



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“BÚSQUEDA DE RECEPTORES A GLUTAMATO EN EL  
CISTICERCO”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

**DIANA YURIDIA ORGANISTA JUÁREZ**

DIRECTOR DE TESIS: Dr. ALFONSO BERNABÉ CARREÑO

CODIRECTOR DE TESIS: Dr. ARTURO ORTEGA SOTO

CHILPANCINGO, GRO., AGOSTO DE 2008.

## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIAL Y MÉTODOS	7
RESULTADOS	10
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	19
REFERENCIAS	23



## RESUMEN

La cisticercosis es causada por la larva de *T. solium* en tejidos y órganos, representa un problema de salud pública, y es considerada una enfermedad endémica en América latina, Asia y África con repercusiones socioeconómicas, la infección más severa en el humano es cuando el cisticerco migra al sistema nervioso central (SNC) produciendo Neurocisticercosis, desarrollando cuadros epilépticos, convulsiones y presión intracraneal, que podrían alterar la homeostasis del glutamato, el cual es el principal neurotransmisor excitador en el SNC. Por lo tanto el principal objetivo de este trabajo fue analizar la presencia de receptores a glutamato en el cisticerco. Se realizó un análisis por inmunodetección en fase sólida para receptores a glutamato de tipo AMPA y metabotrópicos mGluR1, utilizando como modelo de estudio al cisticerco, Se detectaron proteínas de diferente peso molecular relacionadas con las subunidades de iGluR1 (106 kDa) e iGluR4 (108 kDa) para receptores AMPA y una proteína de 66 kDa para mGluR1 en extractos proteicos de cisticercos de músculo esquelético y cerebro, estos resultados sugieren que el cisticerco expresa proteínas relacionadas antígenicamente con receptores glutamatérgicos, permitiendo una alternativa para entender el tropismo que tiene el cisticerco hacia el SNC.

**Palabras clave:** cisticercosis, neurocisticercosis, receptores glutamatérgicos.

**Abstract**

Human cysticercosis is caused by *Taenia solium* larvae that infects tissues and organs becoming an important health problem among several undeveloped countries. The presence of *T. Solium* in central nervous system (CNS) is called neurocysticercosis, epileptic events, seizures and an increment of intracranial pressure are common symptoms of this disease. Glutamate, the mayor neurotransmitter in SNC takes part in these events suggesting a complex mechanism between parasite and the host, for this reason the main goal of this work is to identified the presence of glutamate receptors in muscle and brain cysticercos. Using specific antibodies against iGluR1, iGluR4 and mGluR1 we identified immnoreactive bands between 106 kDa y 108kDa corresponding to iGluR1 and iGluR4 respectably, and other band at 66 kDa corresponding to mGluR1. These results show that *T. solium* expresses proteins related with glutamate receptors, and the expression of these receptors could explain tropism of cysticercus for CNS.

**Keywords:** cysticercosis, neurocysticercosis, glutamate receptors

## INTRODUCCIÓN

La Teniosis y la cisticercosis son enfermedades muy importantes en el humano causados por el céstodo *Taenia solium*. La teniosis es originada por el parásito adulto, mientras la cisticercosis es causada por el estadio larval o metacéstodo de *T. solium*, al alojarse en el sistema muscular y diversos órganos<sup>[1]</sup>.

Dentro del ciclo biológico del parásito, tanto en el cerdo como en el hombre, es necesario la ingestión de huevos de *Taenia solium*, ya sea en alimentos y agua contaminada o por una auto infección. El huevo al llegar al duodeno, por acción de los jugos digestivos el embrióforo se desintegra de 24-72 horas; la oncósfera o embrión hexacanto, ya liberado del huevo, es ayudado por sus ganchos y acción lítica de las enzimas que secreta; penetra la mucosa intestinal hasta alcanzar los vasos mesentéricos, donde es arrastrado por el torrente sanguíneo a cualquier órgano o tejido, quedando “atorado” en los capilares de luz más estrecha; hasta que: a los 60 a 70 días la larva o “cisticerco” está completamente desarrollado<sup>[2]</sup>. El cisticerco tiene preferencia por el sistema nervioso central (SNC), produciendo la infección helmíntica más frecuente, conocida como neurocisticercosis, la cual se asocia a sintomatologías muy diversas como convulsiones y cuadros epilépticos (50–65%), seguidas de cefalea (40%) e hipertensión intracraneal<sup>[1, 3-5]</sup>, alterando de esta manera la homeostasis del glutamato, el cual es el neurotransmisor que permite la mayoría de la señalización excitadora en el SNC y juega un papel muy importante en la comunicación y desarrollo neuronal, en su fisiología normal y en la plasticidad sináptica<sup>[6]</sup>. Los receptores a glutamato se expresan principalmente en el SNC y se dividen en dos categorías funcionales distintas: receptores ionotrópicos (iGluRs) con canales iónicos dependientes de ligando y receptores metabotrópicos (mGluRs) acoplados a proteínas G. En los primeros, la unión de glutamato al receptor resulta en un cambio conformacional que permite el paso de cationes de sodio o calcio a través de un poro. Los receptores metabotrópicos no son permeables a iones, al contrario, estos receptores están acoplados por medio de proteínas G a la producción de segundos mensajeros intracelulares, los cuales pueden regular actividades como la transcripción de genes y la fosforilación de canales iónicos dependientes de voltaje o dependientes de ligando acoplados a proteínas G<sup>[7, 8]</sup>.

Los iGluRs se han dividido farmacológicamente en tres grupos principales, en base a su selectividad a agonistas y en su biología molecular: 1) Receptores Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA); 2) Receptores Kainato (KA); y 3) Receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). Las subunidades de los receptores son codificadas por una familia de al menos seis genes, definidas por su homología de secuencia: una familia para los receptores AMPA, dos para los receptores Kainato y tres para los receptores NMDA. La similitud en la secuencia y, en algunos casos, la homología en la estructura intrón-exón, sugieren un origen evolutivo común para los genes de los receptores ionotrópicos a glutamato<sup>[8]</sup>. Los receptores metabotrópicos a glutamato comprenden una familia heterogénea de receptores que están vinculados a varias vías de señalización mediante proteínas G. Regulan la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal a través de la activación o inhibición de varios sistemas efectores acoplados a proteínas G. Por esta razón, los efectos de la activación de esta clase de receptores son considerablemente más lentos al inicio y su temporalidad de acción es mayor, por lo cual pueden modular la actividad neuronal a través de un período de tiempo mayor. La estructura de estos receptores es la típica de los receptores acoplados a proteínas G y consta de siete dominios transmembranales, separados por pequeñas asas intra y extracelulares<sup>[9]</sup>.

