



Infectio

Print ISSN 0123-9392

Infect. vol.6 no.1 Bogotá Jan./Mar. 2002



El papel de los carbohidratos en la antigenicidad de las glicoproteínas del cisticerco de la *Taenia solium*

Andres Obregón-Henao *, Dora L. Gil **, Diana I. Gómez***, Fernando Sanzòn ***, Judy M. Teale****, Blanca I. Restrepo *

* Grupo de Parasitología Molecular, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia

** Escuela de Bacteriología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

*** Facultad de Ciencias Pecuarias, Centro de Estudios en Salud, Universidad de Nariño, San Juan de Pasto, Colombia

**** Departamento de Microbiología, The University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, TX, USA

Trabajo ganador del II Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Oriente Antioqueño, Junio de 2000.

Permiso para usar material publicado: Molecular and Biochemical Parasitology; v114 Andres Obregón-Henao, Dora L. Gil, Diana I. Gómez, Fernando Sanzòn, Judy M. Teale, Blanca I. Restrepo. The role of N-linked carbohydrates in the antigenicity of *Taenia solium* metacestode glycoproteins of 12, 16 and 18 kD. p209-15. Copyright 2001 con el permiso de Elsevier Science. Correspondencia: Blanca I. Restrepo, Cra. 72A No. 783-141. Medellín-Colombia. o 417 E Cardinal Ave, McAllen- TX EEUU, email: blancos@sc2000.net

Resumen

Introducción: la neurocisticercosis es una infección causada por el cisticerco de la *T. solium* y puede confundirse con otras afecciones del sistema nervioso central. Las glicoproteínas de 12-28 kD de este parásito son útiles para el diagnóstico serológico de la neurocisticercosis. Estas glicoproteínas contienen abundantes carbohidratos asociados vía asparagina (tipo N).

Objetivo: determinar la contribución de los carbohidratos tipo N en la antigenicidad de las glicoproteínas. **Materiales y Métodos:** se purificaron las glicoproteínas de 12, 16 y 18 kD de los cisticercos utilizando un gel preparativo de poliacrilamida y se sometieron a deglicosilación enzimática con PNGase F. Luego se evaluaron los cambios en antigenicidad entre las proteínas

nativas y deglicosiladas por Western blot. **Resultados:** los antígenos deglicosilados redujeron su peso molecular a 7 kD y perdieron parte su antigenicidad. Esta reducción fue más notoria para la proteína de 18 kD, la cual tiene mayor contenido de carbohidratos que las de 12 y 16 kD. **Conclusión:** estos resultados sugieren que los carbohidratos no solo contribuyen a la antigenicidad, sino que, además causan un bloqueo estérico que inhibe que el sistema inmune detecte otros epítopes no expuestos. Estos datos sugieren que la antigenicidad de las glicoproteínas de *T. solium* se debe a una combinación de epítopes sacarídicos y probablemente proteicos.

Palabras clave: *Taenia solium*, neurocisticercosis, glicoproteína, carbohidratos, cestodo, deglicosilación, parásito.

Abstract

The glycoproteins of 12-28 kD from *Taenia solium* metaestodes provide a high specificity and sensitivity for the serological diagnosis of the central nervous system infection, neurocysticercosis. their widespread use as antigens for routine serological assays will require their production in large and reproducible amounts. Prior to determining the ideal strategy to produce these antigens at a large scale, it is important to determine the contribution of the carbohydrates to the antigenicity of these molecules, given the uncertainty of reproducing saccharidic epitopes in recombinant expression systems. In this study we examined this issue. The chemical oxidation of the carbohydrates of the 12-28 kD glycoproteins with sodium metaperiodate, reduced the antigenicity of the molecules to variable extents, with the more notable changes being detected for the 18 and 28 kD antigens.

This approach was complemented by purification of the 12, 16 and 18 kD antigens, followed by the enzymatic deglycosylation of their abundant N-linked oligosaccharides. Silver-stained SDS-PAGE analysis indicated that the three deglycosylated antigens now migrated as 7 kD products, suggesting a protein backbone with a similar size, but different extents of glycosylation. By Western blot, the antigenicity of these antigens was diminished.

This was more notable for the 18 kD antigen, which is more heavily glycosylated than the 12 or 16 kD glycoproteins. These data suggest that the antigenicity of the glycoproteins of *T. solium* is due to a combination of carbohydrate and protein epitopes.

Key words: *Taenia solium*, cysticercosis, neurocysticercosis, glycoprotein, carbohydrates, deglycosylation.

