54	1:1000
10	αTsCRT	54	+++	54	1:1000
10	AIA	54	++	54	1:1000
10	Allo A	54	++	54	1:1000
10	BSL	54	++	54	1:1000
10	LEL	54	++	54	1:1000
10	αTsCRT	54	+++	54	1:1000
10	Con A	54	++	54	1:1000
10	WGA	54	++	54	1:1000

**Cuadro 3.-** Lectinas usadas en la identificación de carbohidratos presentes en la TsCRT de los productos de E-S. Se muestra la enumeración de las lectinas según los ensayos de “western-blot”, lectina, nombre científico de la especie de origen, intensidad de reacción con la TsCRT, carbohidrato de unión y dilución usada para los experimentos. La concentración original de todas las lectinas fue de 1mg/ml.

## 8.8 Determinación del peso molecular de la TsCRT en el “western-blot” y “lectin-blot” del extracto de tenia

La fracción de la TsCRT que se encuentra glicosilada e identificada con anticuerpos anti-TsCRT tuvo un peso molecular de 53.86 KDa y la fracción que no presenta glicosilación tuvo un peso molecular de 51 y 50.54 KDa (tiras 2 y 10). Las fracciones de carbohidratos que se reconocieron en el extracto de tenia con las lectinas del cuadro 2, que cuentan con un peso molecular más aproximado a la fracción glicosilada de la TsCRT fue SBA con 53.86 KDa, UEA con 53.62 KDa, PNA con 53.37 KDa al igual que LTL, VVA con 54.11 KDa igual que Allo A y por último Con A con 54 KDa. AIA y LCA fueron las tiras que presentaron fracciones con los pesos moleculares más alejados. Las fracciones que se asemejan al peso molecular de la fracción no glicosilada de la TsCRT se identificó con VVA, LTL, UEA, SBA y AlloA. Las fracciones restantes sirvieron como guías para la alineación de todas las tiras para una mayor precisión en la determinación del peso molecular (Figura 11).

