



Universidad Central de
Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología

Diagnóstico serológico diferencial de la fase aguda y crónica de
la Esquistosomiasis: estudio de las glicoproteínas del glicocalix
de la cercaria

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre Universidad Central de
Venezuela por la bachiller *Yirsie Gabriela Solórzano
Terán* como requisito parcial para optar al título de
Licenciado en Biología.

Tutor: Dr. Gilberto Payares.

CARACAS, VENEZUELA

FEBRERO – 2011

**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL
DE GRADO DE LA Br: Yirsie Gabriela Solórzano Terán**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. Yirsie Gabriela Solórzano Terán, C.I.: V-17.427.566, titulado **“Diagnóstico serológico diferencial de la fase aguda y crónica de la Esquistosomiasis: estudio de las glicoproteínas del glicocalix de la cercaria”**, para optar al título de Licenciada en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los dieciséis días del mes de febrero del año 2011, dejando constar que el Prof. Gilberto Payares actuó como coordinador del jurado examinador.

Dra. Elizabeth Valdivieso
(Jurado)

Dra. Maria Lorena Márquez
(Jurado)

Dr. Gilberto Payares
(Tutor)

RESUMEN

La Esquistosomiasis o Bilharziosis es una de las enfermedades parasitarias más difundida en el mundo que afecta a más de 200 millones de personas en las zonas tropicales e intertropicales. Es causada por algunas de las especies de gusanos planos del género *Schistosoma* y consiste en una dolencia fundamentalmente crónica, que debilita severamente a quienes la padecen, reduce su capacidad productiva, los incapacita y limita sus perspectivas de progreso económico y social. Después de la malaria, esta parasitosis ocupa el segundo lugar en importancia desde un punto de vista socioeconómico y de salud pública. En Venezuela, la única especie que infecta al hombre es *Schistosoma mansoni* el cual se encuentra diseminado en una superficie de 15.000 Km² de la zona centro-costera del país (estados Aragua, Carabobo, el norte de Guárico, Miranda y Vargas). Las cercarias del *Schistosoma mansoni* son estadios larvales constituidos por un cuerpo y una cola bifurcada, los cuales están recubiertos por un tegumento con un área de 20.000 μm². En su parte más externa, el tegumento está cubierto por una membrana trilaminada limitada por un denso glicocalix altamente antigénico que parece jugar un papel importante en la respuesta innata y adaptativa del hospedador y es el responsable de la reacción antígeno-anticuerpo que ocurre en presencia de sueros de pacientes.

Una serie de métodos parasitológicos, bioquímicos e inmunoquímicos fueron utilizados para llevar a cabo este estudio. Su aplicación permitió investigar desde la cercario-reacción más sencilla hasta lo más complejo como la identificación, aislamiento y caracterización de los polipéptidos antigénicos y sus epítopes en el glicocalix de la cercaria. Un método mecánico sencillo fue diseñado para separar las cercarias en cuerpos y colas sin producir pérdida del glicocalix y sin afectar su morfología externa, ni su antigenicidad. La cercario-reacción fue de utilidad para monitorear la presencia del glicocalix durante la separación de cercarias en cuerpos y colas. Nuevos antígenos aparecieron en ambas regiones como consecuencia de la separación. Los antígenos identificados en una u otra región como consecuencia de la separación (58,2 y 64 kDa en cuerpos y 35 y 53,6 kDa en cuerpos y colas). Los antígenos identificados en los extractos de cuerpos y de colas no resultaron ser la suma de los identificados en el extracto de cercarias completas. Antígenos

de peso molecular entre 16,5-84,3 kDa fueron reconocidos durante las primeras seis semanas de infección (fase aguda) y a las 16 semanas (fase crónica), antígenos adicionales de alto peso molecular fueron detectados (104-109,8 kDa). Esto podría ser consecuencia de eventos inmunitarios producidos durante el progreso de la fase crónica de la infección. La oxidación-reducción con metaperiodato de sodio/borohidrato de sodio de la glicoproteína antigénica dominante de 65 kDa, no alteró su reconocimiento por el suero de infección aguda y crónica, mientras que las de 97,5-100 y 108,2 kDa fueron reconocidas antes y después del tratamiento únicamente por el suero de infección crónica. Esto sugiere que los anticuerpos producidos durante la infección crónica están dirigidos contra epítopes glicosídicos y peptídicos de estas glicoproteínas, lo que puede explicar la reducción en intensidad de las bandas del doblete de 97,5-100 kDa reconocidas por el suero de infección crónica después del tratamiento. El hecho de que en la infección aguda se produzcan anticuerpos que reconocen epítopes polipeptídicos en la glicoproteína de 65 kDa y en la fase crónica contra otros tres (97,5-100 y 108,2 kDa), podría ser útil para la identificación de su secuencia polipeptídica conducente a la síntesis química de epítopes lineales destinados a la discriminación de estas dos fases de la enfermedad. La evaluación de reactividad cruzada con otros parásitos relacionados es requerida para determinar la especificidad de estos epítopes de antígenos glicoprotéicos.