Introducción

La neurocisticercosis (NCC) es una infección parasitaria del sistema nervioso central que es causada por el metacéstodo o cisticerco de la *Taenia solium*. Esta infección se puede confundir con otras patologías del sistema nervioso central como tumores e infecciones. El diagnóstico serológico de la NCC es de gran importancia en el manejo clínico de los pacientes porque es un apoyo fundamental para complementar los hallazgos radiológicos y clínicos compatibles con esta enfermedad (1). A pesar de que se han identificado un grupo de glicoproteínas (GPs) que son altamente antigénicas y específicas para el diagnóstico serológico de pacientes con NCC, el uso extensivo de estos antígenos ha estado limitado por la alta tecnología y el costo requerido para purificarlos (2-4). Recientemente se describió un método más simple y económico para aislar unas GPs antigénicas similares a las ya descritas, pero este avance aun no es suficiente para garantizar la producción de estos antígenos a gran escala (5). El uso de la tecnología recombinante podría ser la solución más razonable, pero antes de iniciar este esfuerzo es esencial considerar el papel de los carbohidratos en la antigenicidad de estos glicoconjugados por dos razones. La primera es la presencia de abundantes oligosacáridos con uniones a la asparagina (tipo N) de la cadena polipeptídica, los cuales comprometen aproximadamente el

50% de la masa molecular de cada GP (5). Si los epítopes sacarídicos son realmente dominantes, una segunda consideración es la posible dificultad para reproducir estas estructuras en los sistemas recombinantes disponibles, debido a las limitaciones en el repertorio de carbohidratos que pueden ser producidos por este medio.

En este estudio se evaluó la contribución de los carbohidratos tipo N en la antigenicidad de cada una de las GPs de *T. solium*, con el fin de determinar la estrategia ideal para producir sus epítopes antigenicos en gran cantidad. El mayor énfasis se hizo en las GPs de 12, 16 y 18 kD (GP12, GP16 y GP18, respectivamente) debido a su mayor eficiencia de purificación.

El estudio de los carbohidratos se realizó por dos métodos: La oxidación química de los azúcares con metaperiodato de sodio, o su remoción de la proteína con la enzima N-glicosidasa F. Luego de estas modificaciones, los cambios en la antigenicidad de cada GP se analizaron por Western Blot.

Materiales y Métodos

1. Purificación de las GPs

Los detalles de la purificación de las GPs de *Taenia solium* se describieron previamente (5). En resumen, los quistes de *T. solium* se disecaron a partir de cerdos infectados naturalmente. Estos quistes se homogenizaron en un buffer HEPES y la suspensión resultante se paso a través de una columna de la lectina Lens culinaris para purificar las GPs en esta preparación.

La eficiencia de la elución se evaluó por Western y Lectin blots (ver abajo). A partir de esta preparación, se realizó una purificación de cada una de las GPs. Para ello, se redujo el material eluido con 1% (v/v) 2-mercaptoetanol y ebullición por 10 minutos, y luego se paso a través de un gel preparativo de poliacrilamida al 15% en un sistema con elución continua (Sistema Prep-cell de Bio-Rad). El efluente se colectó en fracciones, las cuales se analizaron por coloración de plata en geles de poliacrilamida con sodio-dodecilsulfato (SDS-PAGE), Western y Lectin blots (ver adelante). Las fracciones que contenían la misma GP se unieron y se concentraron por ultrafiltración (Amicon, Beverly, MA).

2. Análisis de las GPs

La separación de las proteínas de acuerdo a su masa molecular se realizó por electroforesis en geles de SDS-PAGE al 15% bajo condiciones reducidas (Smith, 1994 # 251). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Hybond-C (Amersham, Piscataway) durante 12 horas a 4°C, con corriente constante de 250 mA. Los protocolos para evaluación de las GPs se describieron previamente (5). En resumen, la coloración de plata de los geles de SDS-PAGE permitió visualizar las GPs a estudiar. Los Western blots se realizaron con un pool de ocho sueros de pacientes con NCC diluidos 1:400 para evaluar la antigenicidad de las GPs, y los Lectin blots con Lens culinaris y Concanavalina A (Con A) biotiniladas (SIGMA Biochemical company) permitieron determinar la presencia o ausencia de carbohidratos asociados a las proteínas.

3. Deglicosilación enzimática

La eliminación de los carbohidratos tipo N se realizó incubando las GPs en un buffer de deglicosilación (buffer fosfato 50mM, pH 7.4, EDTA 25 mM, 2-mercaptoetanol 1% v/v, azida de sodio 0.002% p/v; SIGMA), en presencia de un pool de inhibidores de proteasas (PMSF 5 mM, aprotinin 0.3 mM, leupeptin 0.1 mM y pepstatin 0.1 mM; SIGMA). La deglicosilación se realizó con 2 unidades de N-glicosidasa F (Boehringer Mannheim, Germany) por 12 horas a 37°C. La deglicosilación "in situ" se realizó sobre las GPs transferidas a la membrana de nitrocelulosa. En resumen, las proteínas transferidas se visualizaron con Ponceau-S (SIGMA) para cortar las tirillas con cada una de las GPs. Luego se bloquearon las membranas por 1 hora con Smlml de albúmina en buffer TBS (100 mM Tris-HCl pH 7.5, NaCl 150mM), y se incubaron por 24 horas a 37°C con N-glicosidasa F como se describió anteriormente. Como control se utilizaron

membranas donde no se agregó glicosidasa. Luego se realizaron Lectin y Western blots para estimar la eficiencia de la deglicosilación y los cambios en la antigenicidad, respectivamente.