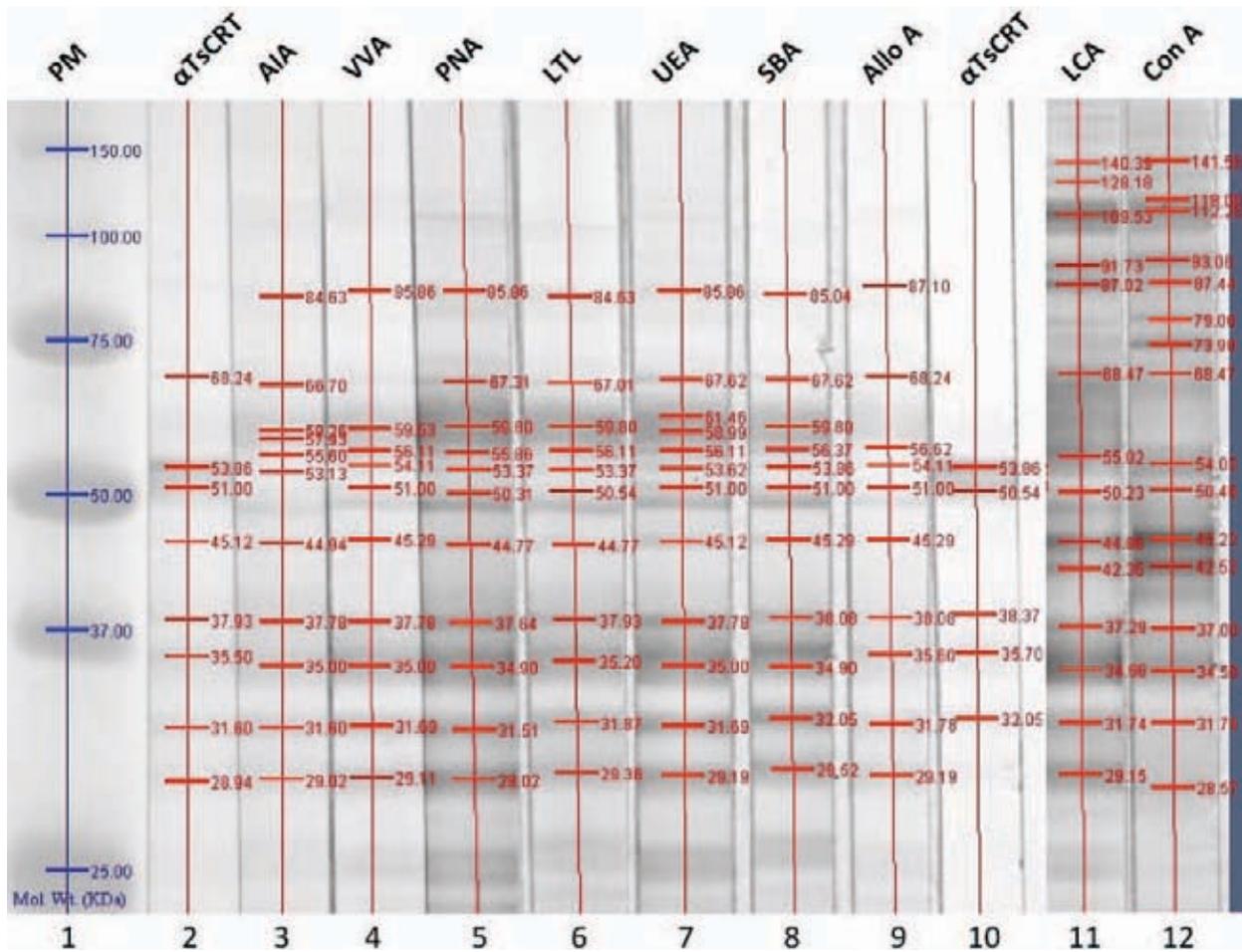


Figura 11.- Peso molecular de la TsCRT en el “western-blot” y “lectin-blot” del extracto de tenia. Se muestra el peso molecular de la TsCRT identificada con anticuerpos αTsCRT en las tiras 2 y 10, y el peso molecular de los carbohidratos reconocidos en el extracto de tenia con las lectinas del cuadro 2 en las tiras 3-9, 11 y 12. **PM** = Marcadores de peso molecular en Kilodaltons.

## 9 DISCUSIÓN

El interés por la caracterización de la TsCRT se ha llevado a cabo anteriormente en nuestro laboratorio hace varios años y dio origen al primer artículo publicado al respecto (Mendlovic *et al.*, 2004; 2006) para conocer la secuencia de residuos de aminoácidos de los cuales se compone, características estructurales y su localización en el parásito, sentando las bases para seguir describiendo la TsCRT y tratar de elucidar y proponer funciones específicas e importancia en la relación hospedero-parásito. Para que se lleve a cabo dicha relación se necesita una cantidad de elementos como son: las condiciones ambientales del hospedero y del parásito, sexo, edad, condiciones fisiológicas, bioquímicas, comunicación y señalización celular, etc., donde uno de los elementos importantes para tales relaciones son las interacciones con los carbohidratos (Varki y Chrispeels, 1999). El presente trabajo tiene como objetivo estudiar la composición de la TsCRT a nivel glicoproteico que incluye la identificación de la proteína con anticuerpos específicos, tratamiento con glicosidasas y especificidad de unión de lectinas a los carbohidratos de los que se compone la proteína, en cada uno de los extractos crudos de las distintas fracciones correspondientes a los distintos estadios del parásito.

Se demostró que la centrifugación diferencial como método de purificación de la rTsCRT que partía de las bacterias BL-21 transformadas con el plásmido pET23a-CRT fue eficiente para poder obtener la proteína pura, pero se realizaron varios lotes para que la concentración de la proteína fuera suficiente y poder realizar todos los experimentos de este trabajo. La determinación del peso molecular de la rTsCRT fue de 55.81 KDa, peso semejante al de la fracción de la TsCRT glicosilada en los extractos de *T. solium* la cual en promedio pesa 55.79 KDa. Esta semejanza puede deberse a la concentración de la rTsCRT purificada, ya que en los geles de poliacrilamida se observa más concentrada que la TsCRT glicosilada, cada gel de poliacrilamida tiene ciertas variaciones al ser preparado y cada carril es independiente uno de otro cuando se realiza la migración de las proteínas dentro de la cámara de electroforesis, ó específicamente por la anomalía de migración que tiene la calreticulina en los geles de SDS-PAGE, debido al alto contenido de residuos de aminoácidos acídicos presentes en la proteína que interactúan con el SDS, y en lugar de presentar un peso molecular de 45.3 KDa, muestra un peso mayor a 50 KDa (Mendlovic, *et al.*, 2004). A pesar de ello se pudo demostrar de la manera más precisa el peso molecular de cada una de las fracciones de nuestra proteína de interés para poder interpretar los resultados obtenidos.