Los receptores metabotrópicos son codificados por una familia de genes de ocho miembros; una mayor diversidad es generada por corte y empalme alternativo del dominio C-terminal del RNAm del receptor. Por su homología de secuencia, selectividad a agonistas, mecanismos de señalización intracelular y diferentes blancos neuronales, los receptores metabotrópicos a glutamato (mGluRs) pueden ser divididos en tres grupos o clases: Grupo I (mGluR1 y mGluR5); Grupo II (mGluR2 y mGluR3); y Grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8)<sup>[10, 11]</sup>.

Los mGluRs del Grupo I se acoplan a diversas vías de transducción de señales, pudiendo estar acoplados positivamente a fosfolipasa C; su activación conduce a la estimulación de la superfamilia de proteínas cinasa C (PKC) y a la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular o a la estimulación de adenilato ciclasa, cuya activación estimula la formación de adenosín monofosfato cíclico (AMPC)<sup>[12]</sup>.

Los receptores mGluR de los Grupos II y III están negativamente acoplados a adenilato ciclasa, resultando en una menor producción de AMPc y en una menor liberación de glutamato, considerándose por esto neuroprotectivos. Los subtipos individuales de los mGluRs que participan en distintas acciones facilitadoras (Grupo I) o inhibitoras (Grupos II y III) actúan en la transmisión neuronal<sup>[10, 13]</sup>.

La recaptación de glutamato se lleva a cabo por varios transportadores dependientes de sodio, de alta afinidad por glutamato. Tal recaptación, juega un papel muy importante para la terminación de la actividad excitadora del glutamato sináptico liberado; una señalización de glutamato aberrante, especialmente cambios en la homeostasis de glutamato, está involucrado en desordenes neurológicos que incluyen epilepsias, isquemia, daño cerebral, y desórdenes neurodegenerativos, como las enfermedades de Parkinson, Alzheimer, Huntington y esclerosis lateral amiotrófica<sup>[6, 14, 15]</sup>.

Varios estudios sugieren que el glutamato es un neurotransmisor en helmintos. La presencia y utilización de glutamato se encuentra altamente conservada entre especies, por lo que el glutamato está presente no sólo en SNC de mamíferos, sino también en invertebrados inferiores, como los nemátodos<sup>[7]</sup>. Aunque los helmintos y nemátodos son filogenéticamente diferentes de los platelmintos, se caracterizan por un sistema nervioso anatómicamente menos complejo y mejor caracterizado que en platelmintos<sup>[16]</sup>. Algunos aspectos de la neurotransmisión glutamatérgica están bien descritos en *C. elegans*, estudios en este modelo han mostrado que los componentes moleculares de la sinapsis glutamatérgica son altamente conservados entre *C. elegans* y mamíferos; esto incluye el sistema de transporte vesicular de glutamato (vGLuTs), del cual tres familias son descritas en su genoma y uno de ellos, eat-4, ha sido bien caracterizado. Asimismo, los receptores postsinápticos a glutamato, han sido localizados en todas las neuronas de *C. elegans* y, por lo tanto, la descripción de la sinapsis glutamatérgica en este sistema.<sup>[17]</sup>

Para el sistema nervioso de *C. elegans*, se describen 10 genes que son similares a las secuencias de las subunidades de los receptores a glutamato de mamíferos (GLR-1 a GLR-8; RMN-1 y RMN-2) y son en su mayoría expresados en



interneuronas y neuronas motoras; se encuentran involucrados en el control del movimiento, termotaxis y función de la faringe. Al comparar las secuencias encontraron estrecha relación con subunidades de los receptores a glutamato de tipo AMPA y se mostró la expresión de GLR4 y GLR5; también se ha caracterizado la regulación de la expresión de receptores <sup>[18, 19]</sup>.

El objetivo fue identificar la presencia de receptores a glutamato en el estadio larvario de *Taenia solium* o cisticerco, por la relevancia y prevalencia de la neurocisticercosis en países subdesarrollados. Actualmente no existe información sobre el sistema nervioso del cisticerco, por lo que utilizamos el modelo de *C. elegans* como base de nuestra investigación. Este modelo presenta la ventaja de que tiene un genoma completamente secuenciado, en el que es factible establecer procesos conservados y, de esta manera, hacer un acercamiento en la biología molecular del cisticerco. Así, el mecanismo por el cual estos receptores se activan o el papel que ejercen dentro del metabolismo, es tema de intenso estudio.

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **Quistes de *T. solium*.**

Los cisticercos de *Taenia solium* fueron extraídos de diversos tejidos de un cerdo infectado: músculo esquelético, lengua, cerebro, carrillos y costilla, evitando tomar porciones de tejido; los quistes se colocaron en recipientes previamente etiquetados, conteniendo solución salina de fosfatos (PBS, pH 7.2). Una vez extraídos los cisticercos se lavaron exhaustivamente y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

### **Extracción de proteínas del cisticerco.**

Un gramo de cisticercos de localización corporal de músculo esquelético y cerebro, se congelaron en nitrógeno líquido; y se maceraron en un mortero previamente esterilizado para extraer proteínas totales, utilizando 3 ml de solución de lisis con inhibidores de proteasas (10 mM PMSF, 10 mM IA, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM NaF, 10 mM NEM, 10 mM Tris-HCl pH 7.4), en la cual se resuspendió, y posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm, 5 min, a 4°C, recuperando la fracción soluble en un tubo. La fracción membranal (precipitado), se resuspendió con 0.4 ml de solución con inhibidores de proteasas y detergentes (0.2% SDS y 2% Tritón X100), en agitación constante, en frío, durante 1 h, para solubilizar las proteínas; posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm para separar la segunda fracción soluble y la fracción membranal correspondiente.

### **Determinación de proteínas.**

Las proteínas del extracto total, fracción soluble y membranal, fueron cuantificadas por el método de Bradford (Biorad). Para el cual se preparó una curva creciente de proteína estándar (1 µg/ µl) de gamma globulina en concentración de 1, 2, 3, 6 y 12 µg, obteniendo una tendencia de regresión lineal de 0.999, en base a esta tendencia se procede a realizar la cuantificación de las muestras con, 1 µl de muestra más 19 µl de agua destilada y 180 µl de reactivo de Bradford 1X, con un 100% de confiabilidad.

### **Análisis de proteínas por inmunodetección en fase sólida.**

Los tres extractos obtenidos utilizados para la inmunodetección en fase sólida. Fueron diluidos en proporción 1:3 con solución amortiguadora de muestra (Tris-HCl 150 mM pH 6.8,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%, glicerol 30%, SDS 5%, azul de bromofenol 0.03%) y posteriormente calentados a 95°C, por 10 min; se agitaron 1 min en vórtex. Posteriormente la muestra se sometió a vórtex con intervalos de 1 min en frío. Los extractos así preparados fueron analizados en curvas crecientes en concentración de proteínas en geles de poliacrilamida al 8%, a 100 V, 1 h; al finalizar este tiempo los geles fueron teñidos con plata, la cual tiene mayor sensibilidad, con la finalidad de comprobar que las proteínas del cisticerco no se encontraran degradadas.