4. Tratamiento con meta-periodato de sodio

El meta-periodato de sodio se usó para oxidar las GPs (61). Para ello, las membranas de nitrocelulosa que contenían antígenos se bloquearon con albúmina al 5% por una hora y luego se incubaron con meta-periodato de sodio 50 mM (SIGMA) en un buffer de acetato de sodio 50 mM pH 4.5, por 60 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Las tirillas se lavaron con PBS y se incubaron con glicina al 1% en PBS por 30 minutos. Finalmente se evaluaron los cambios en la antigenicidad o la afinidad por las lectinas con un Western y Lectin blot, respectivamente. La eficiencia del tratamiento con meta-periodato se evaluó por la pérdida de afinidad de los antígenos por las lectinas.

5. Analisis por IMAGE

La reducción en la antigenicidad de cada GP después de la deglicosilación de los carbohidratos tipo N se estimó comparando la densidad de las moléculas nativas y las tratadas con N-glicosidasa F. Para este fin se escanearon los Western blots y los geles teñidos con plata que contenían la GP de interés, y con el software IMAGE (KODAK ID digital Science 2.0.2) se estimaron los "puntos por pulgada" (dots per inch o dpi) de cada banda. A partir del Western blot se obtuvo la información sobre la disminución en la antigenicidad, y en los geles de plata se determinó la cantidad de antígeno que se había puesto en cada pozo. Los cálculos para cada molécula, tanto en la tinción con plata como para el Western blot se realizaron de la siguiente manera:

$$\% \text{ reducción intensidad banda} = \frac{\text{dpi GP nativa} - \text{dpi GP deglicosilada}}{\text{dpi GP nativa}} \times 100$$

La pérdida de antigenicidad se calculó determinando la diferencia entre la reducción en la intensidad de la banda en la tinción con plata y Western blot, así:

% disminución de = % reducción dpi por Western blot - % reducción dpi en gel de plata.

Antigenicidad

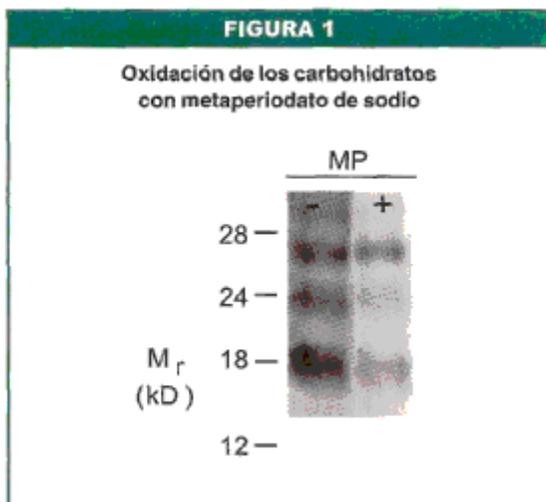
Los cambios en la antigenicidad luego del tratamiento con metaperiodato de sodio se realizaron comparando los dpi de las moléculas nativas y las oxidadas.