La gráfica del título de anticuerpos nos permitió saber que la dilución de trabajo 1:128 000 en el suero de la tercera inmunización era la que empezaba a presentar las concentraciones óptimas antígeno-anticuerpo y a pesar de que era una dilución muy alta de trabajo, se confirmó la especificidad y afinidad que se tuvo hacia la rTsCRT. Al mismo tiempo se pudo observar la capacidad que la rTsCRT tiene para estimular el sistema inmunológico del hospedero. En este caso, la rTsCRT no presenta carbohidratos, sólo se compone de la parte proteica ya que es una proteína recombinante expresada en bacterias. A pesar de ello, su inmunogenicidad se demostró al inducir una buena respuesta antigénica y así mismo estimular una gran producción de anticuerpos anti-rTsCRT al inocular por vía intraperitoneal la rTsCRT en los ratones, debido a que hay una gran cantidad de células dendríticas capaces de presentar el antígeno a los linfocitos T para activarlos y secretar las citocinas necesarias para que las células B produzcan anticuerpos (Aabbas *et al.*, 2014). Por otro lado se sabe que la rTsCRT al ser inoculada oralmente junto con toxina colérica (CT) como adyuvante, en un modelo experimental de teniosis en hámster, reduce la carga parasitaria, limita el crecimiento de los parásitos que se logran implantar e incrementa la transcripción de mRNA para IL-4 e INF-g en la mucosa, además de inducir una respuesta IgA e IgG específica en el suero de los hámsteres inmunizados (Leon-Cabrera *et al.*, 2012). De igual manera, la administración por vía oral de la rTsCRT sin adyuvante aumenta los niveles de IgA (Hernández-Rubio, L., 2014). Estos datos sugieren que la porción proteica de la rTsCRT es inmunogénica y es necesario evaluar la inmunogenicidad de la TsCRT nativa glicosilada para entender el papel de los carbohidratos en la relación hospedero-parásito. En este contexto, se sabe que glicoproteínas de la oncosfera no pierden su inmunoreactividad después de tratamiento para eliminar las porciones carbohidrato (Arana *et al.*, 2013).

Los extractos de *T. solium* se obtuvieron en diferentes etapas de desarrollo del parásito, y al identificarlas con los anticuerpos anti-rTsCRT se observó que la TsCRT se expresó de forma diferente en cada una de ellas, ya que en las etapas tempranas del desarrollo del parásito las fracciones superiores que tenían un peso molecular de 55 KDa, no estaban tan concentradas como en las etapas maduras, donde las fracciones superiores tuvieron un peso molecular de 56 KDa. Este resultado supone que en las etapas maduras de *T. solium* la TsCRT se encuentra más glicosilada. Esta evidencia puede sugerir que los carbohidratos de los que se compone la TsCRT podrían tener importancia en el desarrollo de la infección, ya que podría proteger al parásito del nuevo ambiente al cual se enfrenta dentro del hospedero, en este caso al ambiente del duodeno-yeyuno el cuál está compuesto de una mezcla de jugos digestivos con el quimo (bolo alimenticio), las células del panel del tracto digestivo secretan lisozimas para regular la población microbiana en el intestino delgado y la peristalsis lleva a los fluidos acídicos a través del

intestino delgado para completar la digestión de los diferentes nutrientes (Tortora y Derrickson, 2008). Para poder corroborar esta parte se necesitaría inhibir dentro del parásito la actividad de las glicosiltransferasas dentro del RE y aparato de Golgi durante la síntesis de la proteína y así evitar su glicosilación, observando cómo podría afectarle en sus diferentes etapas de desarrollo.

Al someter a la fetuina con la mezcla de glicosidasas que rompían enlaces de carbohidratos tipo *N*, *O* y Ac. Siálico, se observó que las proteínas que contenía la proteína disminuyeron en peso molecular, demostrando la presencia de carbohidratos y con una mejor respuesta en las condiciones de desglicosilación desnaturalizantes. De igual manera, al someter los extractos de *T. solium* en el tratamiento con glicosidasas, se observó que la banda de TsCRT con un peso molecular de 55-56 KDa desapareció en todos los antígenos tratados, pero más notoriamente en los extractos de la tenia y en los productos de E-S, corroborando que es en las etapas maduras de *T. solium* donde la TsCRT expresa una mayor glicosilación. Las fracciones que pesaban 53-54 KDa no sufrieron cambio alguno después del tratamiento con glicosidasas, indicando ausencia de glicosilación. En este punto se demostró que la fracción glicosilada de la TsCRT tiene una diferencia de peso molecular de 2 KDa comparada con la no glicosilada y los carbohidratos que la componen equivalen un 4% del total de la masa de la proteína. También se comprobó que esta glicosilación de la TsCRT es de tipo *N* al tener un cambio en el peso molecular solamente en el tratamiento con la *N* glicosidasa. Este resultado concuerda con otros estudios donde se demuestra que el principal tipo de glicosilación en los helmintos es el de tipo *N* (Nyame *et al.*, 2004). Para que se lleve a cabo este tipo de unión se necesitan secuencias de residuos de Asn-x-Ser/Thr, mismos residuos que la TsCRT cuenta en sus sitios potenciales de glicosilación vistos en la secuencia de su gen, el primero en su dominio *N* en la posición 190 (NKTA, 190) y segundo en su dominio *C* en la posición 337 (NVSE, 337) (Mendlovic *et al.*, 2004).