### **Identificación de receptores ionotrópicos y metabotrópicos a glutamato en proteínas del cisticerco.**

Las proteínas de los diferentes extractos se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (NTC) durante 3 h, a 160 A, en frío, usando solución amortiguadora de transferencia; transcurrido este tiempo las membranas de NTC se tiñeron con rojo de Ponceau, para comprobar la efectividad de la transferencia y se destiñeron con PBS pH 7.4 (10 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , 150 mM NaCl), posteriormente la membrana de NTC, fue bloqueada con TBS-leche semidescremada (6%) y 0.1% Tween-20 durante 2 h, realizando lavados con TBS y 0.1% de Tween-20 para eliminar el exceso de solución de bloqueo, La membrana se incubo toda la noche a 4°C, con el anticuerpo primario, anticuerpo policlonal de cabra (anti- iGluR1 (sc-7609), anti- iGluR4 (sc-31394), anti-mGluR1 (sc-19484) Santa Cruz Biotechnology <sup>MR</sup> cada uno respectivamente con su membrana), en dilución 1:1000, en PBS con 0.25% albúmina de suero bovino, 0.1% Tween-20 y 0.1% de timerozal. Posterior a la incubación de la membrana con el anticuerpo primario, se realizaron seis lavados en TBS y 0.1% de Tween-20; luego el anticuerpo secundario anti-IgG de cabra, conjugado a peroxidasa de rábano (ZYMED <sup>MR</sup>), fue incubado sobre la membrana en dilución 1:2000 por 1 h a temperatura ambiente, seguido por seis lavados en TBS y 0.1% tween-20 frío. La membrana tratada así, fue expuesta a placas radiográficas previo tratamiento con reactivos de quimioluminiscencia (ECL (Amersham Pharmacia Biotech)).

## **Remoción de anticuerpos de las de membranas.**

Las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas con solución para remover anticuerpos (Glicina 0.1M, pH 2.3) por 1 h a temperatura ambiente en agitación constante y lavadas tres veces con PBS pH 7.4 (10 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , 150 mM NaCl) posteriormente se le dieron tres lavados con TBS y 0.1% tween-20, se bloqueó 1 h en TBS con 6% de leche descremada y 0.1% tween-20. La membrana fue incubada toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario policlonal de cabra (anti-GluR1 (sc-7609), anti-GluR4 (sc-31394), anti-mGluR1 (sc-19484) Santa Cruz Biotechnology<sup>MR</sup> en dilución 1:1000 en TBS, 0.25% albúmina de suero bovino, 0.1% Tween-20, 0.1% timerozal, seguido por seis lavados en TBS y 0.1% Tween-20; el anticuerpo secundario anti-IgG de cabra, conjugado a peroxidasa de rábano (ZYMED<sup>MR</sup>), fue incubado sobre la membrana en dilución 1:2000, por 1 h a temperatura ambiente seguido por seis lavados de TBS y 0.1% Tween-20 frío; se reveló con reactivos de quimioluminiscencia (ECL (Amersham Pharmacia Biotech)).

## **Inmunoprecipitación de receptores a glutamato en el cisticerco**

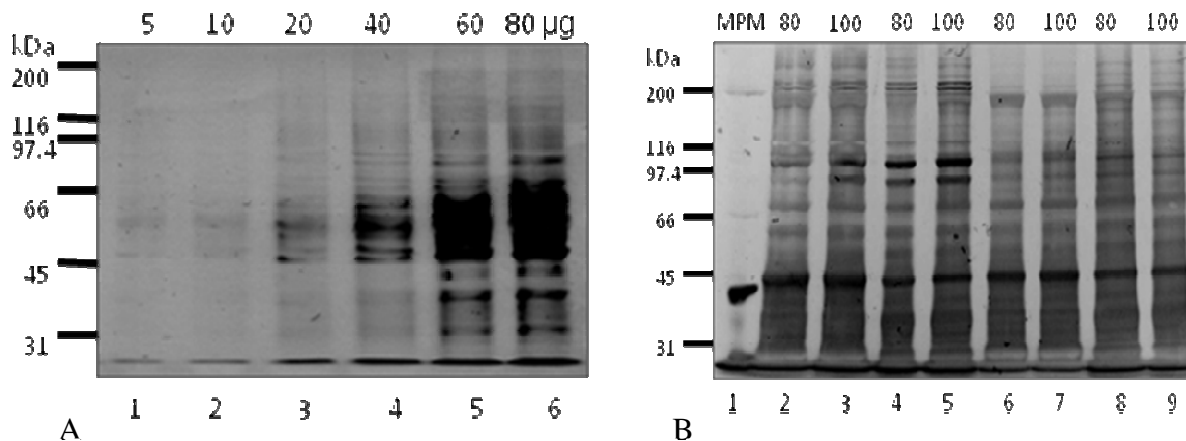
Para cada condición de inmunoprecipitación se prepararon 3  $\mu$ l de perlas de proteína A agarosa (invitrogen), 1  $\mu$ l de anti-GluR1, posteriormente se aforó a 10  $\mu$ l con solución de PBS 1X estéril, conteniendo inhibidores de proteasas (aprotinina y leupeptina, de Roche Molecular Biochemicals (Indianápolis, IN)), se agitó 1 h en frío y se le colocó 1 mg de proteínas del control positivo, 1 mg de cisticerco de músculo y 1 mg cisticerco de cerebro, para cada condición; se solubilizó toda la noche en agitación en frío y posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 10 min, a 4°C; se recuperó el sobrenadante, se realizaron dos lavados a la pastilla con RIPA 2X (100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.5, 20 mM NaI, 1 mM  $Na_3VO_4$ , 20 mM de molibdato), 1% Tritón X100, 10mM PMSF, se centrifugo y se realizaron nuevamente dos lavados con RIPA 2X (100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.5, 20 mM NaI, 1 mM  $Na_3VO_4$ , 20 mM de molibdato), se resuspendió en 10  $\mu$ l de buffer de muestra y se procedió a preparar las muestras para inmunodetección en fase sólida para la formación de complejos con GluR4.

## RESULTADOS

Para desarrollar el conocimiento respecto a la fisiología molecular del cisticerco, en relación al inicio de un sistema de señalización glutamatérgico del metacéstodo de *T. solium*, se realizaron ensayos de inmunodetección en fase sólida con la utilización de anticuerpos anti-receptores ionotrópicos de tipo AMPA (anti-GluR1 y anti-GluR4) y anti-receptores metabotrópicos del grupo I (anti-mGluR1) en proteínas de cisticerco de localización muscular y de cerebro, con la finalidad de determinar, si la localización corporal del cisticerco en el hospedero influye en la expresión de los receptores glutamatérgicos.