Resultados

1. oxidación de carbohidatos con metaperiodato

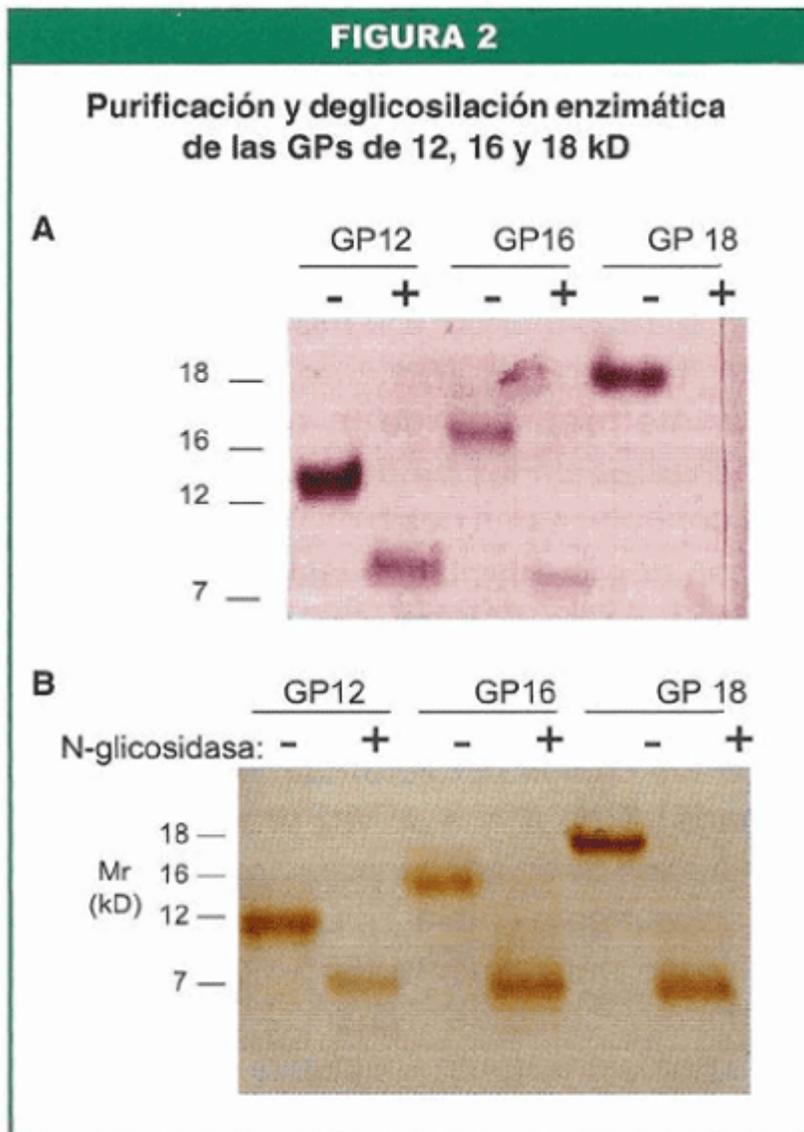
La oxidación de los carbohidratos ocasionada por el metaperiodato de sodio se usa frecuentemente para determinar la importancia de estas moléculas en la antigenicidad. En este estudio se realizó un Western blot para evaluar los cambios en la antigenicidad de las GPs del cisticerco, luego del tratamiento con metaperiodato de sodio. Este tratamiento químico redujo la antigenicidad de los 5 antígenos nativos de manera variable ([Figura 1](#)). El promedio de tres experimentos indicó una reducción del 50 % en los antígenos de 12 y 24 kD, y del 70 y 67 % en la GPf 8 y GP28, respectivamente ([Tabla 1](#)). La GP16 solo se visualizó en un experimento, donde mostró una reducción del 62%. Estos datos sugirieron que los carbohidratos de cada GP

contribuyen en diferente grado ,. a la antigenicidad.



2.purificacion de GPs

Para determinar la contribución relativa de los carbohidratos tipo N en la antigenicidad de cada GP, se purificaron cada una de estas moléculas en un sistema preparativo de electroforesis SDS-PAGE bajo condiciones reducidas. La eficiencia de purificación de los antígenos de 12, 16 y 18 kD fue buena, y este proceso no alterò la antigenicidad o afinidad por lectinas de estas GPs ([Figura 2](#)). Sin embargo, la purificación de los antígenos de 24 y 28 kD no fue muy eficiente, y por ello estas moléculas no se analizaron en mas detalle en este estudio.



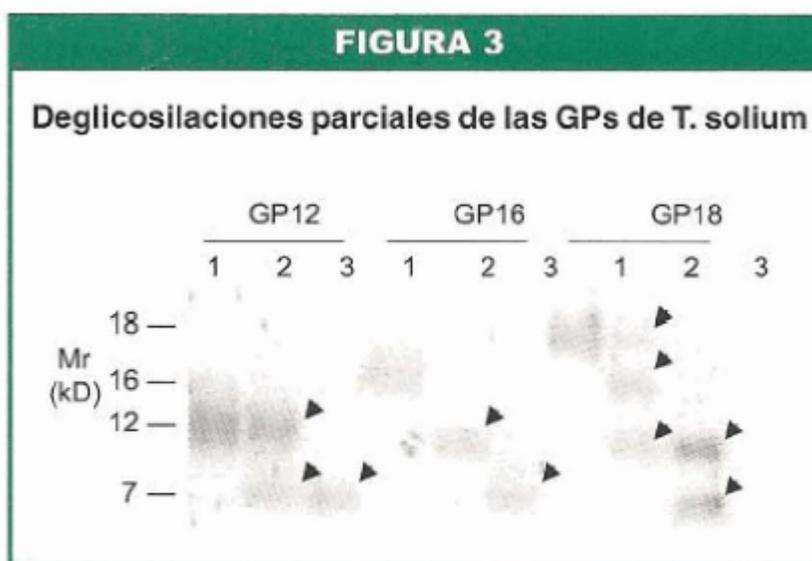
Las GPs de 12, 16 y 18 kD se purificaron en un gel preparativo de poliacrilamida (PrepCell) y luego se sometieron a deglicosilación enzimática con N-glicosidasa F. El producto deglicosilado tuvo una masa molecular aproximada de 7 kD para las 3 GPs. (A) Western blot con un pool de sueros de pacientes con NCC en las mismas muestras del panel A y (B) Tinción de plata de las proteínas nativas de 12, 16 y 18 kD en ausencia (-) o presencia (+) de glicosidasa