En la identificación del tipo de carbohidratos de la TsCRT con el método de “lectin-blot”, solamente se obtuvieron resultados positivos en el extracto de tenia. Este reconocimiento fue principalmente con las lectinas PNA, LTL, UEA, SBA, VVA, AIA, y Allo A. En este blot el peso molecular de la TsCRT identificada con los anticuerpos anti-TsCRT fue de 53.86 KDa en la fracción superior y 51 KDa en la fracción inferior. La fracción de interés de cada tira fue posible identificarla con la mayoría de las lectinas utilizadas, esas fracciones fueron las que tenían el peso molecular más aproximado a 53.86 KDa. Con estos resultados se podría mencionar que la TsCRT posiblemente se compone de los carbohidratos Gal $\beta$ 1-3GalNAc,  $\alpha$ -LFuc, Gal, GalNAc,  $\alpha$ -Gal, en menor proporción Man (identificada con Con A) y Gal $\beta$ 1-4GlcNAc. Como la diferencia de peso molecular de la TsCRT

glicosilada y no glicosilada es aproximadamente de 2 KDa, los carbohidratos que podría contener la TsCRT podrían ser 11, ya que en promedio cada unidad de carbohidrato pesa 180 Da (Varki y Chrispeels, 1999). A pesar de que en los productos de E-S se logró identificar la fracción glicosilada de la TsCRT con el método de “western-blot”, con el método de “lectin-blot” no se logró identificar esta fracción, así como sucedió con los extractos de tenia. Probablemente este resultado se debió por la diferencia de concentración del antígeno (los productos E-S contenían 30  $\mu$ g mientras que la tenia 60  $\mu$ g), por la especificidad de las lectinas para el tipo de antígeno, la concentración de las lectinas no fue la ideal para este tipo de antígeno o también que en los PE-S la composición de los carbohidratos es diferente a la de la tenia y las lectinas utilizadas no fueron lo suficientemente específicas para detectar las fracciones de interés.

La supuesta composición de carbohidratos en la TsCRT podrían justificarse comparándolo con estudios previos sobre la caracterización estructural de los *N* glicanos del metacéstodo de *T. solium*, en donde se identificaron los posibles patrones de glicosilación de las glicoproteínas del parásito (TSGs), realizando un “lectin-blot” con ConA, WGA, *L. culinaris* y PSA. Estas lectinas fueron específicas para un complejo de carbohidratos tipo *N* con núcleo de fucosilación  $\alpha$ 1-6, respectivamente y también se demostró que muchas de las lectinas con afinidad por carbohidratos de unión tipo *O* pueden unirse a glicoproteínas antigénicas, una de ellas es el llamado “antígeno T” que se compone de Gal $\beta$ 1-3GalNAc (encontrado con PNA en TsCRT), el cual también fue identificado por Jacalina y VVA en los TSGs (Restrepo *et al.*, 2000; Haslam *et al.*, 2003). En los mismos estudios, los núcleos de elongación a la secuencia de residuos de aminoácidos de los TSGs se detectaron con las lectinas RCA (*Ricinus communis*) y ECL (*Erythrina cristagalli*), siendo este carbohidrato la Gal $\beta$ 1-4GlcNAc. Las cadenas de terminación de los carbohidratos fueron evaluadas con DBA, SJA, UEA dando como resultado los carbohidratos  $\alpha$ GalNAc,  $\alpha$ Gal,  $\alpha$ -LFuc y  $\beta$ GalNAc respectivamente. Al tratar los TSGs con PNGasa F, la Jacalina fue eliminada después del tratamiento, sugiriendo la ausencia de uniones de tipo *O*, pero no fue consistente al identificar los antígenos T. Estos resultados podrían sugerir que los tipos de carbohidratos encontrados en la TsCRT que son más consistentes para un tipo de glicosilación tipo *O* (GalNAc, Gal,  $\alpha$ -LFuc, y Gal $\beta$ 1-3GalNAc) se pueden unir a regiones específicas en los carbohidratos de unión tipo *N* (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc y Man) anclados directamente al núcleo y/o como cadenas de terminación.