### PERFIL DE PROTEÍNAS DEL EXTRACTO TOTAL Y DE LA FRACCIÓN SOLUBLE.

Como paso inicial se realizó la extracción, cuantificación por el método de Bradford y separación de proteínas en SDS-PAGE al 8%, teñidos con nitrato de plata, Como se aprecia en estos geles se utilizaron únicamente proteínas obtenidas de la fracción soluble y totales, ya que en estas se logró obtener concentraciones óptimas para cargar los geles SDS-PAGE. Se utilizaron proteínas de cerebro de rata de 8 días, como control positivo en la figura 1A se muestra la integridad de las proteínas en curva en concentración de 5 a 80  $\mu\text{g}$  de proteína, en la cual se observa que a mayor concentración de proteínas hay una saturación muy notoria, y por lo tanto la concentración adecuada para la identificación de los receptores a glutamato es de 40  $\mu\text{g}$ , ya que se logra visualizar la separación de las diferentes proteínas del control; en la figura 1B, se muestran proteínas totales y fracción soluble de cisticerco procedentes de músculo y cerebro, 80 y 100  $\mu\text{g}$  de proteínas respectivamente, se observa la separación de las proteínas de manera muy definida para ambas concentraciones observando, proteínas prominentes con pesos moleculares de 200, 97.4, 66 y 45 kDa., encontrando el mismo perfil para ambas localizaciones. Una vez obtenido el perfil protéico, libre de degradación, se inició la búsqueda de receptores a glutamato por inmunodetección en fase sólida (figuras 2A y 2B), comenzando con la utilización de anticuerpos anti-receptores ionotrópicos de tipo AMPA.



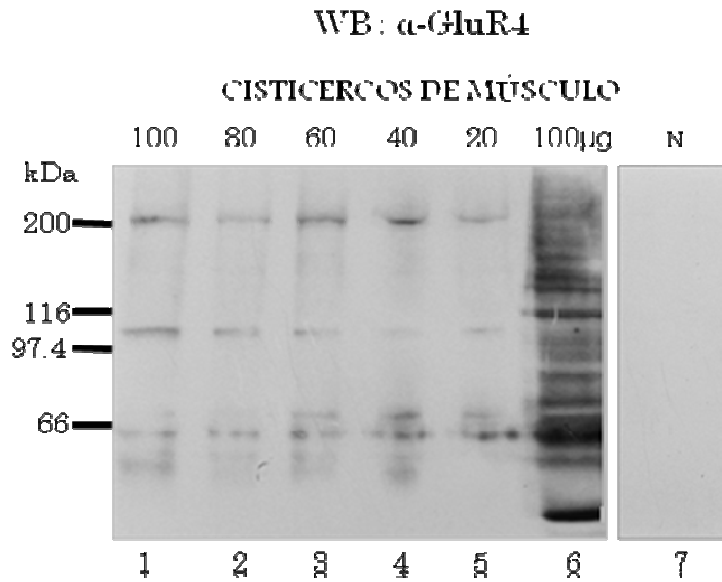
**Figura 1 A y B. Integridad y concentración de proteínas en cerebro de rata y en cisticercos.**

A. SDS-PAGE al 8 % de proteínas de cerebro de rata, teñido con plata. Se esquematiza la posición del marcador de peso molecular (MPM); carriles 1 al 6, curva creciente en concentración de proteínas totales de cerebro de rata.

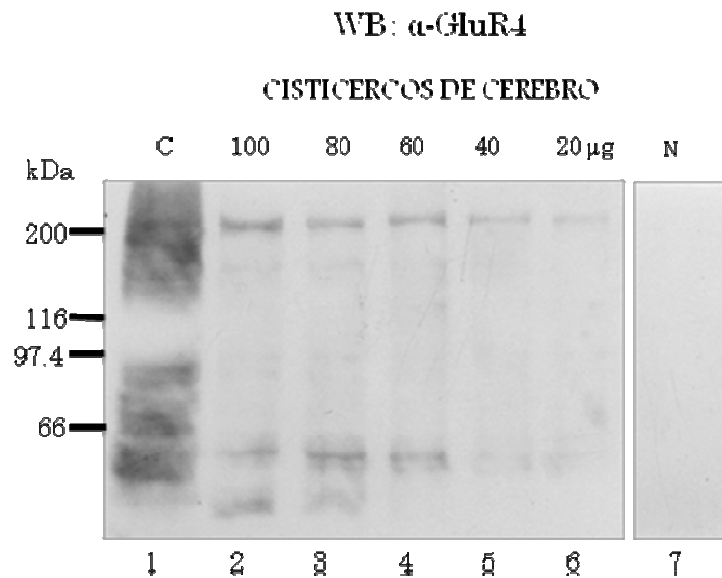
B. Perfil proteico de cisticercos. SDS-PAGE al 8%, teñido con plata. Carril 1, MPM; carriles 2 y 3, proteínas extraídas de cisticercos procedentes de cerebro (fracción soluble); carriles 4 y 5, proteínas extraídas de cisticercos de músculo (fracción soluble); carriles 6 y 7, proteínas extraídas de cisticercos procedentes de cerebro (extracto total); carriles 8 y 9, proteínas de cisticercos obtenidos de músculo (extracto total), 80 y 100 µg de proteínas, respectivamente.

## INMUNODETECCIÓN EN FASE SÓLIDA DE RECEPTORES A GLUTAMATO IONOTRÓPICOS DE TIPO AMPA Y METABOTRÓPICOS EN PROTEÍNAS DE CISTICERCO.

Se realizó la inmunodetección de receptores a glutamato de tipo AMPA (utilizando anticuerpos  $\alpha$ -GluR1, y  $\alpha$ -GluR4) en proteínas de cisticerco de localización muscular y de cerebro. Con la finalidad de establecer la concentración más apropiada para la identificación de los receptores a glutamato en las figuras 2A y 2B se muestra la inmunodetección en fase sólida para GluR4 (dilución 1:1000), con proteínas de cisticerco extraído de músculo y de cerebro de cerdo, respectivamente, en una curva en concentración. Se detectaron bandas de diferente peso molecular, entre ellas una de 200 kDa, otra de aproximadamente 108 kDa, con un peso molecular muy similar al reportado en mamíferos para el receptor GluR4 y, una tercera banda de 66 kDa. Cabe mencionar que las bandas detectadas por quimioluminiscencia fueron las mismas para ambos perfiles protéicos de cisticerco, es decir de músculo y de cerebro.