3. Deglicosilación en solución de las GPs

Para evaluar la contribución de los carbohidratos tipo N en la masa molecular y la antigenicidad de las GPs de 12, 16 y 18 kD, se removieron los carbohidratos tipo N con la enzima N-glicosidasa F. El análisis de los productos daglicosilados por tinción con plata indicó que las tres GPs disminuyeron su masa molecular a 7 kD (Figura 2B). Estos datos sugirieron que las tres rnoleculas tienen una porción protéica con masa rnolecular similar, pero con glicosilación tipo N de tamaño variable.

Luego se comparò la antigenicidad de las moléculas nativas, versus el producto de 7 kD obtenido de cada una. Para ello, las GPs nativas y su producto deglicosilado se sometieron a Western blot con el pool de sueros de pacientes con NCC, y se compararon y cuantificaron las intensidades de las bandas obtenidas. Los resultados indicaron que la antigenicidad de las tres GPs se redujo de manera variable ([Figura 2B](#)). Se disminuyò en aproximadamente 50% para la GP12 y GP16, y en un 93% para la GP de 18 kD ([Tabla 1](#)).

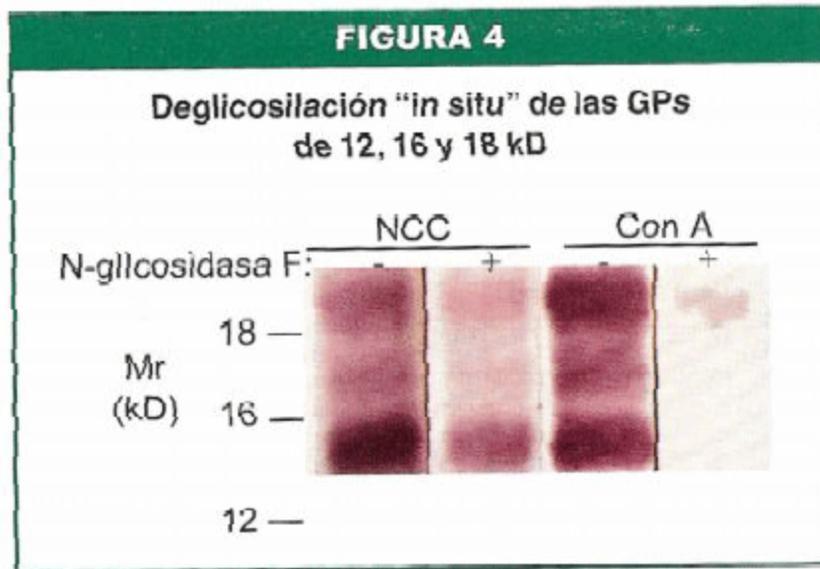
Las variaciones en el tamaño de los carbohidratos de las GP12, GP16 y GP18 podrían explicarse por variaciones en el número de oligosacáridos tipo N asociados a la porción protéica. Para examinar esto, se realizaron incubaciones con N-glicosidasa F por períodos de tiempo cortos para obtener deglicosilaciones parciales. La tinción de plata indicò que además de la presencia de la GP nativa, se observó una sola banda adicional de 7 kD resultante del antígeno nativo de 12 kD, dos bandas de 7 y 12 kD para el antígeno de 16 kD y tres bandas de 7, 12 y 16 kD para el antígeno de 18 kD ([Figura 3](#)). Estos resultados sugieren que las GPs de 12, 16 y 18 kD tienen adheridas a su porción protéica, uno, dos y tres sitios de glicosilación tipo N, respectivamente.



Las GPs de 12 (GP12), 16 (GP16) y 18 (GP18) kD fueron sometidas a deglicosilación con N-glicosidasa F por 0 (1), 30 (2) y 120 (3) minutos, y los productos fueron analizados por tinción de plata. Se observaron productos de 16, 12 y 7 kD para la GP18, de 12 y 7 para la GP16, y de 7 kD para la GP12.