Tomando en cuenta la determinación de las isoformas de la TsCRT en los diferentes antígenos de *T. solium* y teniendo la composición sugerida de los carbohidratos de la TsCRT, se podría justificar el comportamiento de estos en las diferentes fases del parásito, comparándolo con estudios previos sobre la detección *in situ* de algunas glicoproteínas antigénicas del metacéstodo de *T. solium* (TSGs) (Obregón-Henao *et al.*, 2003; Cruz-Rivera *et al.*, 2014). Aunque estos estudios se basan en determinar la localización de los TSGs de menor peso molecular (TSG12) y otros glicoconjugados dentro del cisticerco, hay datos que se asemejan al de la TsCRT aquí descrita, ya que se trata de explicar cómo evoluciona la interacción entre el hospedero-parásito en una infección natural en cerdos. Se menciona que hay una expresión diferencial de los glicoconjugados a través del tegumento de la membrana vesicular, canal espiral, escólex del metacéstodo y en el tejido adyacente del hospedero y que los TSGs fueron localizados entre el fluido vesicular, sobre la membrana vesicular del tegumento, el subtegumento del canal espiral y el escólex del cisticerco, regiones del parásito que posteriormente tendrán contacto directo con el medio dentro del hospedero cuando el metacéstodo se convierta en tenia. Dentro de estos se encontraron carbohidratos de unión tipo *N* los cuales tuvieron una distribución similar y estuvieron presentes en varios lugares dentro del parásito. En contraste, los glicoconjugados que contenían GalNAc y antígenos T de unión tipo *O* se encontraban específicamente en las estructuras del canal espiral. Ese dato sugiere que los TSGs participan en la interfaz del huésped-parásito en las diferentes etapas del ciclo de vida del metacéstodo ya que la transición en la composición de los carbohidratos fue observado en el tegumento del canal espiral, en donde los carbohidratos de unión tipo *N* ya no eran detectados, y los GalNAcs y antígenos T de unión tipo *O* (Gal $\beta$ 1-3GalNAc) eran abundantes. Esto nos permite sugerir que la transición de carbohidratos tipo *O* encontrados en mucinas sobre el tegumento del canal espiral, pueden proteger al parásito de las proteínas subyacentes y lípidos de la digestión enzimática una vez que el cisticerco evagina y se adhiere al lumen del intestino (Obregón-Henao *et al.*, 2003).

Efectivamente el comportamiento de los carbohidratos de la TsCRT observado en este trabajo es semejante a lo explicado anteriormente. La glicosilación se observa muy poco en el cisticerco, en el cisticerco evaginado la glicosilación se expresa poco más y la mayor expresión de carbohidratos en la TsCRT es en la etapa adulta y sus productos de E-S. También estos resultados concuerdan con los estudios donde se describe que en el estado adulto la TsCRT esta preferentemente localizada en los citones tegumentarios y musculares de las ventosas y el rostelo, estas zonas del parásito son las que están en contacto directo con el hospedero y los carbohidratos aquí encontrados en la TsCRT se encuentran altamente expresados comparado con otras etapas de su ciclo de vida (Mendlovic *et al.*,

2006). Posiblemente esta transición de carbohidratos de la TsCRT en el desarrollo de *T. solium* sirva para su homeostasis dentro del hospedero, sugiriendo que la TsCRT y sus carbohidratos juegan un papel importante en la interacción hospedero-parásito.

A pesar de estas sugerencias e interpretaciones en la composición de los carbohidratos de la TsCRT aún no se puede confirmar una respuesta precisa, ya que el método del “lectin-blot” en este caso es un método muy subjetivo para un análisis puntual de carbohidratos. Para poder tener un resultado real de la composición de los carbohidratos de nuestra proteína, se necesitarían realizar otros estudios con técnicas más precisas de análisis de composición molecular, una de ellas es la espectrometría en masas. Este método nos permite saber el porcentaje de heterogeneidad y tipo de glicosilación, sitios de glicosilación, patrones de unión de glicosilación, número y longitud de las antenas, la construcción de sus bloques y los patrones de sustitución con fucosa, ácido siálico u otros grupos como sulfatos, fosfatos o esteres, completar secuencia de glicanos individuales y estructuras de glicolípidos, glicopéptidos, lipopolisacáridos y otros derivados de glicanos (Varki y Crispeels, 1999). Aun así, cabe destacar la posibilidad de que los resultados descritos en este trabajo sirven como fundamento para comprender mejor la bioquímica de la TsCRT y continuar con la línea de investigación de esta proteína.