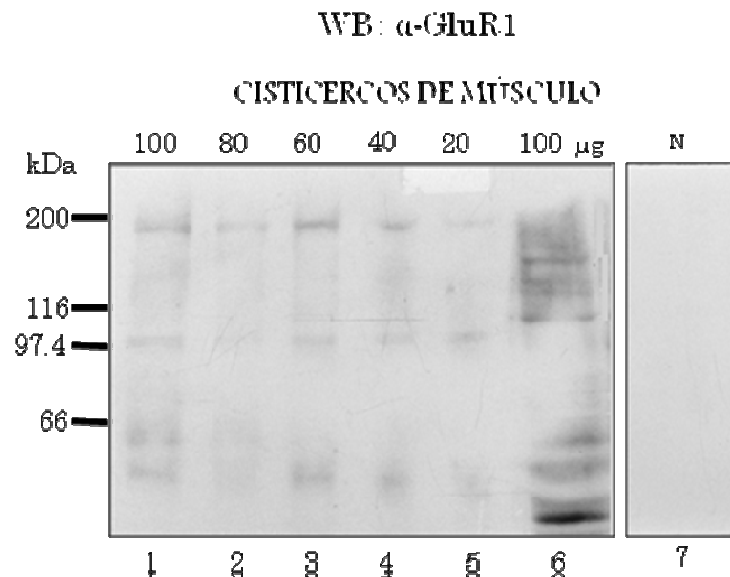


**Figura 2 A. Inmunodetección de GluR4 en cisticercos de músculo esquelético.** La inmunodetección en fase sólida se llevó a cabo utilizando un anticuerpo anti-GluR4. Se esquematiza la posición del MPM; carriles 1 al 5, curva de concentración de proteínas para GluR4; carril 6, proteínas de cerebro de rata como control positivo; carril 7, proteínas de cisticercos de músculo inmunodetectadas con anticuerpo secundario anti-IgG de cabra, como control negativo.



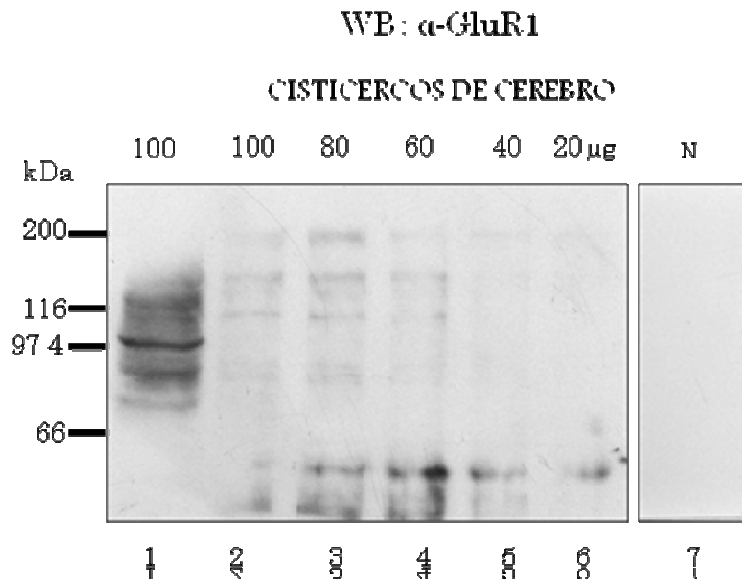
**Figura 2 B. Inmunodetección de GluR4 en cisticercos de cerebro.** La inmunodetección en fase sólida se llevó a cabo utilizando un anticuerpo anti-GluR4; se esquematiza la posición del MPM. Carril 1, control positivo de proteínas de cerebro de rata (c); carriles 2-6 curva de concentración de proteínas de cisticerco; carril 7, proteínas de cisticerco de cerebro inmunodetectadas con anticuerpo secundario anti-IgG de cabra, como control negativo.

Una vez identificada la presencia de bandas con peso molecular similar a la subunidad GluR4, se decidió buscar la subunidad GluR1 (figuras 3A y 3B), para lo cual se realizó la inmunodetección en fase sólida de las fracciones soluble y total de proteínas de cisticercos, incubando con anticuerpos  $\alpha$ -GluR1 (dilución 1:1000). Se identificaron tres proteínas de diferente peso molecular: una de 200 kDa, otra antigénicamente similar a GluR1, que en mamíferos es de 106 kDa y la tercera de 66 kDa, coincidiendo con el perfil proteico para GluR4 en proteínas de cisticercos de ambas localizaciones.



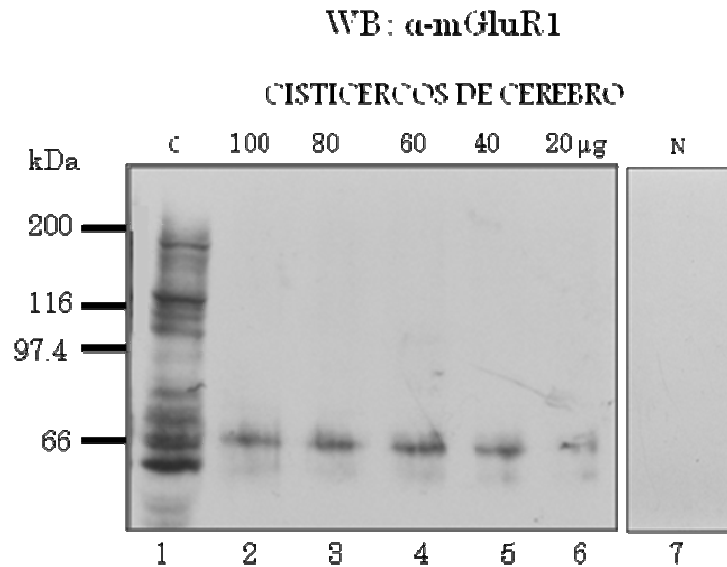
**Figura 3 A. Inmunodetección de GluR1 en cisticercos de músculo esquelético.** La inmunodetección en fase sólida se realizó mediante un anticuerpo anti-GluR1. Se esquematiza la posición del MPM. Carriles 1–5, curva de concentración de proteínas de cisticerco; carril 6, control positivo de proteínas de cerebro de rata, 100  $\mu$ g; carril 7, proteínas de cisticerco de músculo inmunodetectadas con un anticuerpo secundario anti-IgG de cabra, como control negativo.