4. Deglicosilación "In situ" de las GPs individuales

Las variaciones en la composición bioquímica y el tamaño de cada antígeno nativo y su versión deglicosilada, podrían afectar la eficiencia de la transferencia a la membrana de nitrocelulosa durante el Western blot. Esto alteraría la interpretación de la reducción de la antigenicidad en los productos deglicosilados. Para controlar estas posibles variables, se realizó una deglicosilación de las GPs de 12 y 18 kD después de haber sido transferidas a la membrana de nitrocelulosa. Esta deglicosilación "in situ" fue eficiente para los antígenos de 12 y 16 kD los cuales perdieron su afinidad por L, culinaris y Con A, y a su vez presentaron una disminución de su antigenicidad de 46% y 69%, respectivamente ([Tabla 1](#)). La GP de 18 kD se deglicosilò parcialmente (96%) con este procedimiento, como se evidencia con la disminuida pero persistente afinidad por las lectinas. A pesar de esto, se observó una reducción del 65% en su antigenicidad ([Figura 4](#) y [Tabla 1](#)).



Las GPs de 12, 16 y 18 kD se corrieron en un gel de agarosa y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, donde fueron puestas en la presencia de un buffer (-) o de N-glicosidasa F (+). Luego se realizó un Western blot con suero de pacientes con NCC (NCC), o un Lectin blot con Concanavalina A (Con A) biotinilada.

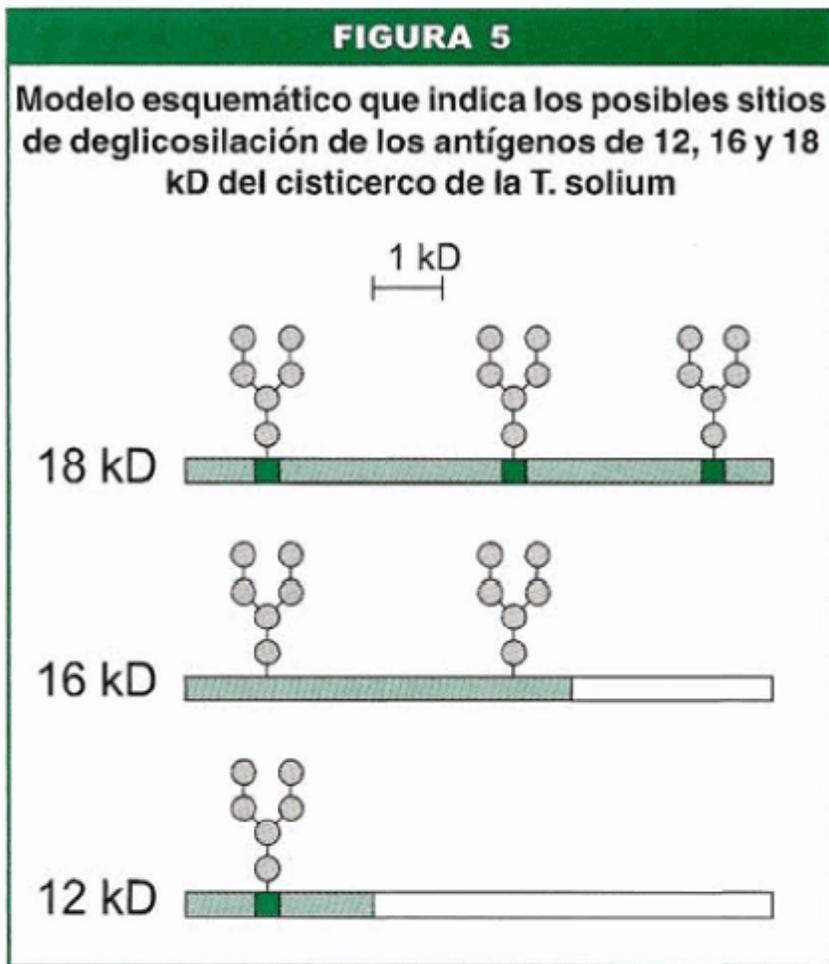
Discusión

En un estudio anterior se observó que la deglicosilación simultánea de las GPs de 12, 16, 18, 24 y 28 kD generaba solo tres bandas antigenicas de 16,5, 5 y 5 kD por Western blot (5). Estos datos sugirieron que los carbohidratos tipo N constituyen el 50% de la masa molecular de cada antígeno, y que además, estos azúcares pueden contribuir a la antigenicidad de algunas de las GPs. Sin embargo, en esta preparación que contiene varios antígenos, es imposible establecer el destino de cada molécula en cuanto a cambios de tamaño y antigenicidad. Para solucionar este interrogante, en el presente estudio se realizó un Análisis individual de los carbohidratos asociados a cada una de las GPs usando métodos químicos y enzimáticos. Se hizo mayor énfasis en los antígenos de 12, 16 y 18 kD debido a su mayor eficiencia en la purificación. Los datos sugirieron que estas tres moléculas contienen uno, dos y tres oligosacáridos tipo N, respectivamente, y que la contribución de estos carbohidratos en la antigenicidad total de cada GP es proporcional a la extensión de su glicosilación. Este análisis se complementó con la oxidación de los carbohidratos, el cual mostró que la antigenicidad de las GPs de 18 y 28 kD se redujo en más de un 60%, mientras que las de GP12 y GP24 se disminuyeron solo un 50%.