## 10 CONCLUSIONES

- El protocolo de la centrifugación diferencial, electroforesis de poliacrilamida y electroelución fue eficiente para purificar a la rTsCRT, a partir de bacterias transformadas.
- Se obtuvo una gran producción de anticuerpos anti-rTsCRT al realizar la inmunización de los ratones Balb/c por vía intraperitoneal con la rTsCRT y adyuvante completo de Freund. La concentración óptima de antígeno-anticuerpo fue en la titulación de 1:128 000.
- Los anticuerpos anti-rTsCRT fueron altamente específicos para la rTsCRT y la TsCRT, ya que se pudo identificar de manera clara cada fracción de la TsCRT en los extractos crudos de *T. solium*. El patrón de reconocimiento de la TsCRT en cada extracto mostró diferente intensidad y peso molecular.
- El peso molecular determinado de las proteínas en cada análisis tuvo pequeñas variaciones debido a las condiciones intrínsecas de cada experimento realizado, a pesar de ello, los resultados fueron suficientemente precisos para determinar por densitometría el peso molecular de cada fracción de los extractos de *T. solium*.
- La isoforma de la TsCRT que presentó una mayor cantidad de carbohidratos fue en las etapas maduras de *T. solium*, mostrado en el extracto de tenia y en los productos de E-S. Esta glicosilación fue de tipo *N*, ya que únicamente hubo un cambio en el peso molecular desglicosilando la TsCRT con la N-glicosidasa. Este resultado coincide con los dos sitios potenciales de N-glicosilación NKTA 190 y NVSE 337, encontrados en la secuencia del gen de la TsCRT.
- No se puede concluir la composición de carbohidratos presentes de la TsCRT, ya que se necesitaría de un método más analítico que el “lectin-blot”. Aun así se podría sugerir que la composición de carbohidratos en la proteína es de Gal $\beta$ 1-3GalNAc,  $\alpha$ -LFuc, Gal, GalNAc, Gal $\beta$ 1-4GlcNAc y Man, ya que algunos estos carbohidratos coinciden con los descritos en la literatura, los cuales pueden ayudar a regular el medio al que se expone el parásito dentro de su hospedero para su supervivencia.

## 11 PERSPECTIVAS

- Realizar el mismo procedimiento aquí descrito para todos extractos de los estadíos de *T. solium*, es decir, desde las oncosferas hasta los productos de E-S y con una mayor concentración en cada extracto.
- Elaborar una electroforesis 2D a la TsCRT nativa para evitar posibles interacciones no deseadas con otras proteínas dentro del “western-blot” y “lectin-blot”.
- Elaborar un protocolo para purificar la TsCRT nativa sin alterar sus propiedades químicas.
- Realizar la desglicosilación con una gamma más amplia de glicosidasas en donde se incluyan endoglicosidasas y exoglicosidasas, fucosidasas, galactosidasas, periodato, etc., que nos demuestre de manera más clara la presencia de carbohidratos basándonos en la diferencia de pesos moleculares.
- Realizar un “lectin-blot” utilizando más cantidad de lectinas que nos permitan visualizar de una manera más específica la composición de carbohidratos en la proteína de interés.
- Analizar la composición de carbohidratos del tejido del hospedero en el cual se establece el parásito para ver la correlación que se tiene respecto a las proteínas y carbohidratos que interactúan.
- Realizar el método de espectrometría de masas para el análisis y determinación de la composición de los carbohidratos de la TsCRT.
- Hacer un análisis de todos los carbohidratos detectados en cada extracto de *T. solium* con el método de “lectin-blot”.