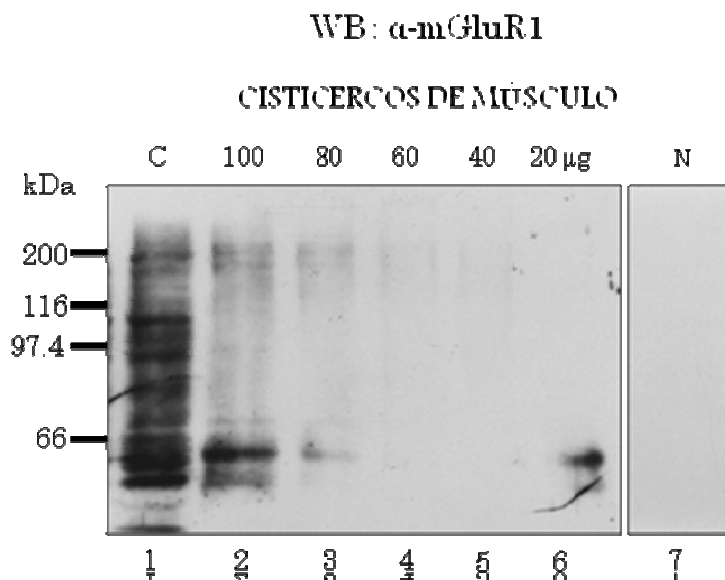


**Figura 3 B. Inmunodetección de GluR1 en cisticercos de cerebro.** La inmunodetección en fase sólida se realizó mediante un anticuerpo anti-GluR1. Se esquematiza La posición del MPM. Carril1, control positivo de proteínas de cerebro de rata, 100  $\mu$ g; carriles 2-6, curva de concentración de proteínas de cisticerco; carril 7, proteínas de cisticerco de cerebro inmunodetectadas con un anticuerpo secundario anti-IgG de cabra, como control negativo.

Dentro de la gran familia de receptores a glutamato se encuentran los receptores metabotrópicos (mGluRs), los cuales ejercen su efecto a través de la activación de segundos mensajeros, por activación de proteínas que unen GTP (proteínas G) y regulan la producción de diferentes segundos mensajeros intracelulares, tales como IP<sub>3</sub>, cAMP o cGMP. En este proyecto sólo se trabajó con la subunidad mGluR1 para tener un indicio de la expresión de este tipo de receptores en el cisticerco. En la figura 4A se muestra el resultado de la inmunodetección en fase sólida para mGluR1, en una curva de concentración de proteínas de cisticercos extraídos de cerebro, detectando una sola banda con un peso molecular de 66 kDa, muy distante al reportado para los receptores mGluR1 de mamíferos (145 kDa). En la figura 4B se muestra el resultado de la inmunodetección de mGluR1, ahora en proteínas de cisticerco extraídas de músculo, en el cual se identifica a la misma proteína de 66 kDa y una banda adicional de 200 kDa, que pudiese ser mGluR1 o una forma multimérica de la banda de 66 kDa.

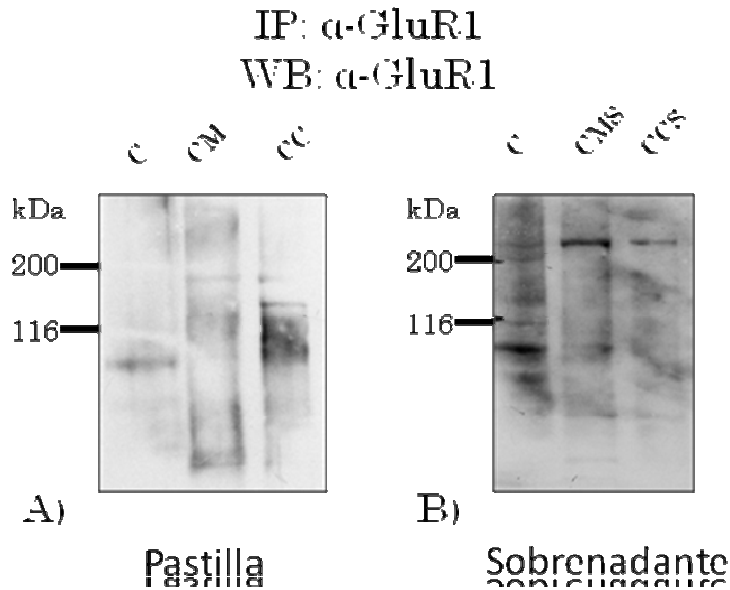


**Figura 4 A. Inmunodetección en fase sólida de mGluR1 en cisticercos de cerebro.** Se muestra el MPM; carril 1, extracto total, como control positivo (C); carriles 2-6, curva de concentración de proteínas de cisticerco; carril 7, proteínas de cisticerco inmunodetectadas con un anticuerpo secundario anti-IgG de cabra, como control negativo.



**Figura 4 B. Inmunodetección en fase sólida de mGluR1 en cisticercos de músculo.** Se muestra el MPM, carril 1: control positivo (C), carriles 2 - 6 curva en concentración de proteínas del cisticerco procedente de músculo de 100 a 20  $\mu$ g, carril 7, proteínas de cisticerco de músculo incubado con anticuerpo secundario anti-IgG de cabra como control negativo

Con los resultados anteriores, aún cuando se logra la identificación de proteínas antigénicamente relacionadas con receptores a glutamato en mamífero, en particular receptores ionotrópicos, de tipo AMPA (GluR1 y GluR4) y de proteínas de bajo peso molecular (66 kDa) para la identificación del receptor mGluR1, con la finalidad de concentrar la proteína y limpiar el sistema, se decidió hacer una inmunoprecipitación del receptor ionotrópico GluR1, (figura 5), para la identificación de la banda antigénicamente similar a GluR1 reportado en mamíferos y con esto tener la certeza de que la identificación de estas bandas corresponde genuinamente a receptores a glutamato en el cisticerco. Como se puede observar en la figura 5, panel A, en el inmunoprecipitado se logra la identificación de GluR1 en el control positivo, con un peso molecular de 97 kDa, muy similar al esperado para estos receptores en mamíferos. Con este resultado se despeja la posible duda que pudiera quedar de las figuras 2 a 4, en las cuales la detección del control positivo no es clara, ya que la reacción antígeno anticuerpo es muy intensa para todas las proteínas presentes en el perfil proteico de cerebro de rata. Para el caso de la inmunoprecipitación de GluR1 en proteínas de cisticerco extraído de músculo, no se tuvo el éxito esperado, detectando únicamente una proteína de 200 kDa, mientras que en proteínas de cisticerco extraídas de cerebro se detectaron dos proteínas, una de 130 y otra de 200 kDa. En la figura 5, panel B, se muestra el inmunoprecipitado de la fracción soluble; se observa el mismo comportamiento en ambos perfiles (comparar los paneles A y B) para proteínas de cisticerco de músculo y cerebro, identificando proteínas con un peso molecular arriba de los 200 kDa. En proteínas de cisticercos de músculo, carriles 2 y 3, panel B; carriles 1 y 2 se identifica la presencia de proteínas con un peso molecular aproximado de 97 kDa.