Para evaluar la importancia de los carbohidratos en la antigenicidad de las GPs, se utilizaron tres métodos. El primero fue un análisis químico que utiliza el metaperiodato de sodio para oxidar los carbohidratos. A pesar del uso rutinario de este reactivo, es importante tener en cuenta que la susceptibilidad de los carbohidratos al metaperiodato es variable, y depende de la presencia de grupos glicol vecinos, así como de la estructura, extensión, y presencia de modificaciones químicas de los carbohidratos (7). Por ello, este enfoque se complementó con la deglicosilación enzimática en solución, seguida por tinción con plata o Western blot. Con este protocolo se evaluaron los cambios en la antigenicidad y masa molecular de cada GP. Finalmente se realizó una deglicosilación "in situ" utilizando la misma enzima, para eliminar las posibles variaciones en la eficiencia de la transferencia a la membrana de nitrocelulosa entre las proteínas nativas y las deglicosiladas. Este método fue 100% efectivo en las GP de 12 y 16 kD,

lo cual se puede explicar por la unión de uno o dos oligosacaridos que probablemente quedaron expuestos a la enzima. Esto contrasta con la presencia de 3 oligosacáridos en el antígeno de 18 kD, el cual solo fue removido parcialmente por la glicosidasa. Esto puede deberse a que el sitio reconocido por la enzima no estaba fácilmente disponible.

La antigenicidad de la GP de 18 kD presento la reducción antigénica mas notoria (65%-93%) cuando los carbohidratos se alteraron o removieron por los tres métodos descritos. Esto difiere de la reducción en la antigenicidad de las GPs de 12 y 16 kD, la cual fue de solamente solo un 41%-62%. Estas diferencias se podrían explicar si se tiene en cuenta la información adicional obtenida de la deglicosilación enzimática en solución y los datos de la secuencia de aminoácidos de las GP12 y GPI 8. Estos estudios sugirieron que hay uno, dos y tres oligosacaridos tipo N asociados a los antígenos de 12, 16 y 18 kD, respectivamente ([Fig. 5](#)). Aparentemente, esta glicosilación diferencial explica la variación en la masa relativa de los tres antígenos. La secuencia de aminoácidos disponible para los antígenos de 12 y 18 kD corroboran esta información (GenBank # AF082829, AF082828, AF257776, AF350070). Estos dos antígenos tienen cadenas de aminoácidos de longitud similar que comparten un 70% de identidad. Además hay un sitio potencial de glicosilación tipo N (arginina-serina-treonina) en la posición 10-12 de los aminoácidos del antígeno de 12 kD, y tres sitios (arginina-sarina-treonina, argininaacido glutamico-treonina, y arginina-lisinatreonina) en las posiciones 10-12, 41-43 y 63-65, respectivamente, en la secuencia de 18 kD. actualmenten o se tiene disponible la secuencia del antígeno de 16 kD.



La estructura de los antígenos de 12, 16 y 18 kD (barras rectangulares) tienen una masa molecular similar de aproximadamente 7 kD y tienen uno, dos y tres oligosacáridos tipo N (círculos sombreados) respectivamente. La localización de los sitios de deglicosilación tipo N (cuadros negros) en los antígenos de 12 y 18 kD están basados en la secuencia de aminoácidos de estas proteínas, pero es únicamente una especulación para el antígeno de 16 kD porque los datos de los aminoácidos no están disponibles. La cantidad de oligosacáridos tipo N que enmascaran los epítopes en la estructura proteica elude la detección por el sistema inmune (barras con líneas transversales). En contraste, la ausencia de carbohidratos en la región carboxi-terminal en el antígeno de 12 kD (y posiblemente de 16 kD) permite el acceso libre para la detección inmune de los epítopes de aminoácidos (barras blancas). La longitud de la línea horizontal indica una masa aparente de 1 kD

Los datos anteriores apoyan la observación realizada en este estudio, la cual indica que los carbohidratos tienen un mayor impacto en la antigenicidad de la GP de 18 kD, comparada con aquellos asociados a la de 12 y 16 kD. Esto se puede explicar de la siguiente manera:

La porción proteica de la GP18 esta cubierta por tres oligosacáridos de aproximadamente 5 kD cada uno, los cuales están en las regiones amino, central y carboxiterminal de la glicoproteína madura. La distribución estratégica de estos carbohidratos logra cubrir la mayor parte de la proteína. Es así como los posibles epítopos que están debajo de los oligosacáridos no quedan expuestos al sistema inmune y por ello no se detecta una respuesta contra estos cuando la GP se deglicosila (Figura 5). En contraste, el oligosacárido del antígeno de 12 kD parece estar asociado a la estructura proteica en la región amino terminal. Esta sola ramificación no es suficiente para cubrir la porción central y carboxi-terminal de la GP. En este caso el sistema inmune podría detectar epítopos en esta porción proteica que queda "expuesta". Aunque este modelo simple explica nuestros hallazgos, es importante considerar que in vivo estas proteínas están asociadas entre sí a través de enlaces disulfuro (5, 8). En este caso, los carbohidratos no serían las únicas estructuras responsables del enmascaramiento estérico de los epítopos.

Finalmente, este modelo también debe explicar la antigenicidad reducida pero persistente del antígeno de 18 kD deglicosilado. Esto podría ser explicado por (1) la exposición y activación del sistema inmune al detectar pocos epítopos que no quedan cubiertos por los carbohidratos en la GP18 nativa, y/o (2) el reconocimiento de epítopos que presentan reacciones cruzadas entre la GP18 y otros antígenos homólogos de la *T. solium*, como la GP12.

Aunque en este estudio no se evaluó directamente la relevancia de los epítopos proteicos, es muy probable que aquel se encuentre el resto de la antigenicidad de las GPs. Esto se asume porque el producto resultante del tratamiento con N-glicosidasa F en geles de SDS-PAGE es de aproximadamente 7 kD. Este peso molecular está totalmente justificado por el peso calculado de 7.2 kD a partir de la secuencia de aminoácidos deducida de los genes de las GP12 y GP18. Sin embargo no se puede descartar la presencia de modificaciones postraduccionales de bajo peso molecular que también podrían estar contribuyendo a la antigenicidad persistente de las GP12 y GP18.

Si se asume que los carbohidratos tipo N y la estructura proteica contienen la mayoría de los epítopos antigénicos, entonces los datos del presente estudio predicen una alta probabilidad de éxito en la reproducción de los antígenos de la GP12 en sistemas de expresión recombinante. En contraste, la reproducción de la GP-18 es más incierta aun con el uso de sistemas de expresión eucariótica debido al repertorio limitado de carbohidratos que pueden ser producidos por este método. Por lo tanto va a ser necesario aclarar primero la estructura de los carbohidratos del GP18, para determinar la forma más adecuada para producirlos a gran escala.

En resumen, en este estudio se demuestra por primera vez que el cisticerco de la *T. solium* expresa una familia de GPs antigénicas con variantes en el número y tipo de glicosilaciones tipo N. La información obtenida será una guía esencial para determinar las probabilidades de éxito en la reproducción de las GP en sistemas recombinantes. Además de su importancia diagnóstica, será también importante elucidar en un futuro, la función biológica que tienen estos antígenos en la relación hospedero-parásito en la NCC.

Referencias

1. Botero D, Tanowitz HB, Weiss LM, Wittner M. Taeniasis and cysticercosis. *Infect Dis Clin North Am.* 1993;7: 683 - 697.
2. Tsang VCW, Brand JA, Boyer AE. An Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human Cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infect Dis.* 1989; 159: 50-59.
3. Ito A, Plancarta A, Ma L, et al. Novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 59: 291-294.
4. Rodriguez-Canul R, Allan J, Fletes C, et al. Comparative evaluation of purified *Taenia solium* glycoproteins and crude metacestode extracts by immunoblotting for the serodiagnosis of

human *T. solium* cysticercosis. Clin Diagn Lab Immunol. 1997 4:579-582.

5. Restrepo B, Obregón A, Mesa M, et al. Characterization of the carbohydrate components of *Taenia solium* metacestode glycoprotein antigens Int J Parasitol. 2000; 30: 689-696.

6. Woodard M, Young Jr W, Bloodgood R. Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. J Immunol Meth. 1985; 78: 143-153.

7. Shallig HD, van Leeuwen MA. Carbohydrate epitopes on contortus antigens. Parasitol Res. 1996; 82: 38-42.

8. Greene R, Wilkins P, Tsang VW. Diagnostic glycoproteins of *Taenia solium* share homologous 14 and 18 kD subunits. Mol Biochem Parasitol .1999; 99 fdf 8857-261.

© 2011 *Asociación Colombiana de Infectología.*

Calle 118 No. 15-24 Oficina 503, Bogotá, D. C., Colombia
Teléfono 215 3714 y 215 3517


acin@etb.net.co