DEDICATORIA

“A menudo los héroes anónimos dejan las marcas más profundas”

Paulo Coelho

A la memoria del Sr. Etanislao Muñoz

Mí adorado tío Nanao, mí héroe anónimo...

AGRADECIMIENTOS

Indudablemente en primer lugar le doy gracias a Dios por ayudarme a levantarme en mis fracasos, por aprender de ellos y principalmente por permitirme realizar uno de los sueños más importantes de mi vida. Esta meta alcanzada es una prueba de que siempre de su mano alcanzaré todas aquellas que me proponga.

A mis padres (Valeria y Damián) por depositar su entera confianza en cada reto que se me ha presentado en la vida sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad. ¡¡¡Este triunfo también es de ustedes!!!

A mis hermanas (Thahilis y Thaína) por el ejemplo dado. Agradezco especialmente a Thaína, mi tutora personal, por la corrección del manuscrito y por apoyarme desde que decidí a los 14 años estudiar Biología hasta el sol de hoy. ¡¡¡ Gracias Ína...te irás de mi vida dejando huellas, ¡¡¡ja ja ja!!!

A mi hermano (Dennis), mi verdadero compañero de vida, mi morocho, por todo el apoyo incondicional tanto monetario como moral, por ser más que un hermano...¡¡¡Te adoro Gabito!!!

A mis ángeles guardianes (abuelos, tíos y primos) por continuar siendo parte de mi vida, por cuidarme desde el cielo, por manifestarse en cada sueño y hacerme entender que lo estoy haciendo bien. Estarán siempre en mi corazón. He de agradecer especialmente a mi tío Nanao, el fundador de mi familia, por ser parte de mi motivación para seguir adelante con este trabajo y a quien prometí hace 10 meses de su partida, hacerlo realidad....Promesa cumplida...¡¡¡te lo dedico!!!

Al resto de mi familia, por prestarme el tiempo que de alguna manera les pertenecía durante mis estudios de pregrado. Debí ser un tesoro en otra vida para que Dios me premiara con una familia tan comprensiva, numerosa, unida, rumbera y especial.

A mis amigos de la carrera por hacer más llevadera la difícil tarea de estudiar en Ciencias. Especialmente a Ingrid (Miss Smith) por todos y cada uno de sus consejos

acertados en el momento preciso, a Marilyn (Lili) por hacerme reír con sus locuras y ocurrencias, a mi comadreja Vanessa (Vane) y a Samanta (Samy), por ser prácticamente mis compañeras de laboratorio en el IBE. ¡¡¡Las adoro a todas!!!

A mis amigos de siempre, especialmente a Anaís (Anita), Grecia (Bruja), Erick (Erickito), Jesús (Niño) y Judith (Gata). Gracias por aguantarme y por ser lluvia en sequía. ¡¡¡Los quiero mucho!!!!

Al profesor Gilberto Payares, por ser más que un tutor. Gracias por atreverse a confiar en mí. Sus conocimientos, orientaciones, su paciencia, sinceridad, tiempo dedicado, regaños, motivación y hasta sus chistes de mal gusto fueron fundamentales para la realización de este trabajo. A su manera, ha sido capaz de ganarse mi admiración así como de hacer sentirme en deuda con usted por todo lo recibido durante el periodo de tiempo que ha durado esta tesis. ¡¡¡Muchísimas gracias por todo Prof...lo quiero mucho!!!

De igual manera, quisiera agradecer a otros profesores no sólo por ser parte de mi formación académica sino también por su gran calidad humana hacia mí. Me gustaría nombrar a muchos pero destaco a Herlinda Ramos, Valentina Salas y Teresa Edith Vargas. ¡¡¡Muchas gracias a las tres!!!

Y por último, pero no menos importante, estaré eternamente agradecida a mí querida UCV porque me dio la oportunidad no sólo de hacer mi sueño realidad sino también me llenó de momentos inolvidables. Hoy, orgullosa de ser Ucevista, adquiero el compromiso de seguir “venciendo las sombras” por el resto de mi vida.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Acta del veredicto.....	ii
Resumen.....	iii
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
Índice de tablas.....	xii
Índice de figuras.....	xiii
Índice de abreviaturas.....	xv
Capítulo I: Introducción general.....	1
1.1. - Marco teórico.....	1
1.1.1.- Definición: La Esquistosomiasis.....	1
1.1.2.- Epidemiología.....	2
1.1.3.- Biología y ciclo evolutivo del parásito.....	7
1.1.4.- Patología y sintomatología.....	10
1.1.5.- Diagnóstico.....	13
1.1.6.- Tratamiento y control.....	14
1.2.- Antecedentes.....	15
1.2.1.- La cercaria: morfología externa y ultraestructural de la superficie.....	15
1.2.2.- El glicocalix: características y función.....	17
1.2.3.- Métodos de diagnóstico de la Esquistosomiasis.....	21
1.2.3.1.- Métodos parasitológicos.....	23
1.2.3.2.- Métodos inmunológicos.....	25
	viii