## 12 BIBLIOGRAFÍA

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H.H. & PILLAI, S. (2014) *Cellular and Molecular Immunology: with STUDENT CONSULT Online Access*. Elsevier Health Sciences.
- ALBERTS, B. JOHNSON, A. LEWIS, J. RAFF, M. ROBERTS, K. WALTER, P. (2008) *Molecular Biology of the Cell, 5th Edition*. In *Perspective*.
- ARANA, Y., VERASTEGUI, M., TUERO, I., GRANDJEAN, L., GARCIA, H.H. & GILMAN, R.H. (2013) Characterization of the carbohydrate components of *Taenia solium* oncosphere proteins and their role in the antigenicity. *Parasitol Res* **112**, 3569–3578.
- AVILA, G., AGUILAR, L., BENITEZ, S. & YEPEZ-MULIA, L. (2002) Inflammatory responses in the intestinal mucosa of gerbils and hamsters experimentally infected with the adult stage of *Taenia solium*. *International Journal for Parasitology* **32**, 1301–1308.
- BRUSCA, R.C. & BRUSCA, G.J. (2003) *Invertebrates*, 2nd edition. Sinauer Associates, Incorporated, New York.
- COPPOLINO, M.G. & DEDHAR, S. (1998) Calreticulin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **30**, 553–558.
- CORREA, D., LACLETTE, J.P., RODRIGUEZ-DEL-ROSAL, E., MERCHANT, M. & FLISSER, A. (1987) Heterogeneity of *Taenia solium* cysticerci obtained from different naturally infected pigs. *The Journal of Parasitology* **73**, 443–445.
- CRUZ-RIVERA, M., VAUGHAN, G., MENDLOVIC, F., VERGARA-CASTAÑEDA, A., ROMERO-VALDOVINOS, M., LEON-CABRERA, S., ALONSO, M., AVILA, G. & FLISSER, A. (2014) Cytokine expression at the anchor site in experimental *Taenia solium* infection in hamsters. *Veterinary Parasitology* **200**, 299–302.
- FLISSER, A. (1988) Neurocysticercosis in Mexico. *Parasitology Today (Personal ed.)* **4**, 131–137.
- FLISSER, A. (1991) Taeniasis-cysticercosis: an introduction. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **22 Suppl**, 233–235. Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM, Mexico DF.
- FLISSER, A. (2013) State of the art of *Taenia solium* as compared to *Taenia asiatica*. *The Korean J Parasitol* **51**, 43–49.
- FLISSER, A., VARGAS-PARADA, L. & PEDRO, J. (2006) *Taenia solium*: un parásito cosmopolita. *Investigación y Ciencia*, 11.
- GÓMEZ-GARCÍA, L., LÓPEZ-MARÍN, L.M., SAAVEDRA, R., REYES, J.L., RODRÍGUEZ-SOSA, M. & TERRAZAS, L.I. (2005) Intact glycans from cestode antigens are involved in innate activation of myeloid suppressor cells. *Parasite Immunology* **27**, 395–405.

- HASLAM, S.M., RESTREPO, B.I., OBREGÓN-HENAO, A., TEALE, J.M., MORRIS, H.R. & DELL, A. (2003) Structural characterization of the N-linked glycans from *Taenia solium* metacestodes. *Molecular and Biochemical Parasitology* **126**, 103–107.
- HERNÁNDEZ-RUBIO, L. (2014) Purificación de la calreiculina de *T. solium* y determinación de anticuerpos producidos post-inmunización. *Facultad de Ciencias, UNAM*. **60**.
- LARRALDE, C., Y ALUJA, A.S. (2006) *Cisticercosis: Guía para Profesionales de la Salud*. *Rev Mex Neuroci* **8**. Fondo de Cultura Económica.
- LEÓN-CABRERA, S., CRUZ-RIVERA, M., MENDLOVIC, F., AVILA-RAMÍREZ, G., CARRERO, J.C., LACLETTE, J.P. & FLISSER, A. (2009) Standardization of an experimental model of human taeniosis for oral vaccination. *Methods* **49**, 346–350.
- LEON-CABRERA, S., CRUZ-RIVERA, M., MENDLOVIC, F., ROMERO-VALDOVINOS, M., VAUGHAN, G., SALAZAR, A.M., AVILA, G. & FLISSER, A. (2012) Immunological mechanisms involved in the protection against intestinal taeniosis elicited by oral immunization with *Taenia solium* calreticulin. *Experimental Parasitology* **132**, 334–340. Elsevier Inc.
- MARCELAIN, K., COLOMBO, A., MOLINA, M.C., FERREIRA, L., LORCA, M., AGUILLÓN, J.C. & FERREIRA, A. (2000) Development of an immunoenzymatic assay for the detection of human antibodies against *Trypanosoma cruzi* calreticulin, an immunodominant antigen. *Acta Tropica* **75**, 291–300.
- MAZOLA, Y., CHINEA, G. & MUSACCHIO, A. (2011) Integrating bioinformatics tools to handle glycosylation. *PLoS Computational Biology* **7**, e1002285.
- MENDLOVIC, F., CARRILLO-FARGA, J., TORRES, J., LACLETTE, J.P. & FLISSER, A. (2006) Differential expression of calreticulin in developmental stages of *Taenia solium*. *The Journal of Parasitology* **92**, 789–795.
- MENDLOVIC, F., GARZA-RODRÍGUEZ, A., CARRILLO-FARGA, J., GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, F., MARAVILLA, P. & FLISSER, A. (2014) From stillness to motion: 80 years after the first description of *Taenia solium* oncosphere hatching. *Parasites & Vectors* **7**, 12.
- MENDLOVIC, F., OSTOA-SALOMA, P., SOLÍS, C.F., MARTÍNEZ-OCAÑA, J., FLISSER, A. & LACLETTE, J.P. (2004) Cloning, characterization, and functional expression of *Taenia solium* calreticulin. *The Journal of Parasitology* **90**, 891–893.
- MICHALAK, M., CORBETT, E.F., MESAELI, N., NAKAMURA, K. & OPAS, M. (1999) Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *The Biochemical Journal* **344 Pt 2**, 281–292.
- NELSON, D.D.L., LEHNINGER, A.L. & COX, M.M. (2013) *Lehninger Principles of Biochemistry*. W.H. Freeman.