**Figura 5 A y B. Inmunoprecipitación de GluR1.** En A, se observan proteínas obtenidas de la pastilla del inmunoprecipitado. Se muestra el MPM. Carril 1, control positivo proteínas de cerebro de rata (C); carril 2, proteínas de cisticercos de músculo; carril 3, proteínas de cisticercos extraído de cerebro. En B, se observan proteínas obtenidas del sobrenadante del inmunoprecipitado. Se esquematiza el MPM. Carril 1, control positivo proteínas de cerebro de rata (C); carril 2, proteínas de cisticercos de músculo; carril 3, proteínas de cisticercos extraídos de cerebro.

Contrario a la muestra de cerebro, la identificación de GluR1 no se logra de manera exitosa para proteínas de cisticercos de músculo. Por lo tanto, se buscó la formación de complejos en estructuras hetero-oligoméricas, en este caso la interacción entre GluR1 y GluR4 (figura 6). Se realizó la inmunodetección de los complejos en proteínas de cerebro de rata, como control positivo; al igual que en la figura 5, se puede observar la inmunoprecipitación de una proteína con un peso molecular de 97.4 kDa, la que corresponde a la homóloga de GluR1 (106 kDa) en mamíferos o a GluR4 (108 kDa). En el inmunoprecipitado de las proteínas de cisticercos de músculo se empleó un anticuerpo anti-GluR1 y este a su vez fue reconocido por anti-GluR4, con lo que se demostró la interacción de GluR1 con GluR4, observada a través de una banda con peso molecular de 106 kDa. Lo anterior sugiere que existe una relación estructural conservada entre las proteínas que codifican para receptores a glutamato en mamíferos como en invertebrados, en este caso, cisticercos extraídos de cerebro.



## DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Poco se conoce sobre el sistema metabólico y nervioso del cisticerco. En el presente trabajo se realizó un análisis para receptores ionotrópicos a glutamato, de tipo AMPA, y metabotrópicos, de tipo mGluR1, utilizando como modelo de estudio al metacéstodo de *Taenia solium* (cisticerco), con la finalidad de poder descifrar un poco del amplio sistema nervioso de este parásito y de su interrelación con sus hospederos.

El enfoque experimental utilizado fue analizar por Western blot la expresión de las subunidades GluR1 y GluR4 de los receptores AMPA en proteínas de cisticercos localizados en músculo y cerebro, con la finalidad de poder determinar si la expresión de los receptores está relacionada con la localización corporal del cisticerco en el hospedero; estas subunidades de receptores a glutamato han sido ampliamente reportadas en invertebrados<sup>[16]</sup>. En este trabajo reportamos la identificación de las subunidades GluR1 y GluR4 en ambos perfiles protéicos de cisticerco, detectando 4 bandas antigénicas de diferente peso molecular: 200 y 106 kDa, para GluR1, y 108 kDa para GluR4, así como una banda de 66 kDa. En los receptores de mamíferos, las bandas homólogas corresponderían a 106 kDa para GluR1 y 108 kDa para GluR4; las bandas restantes pueden ser agregados protéicos, ya que se observaron de forma constante en la inmunodetección de ambos receptores.

Los receptores a glutamato presentan secuencias evolutivamente conservadas. En el reporte de Romola Davenport (2002), en el que describe la presencia de receptores a glutamato en plantas, se sugiere la presencia de modificaciones postraduccionales, además de diferencias en cuanto a la cantidad de dominios transmembranales, sugiriendo que los receptores a glutamato de tipo ionotrópico y metabotrópico proceden de un receptor ancestral a glutamato<sup>[20]</sup>. Esto explicaría la diferencia en peso molecular de las bandas inmunorreactivas, en extractos de cisticercos, detectadas con anticuerpos que reconocen receptores de mamíferos. El mismo reporte sugiere que los receptores a glutamato encontrados en sistemas heterólogos tienen que ensamblarse como homómeros para ser canales funcionales, ya que si se ensamblan como heterómeros pierden su función, lo que

podría sugerir la presencia de receptores con diferente arreglo de subunidades en el cisticerco.

Sabiendo que un sistema parecido al nuestro, el nemátodo *C. elegans*, expresa receptores homólogos a los receptores ionotrópicos de mamífero, sin que se conozca la expresión de receptores metabotrópicos en el mismo, se decidió buscar la expresión de la subunidad mGluR1, del Grupo I de receptores metabotrópicos, en el cisticerco, fase larvaria de *T. solium*. Este tipo de receptores, en el sistema nervioso central de mamíferos, ejercen su efecto a través de la activación de segundos mensajeros, con mediación de proteínas G estimuladoras, las cuales activan la síntesis de diferentes mensajeros intracelulares, tales como IP<sub>3</sub>, Ca<sup>2+</sup>, cAMP o cGMP. Un solo receptor metabotrópico puede estimular la síntesis de una gran cantidad de moléculas de segundos mensajeros en la misma célula, amplificando la señal extracelular. Aunque los receptores metabotrópicos se clasifican en tres grupos, decidimos enfocarnos a mGluR1, del Grupo I, los cuales se acoplan a la síntesis de IP<sub>3</sub> y a la liberación de Ca<sup>2+</sup>. Dado que los cisticercos presentan tropismo hacia el SNC, provocando cuadros epilépticos por liberación excesiva del ión Ca<sup>+</sup>, se buscó identificar la presencia de estos receptores en el cisticerco. Mediante inmunodetección en fase sólida, se identificó una isoforma de mGluR1 en cisticercos de cerebro y de músculo, con un peso molecular de 66 kDa, muy diferente al reportado en mamíferos (145 kDa), lo que sugiere que en el cisticerco se localizan receptores relacionados antigénicamente a los mGluR1 de mamíferos, aunque con un peso molecular menor al esperado. También podemos deducir que el ensamble de subunidades es diferente, por ejemplo, la banda antigénica de 200 kDa, detectada en cisticercos de músculo, pudiera ser resultado de una agregación multimérica de las proteínas de 66 kDa.

Actualmente no se cuenta con la secuenciación del genoma de *T. solium* ni con la identificación de proteínas que permitan una mejor comprensión del sistema glutamatérgico, por lo que hace falta realizar más experimentos para la identificación del mismo, ya que los anticuerpos utilizados en este estudio están dirigidos a un epítipo de vertebrados; aún así, se logra la identificación de proteínas antigénicamente relacionadas con receptores a glutamato, confirmando con esto que

los receptores a glutamato son moléculas altamente conservadas entre especies. Es necesario generar anticuerpos anti-receptores a glutamato específicos para el cisticerco; de esta manera se sentarán las bases para determinar el papel y la funcionalidad de estos receptores en el cisticerco.

Los resultados de este trabajo son muy importantes ya que constituyen el primer acercamiento al sistema nervioso del cisticerco y permiten la búsqueda de alternativas para entender el tropismo que tiene el cisticerco hacia los tejidos y, particularmente, hacia el SNC.