- NYAME, A K., KAWAR, Z.S. & CUMMINGS, R.D. (2004) Antigenic glycans in parasitic infections: implications for vaccines and diagnostics. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **426**, 182–200.
- OBREGÓN-HENAO, A., LONDOÑO, D.P., GÓMEZ, D.I., TRUJILLO, J., TEALE, J.M. & RESTREPO, B.I. (2003) In situ detection of antigenic glycoproteins in *Taenia solium* metacestodes. *The Journal of Parasitology* **89**, 726–732.
- OCHOA-SÁNCHEZ, A., JIMÉNEZ, L. & LANDA, A. (2011) The hamster model for identification of specific antigens of *Taenia solium* tapeworms. *Journal of Biomedicine & Biotechnology* **2011**, 504959.
- PRASANPHANICH, N.S., MICKUM, M.L., HEIMBURG-MOLINARO, J. & CUMMINGS, R.D. (2013) Glycoconjugates in host-helminth interactions. *Frontiers in Immunology* **4**, 240.
- RABIELA, M.T., HORNELAS, Y., GARCÍA-ALLAN, C., RODRÍGUEZ-DEL-ROSAL, E. & FLISSER, A. (2000) Evagination of *Taenia solium* cysticerci: a histologic and electron microscopy study. *Archives of Medical Research* **31**, 605–607.
- RABIELA, M.T., RIVAS, A. & FLISSER, A. (1989) Morphological types of *Taenia solium* cysticerci. *Parasitology Today* **5**, 357–359.
- RESTREPO, B.I., OBREGÓN-HENAO, A., MESA, M., GIL, D.L., ORTIZ, B.L., MEJÍA, J.S., VILLOTA, G.E., SANZÓN, F. & TEALE, J.M. (2000) Characterisation of the carbohydrate components of *Taenia solium* metacestode glycoprotein antigens. *International Journal for Parasitology* **30**, 689–696.
- RZEPECKA, J., RAUSCH, S., KLOTZ, C., SCHNÖLLER, C., KORNPROBST, T., HAGEN, J., IGNATIUS, R., LUCIUS, R. & HARTMANN, S. (2009) Calreticulin from the intestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* is a Th2-skewing protein and interacts with murine scavenger receptor-A. *Molecular Immunology* **46**, 1109–1119.
- SUCHITRA, S. & JOSHI, P. (2005) Characterization of *Haemonchus contortus* calreticulin suggests its role in feeding and immune evasion by the parasite. *Biochimica et Biophysica Acta* **1722**, 293–303.
- TORTORA, G.J. & DERRICKSON, B.H. (2008) *Principles of Anatomy and Physiology*, 12th edition. John Wiley & Sons, USA.
- VARKI, A. & CHRISPEELS, M.J. (1999) *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- WILLMS, K., MERCHANT, M.T., GOMEZ, M. & ROBERT, L. (2001) *Taenia solium*: Germinal cell precursors in tapeworms grown in hamster intestine. *Archives of Medical Research* **32**, 1–7.