En conclusión, el análisis de la expresión de receptores a glutamato en el céstodo *T. solium*, muestra la identificación de tres proteínas antigénicamente relacionadas con receptores ionotrópicos y metabotrópicos: GluR1, GluR4 y mGluR1. La ubicación corporal del cisticerco en el hospedero, ya sea en cerebro o en músculo, permitió encontrar diferencias en la expresión de receptores a glutamato. Los receptores GluR1 y GluR4 fueron inmunodetectados tanto en cisticercos localizados en músculo como en cerebro; sin embargo, la formación de inmunocomplejos entre ellos, que pudiera sugerir que forman parte del mismo receptor, sólo se consiguió en cisticercos localizados en cerebro. Por cuanto a los receptores metabotrópicos, fueron identificadas dos bandas de mGluR1 en cisticercos de músculo (66 y 200 kDa) y una en cisticercos de cerebro (66 kDa).



## **PERSPECTIVAS**

El cisticerco presenta proteínas relacionadas con receptores a glutamato; por lo tanto, si es cierto que los receptores glutamatérgicos provienen de un ancestro común, sería interesante buscar también al sistema de recaptación glutamatérgico. Actualmente está en marcha la identificación por RT-PCR del transportador GLAST en el cisticerco, ya que ha sido caracterizado en *C. elegans*, exhibiendo un alto grado de homología con los transportadores de mamífero GLT1 y GLAST: de 41 a 63% de identidad y de 54 a 73% de similaridad. Estos transportadores cumplen la misma función: aún sin la presencia de células gliales, llevan a cabo la transmisión glutamatérgica y la recaptación de glutamato a nivel del sistema mecano sensor. Con este enfoque es necesario identificar el sistema de recaptación de glutamato en el cisticerco, a nivel de mensajero y de proteína.

Así mismo es necesaria la implementación de técnicas de microscopía electrónica, confocal e inmunofluorescencia, para identificar la ubicación precisa de los receptores ionotrópicos, y la realización de ensayos funcionales, mediante los cuales podamos entender el tipo de señalización que ejerce este sistema de receptores en el cisticerco, así como la implementación de restricción enzimática para confirmar la identificación molecular de estos receptores.

## REFERENCIAS.

- [1] Flisser A, Vargas-Parada L, Laclette JP. *Taenia solium*: un parásito cosmopolita-La neurocisticercosis, infección del sistema nervioso central por la larva del parásito intestinal *Taenia solium*, es causa frecuente de convulsiones y epilepsia. Invest y cienc. 2006; 356:24-33.
- [2] Restrepo BI, Alvarez JI, Castano JA, Arias LF, Restrepo M, *et al.* Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. Infect Immun. 2001; 69(7):4554-60.
- [3] Pardini AX, Vaz AJ, Dos Ramos Machado L, Livramento JA. Cysticercus antigens in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis. J Clin Microbiol. 2001; 39(9):3368-72.
- [4] Proano-Narvaez JV, Meza-Lucas A, Mata-Ruiz O, Garcia-Jeronimo RC, Correa D. Laboratory diagnosis of human neurocysticercosis: double-blind comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and electroimmunotransfer blot assay. J Clin Microbiol. 2002; 40(6):2115-8.
- [5] Alarcon F, Hidalgo F, Moncayo J, Vinan I, Duenas G. Cerebral cysticercosis and stroke. 1992; 23(2):224-8.
- [6] Lee H, Zhu X, O'Neill MJ, Webber K, Casadesus G, *et al.* The role of metabotropic glutamate receptors in Alzheimer's disease. Acta Neurobiol. 2004; 64:89-98.
- [7] Chiu J, DeSalle R, Lam HM, Meisel L, Coruzzi G. Molecular evolution of glutamate receptors: a primitive signaling mechanism that existed before plants and animals diverged. Mol Biol Evol. 1999; 16(6):826-38.
- [8] Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. Pharmacol Rev. 1999; 51(1):7-61.
- [9] Fouilloux C, Contreras F, Rivera M. Receptores de glutamato: Implicaciones terapéuticas. 2004; 23:99-108.
- [10] Nishi A, Liu F, Matsuyama S, Hamada M, Higashi H, *et al.* Metabotropic mGlu5 receptors regulate adenosine A2A receptor signaling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100(3):1322-7.

- [11] Poisik OV, Mannaioni G, Traynelis S, Smith Y, Conn PJ. Distinct functional roles of the metabotropic glutamate receptors 1 and 5 in the rat globus pallidus. *J. Neurosci.* 2003; 23(1):122-30.
- [12] Croci C, Sticht H, Brandstatter JH, Enz R. Group I metabotropic glutamate receptors bind to protein phosphatase 1C. Mapping and modeling of interacting sequences. *J Biol Chem.* 2003; 278(50):50682-90.
- [13] Grover LM, Yan C. Evidence for involvement of group II/III metabotropic glutamate receptors in NMDA receptor-independent long-term potentiation in area CA1 of rat hippocampus. *J Neurophysiol.* 1999; 82(6):2956-69.
- [14] Ramirez-Sotelo G, Lopez-Bayghen E, Hernandez-Kelly LC, Arias-Montano JA, Bernabe A, Ortega A. Regulation of the mouse Na<sup>+</sup>-dependent glutamate/aspartate transporter GLAST: putative role of an AP-1 DNA binding site. *Neurochem Res.* 2007; 32(1):73-80.
- [15] Rose JK, Kaun KR, Chen SH, Rankin CH. GLR-1, a non-NMDA glutamate receptor homolog, is critical for long-term memory in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci.* 2003; 23(29):9595-9.
- [16] Mendonca-Silva DL, Pessoa RF, Noel F. Evidence for the presence of glutamatergic receptors in adult *Schistosoma mansoni*. *Biochem Pharmacol.* 2002; 64(9):1337-44.
- [17] Mano I, Straud S, Driscoll M. *Caenorhabditis elegans* glutamate transporters influence synaptic function and behavior at sites distant from the synapse. *J Biol Chem.* 2007; 282(47):34412-9.
- [18] Brockie PJ, Madsen DM, Zheng Y, Mellem J, Maricq AV. Differential Expression of Glutamate Receptor Subunits in the Nervous System of *Caenorhabditis elegans* and Their Regulation by the Homeodomain Protein UNC-42. *J neurosci.* 2001; 21(5):1510-22.
- [19] Chang HC, Rongo C. Cytosolic tail sequences and subunit interactions are critical for synaptic localization of glutamate receptors. *J Cell Sci.* 2005, 118(9):1945-56.
- [20] Davenport R. Glutamate receptors in plants. *Ann Bot.* 2002; 90(5):549-57.