1.2.3.2.1.- Detección de antígenos.....	25
1.2.3.2.2.- Detección de anticuerpos específicos.....	26
1.3.- Justificación.....	33
1.4.- Objetivos de la investigación.....	34
1.4.1.- Objetivo general.....	34
1.4.2.- Objetivos específicos.....	34
Capítulo II: Materiales y Métodos.....	35
2.1.- Material Biológico.....	35
2.2.- Reactivos químicos y suministros.....	35
2.3.- Mantenimiento del ciclo de vida de <i>Schistosoma mansoni</i>	36
2.3.1.- Obtención de miracidios a partir de huevos presentes en hígados de animales infectados.....	36
2.3.2.- Infección mixta y unisexual de caracoles sanos de <i>Biomphalaria glabrata</i>	36
2.3.3.- Obtención de cercarias a partir de caracoles de <i>Biomphalaria glabrata</i> con infección mixta y unisexual.....	37
2.3.4.- Infección del hospedador definitivo (hámster y/o ratón).....	37
2.3.5.- Obtención de gusanos juveniles y adultos a partir de hospedadores definitivos (hámster y/o ratón) infectados experimentalmente con cercarias de <i>S.mansoni</i>	38
2.4.- Obtención de suero sanguíneo.....	39
2.5.- Cercario-reacción (CHR).....	39
2.6.- Coloración de cercarias con Giemsa.....	40
2.7.- Actividad enzimática de la fosfatasa alcalina.....	40
2.8.- Preparación de extractos de superficie (glicocalix) de cercarias.....	41

2.8.1.- Separación de cercarias en cuerpos y colas.....	41
2.8.2.- Elección del detergente a utilizar.....	41
2.8.3- Separación del glicocalix de cercarias completas, de cuerpos y de colas mediante solubilización en detergente.....	42
2.8.4- Antigenicidad de los extractos del glicocalix de cercarias.....	43
2.9.- Aislamiento de glicoproteínas de los antígenos de cercarias por cromatografía de afinidad en concanavalina A-agarosa.....	43
2.10.- Composición polipeptídica de los extractos experimentales mediante SDS PAGE.....	44
2.10.1.- Tinción con nitrato de plata.....	45
2.11.- Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa desde el gel de electroforesis.....	45
2.11.1.- Identificación de proteínas y glicoproteínas totales en papel de nitrocelulosa.....	46
2.11.2.- Identificación de proteínas antigénicas mediante la técnica de inmunoblot.....	47
2.11.3.- Identificación de epítopes (tipo glicano o peptídico) de proteínas antigénicas mediante tratamiento con metaperiodato de sodio/borohidrato de sodio.....	48
Capítulo III: Resultados.....	49
3.1.- Anticuerpos anti-glicocalix a lo largo del desarrollo de una infección por <i>S. mansoni</i>	49
3.2.- Cercario-reacción en las diferentes regiones de la cercaria.....	52
3.3.- Extracción del glicocalix de cercarias completas, de cuerpos y de colas.....	53
3.4.- Composición polipeptídica y antigenicidad de los extractos del glicocalix de cercarias completas, de cuerpos y de colas.....	55

3.5.- Antígenos polipeptídicos presentes en los extractos de glicocalix de cercarias completas, de cuerpos y de colas, reconocidos por sueros de infección aguda y crónica de <i>S. mansoni</i>	57
3.6.- Antígenos polipeptídicos presentes en los extractos de glicocalix de cercarias completas, reconocidos por sueros de ratones a diferentes semanas de infección con <i>S.mansoni</i>	59
3.7.- Identificación y aislamiento de glicoproteínas afines a la concanavalina A presentes en el extracto de glicocalix de cercarias completas.....	62
3.8.- Composición polipeptídica y antigenicidad de las fracciones de la cromatografía de afinidad.....	65
3.9.- Glicoproteínas antigénicas presentes en el extracto de glicocalix de cercarias completas, reconocidas por suero de infección aguda y crónica de <i>S. mansoni</i>	67
3.10.- Epítopes (tipo glicano o peptídico) de glicoproteínas antigénicas reconocidos por suero de infección aguda y crónica de <i>S. mansoni</i>	69
3.11.- Reactividad cruzada con sueros de otras infecciones parasitarias.....	71
Capítulo IV: Discusión.....	72
4.1.- Antígenos presentes en los extractos del glicocalix de cercarias, reconocidos por sueros de infecciones experimentales con <i>S. mansoni</i>	75
4.2.- Caracterización de los antígenos identificados en extractos del glicocalix.....	78
Conclusiones.....	83
Referencias bibliográficas.....	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Clasificación taxonómica de <i>Schistosoma</i>	2
Tabla II. Comparación de las principales especies de <i>Schistosoma</i> que infectan al hombre.....	3
Tabla III. Cinética de aparición de anticuerpos anti-glicocalix a lo largo del desarrollo de una infección por <i>S. mansoni</i> en ratones de laboratorio.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Áreas en riesgo de la Esquistosomiasis.....	4
Figura 2. Distribución geográfica de <i>S. mansoni</i> en Venezuela.....	5
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Schistosoma</i>	9
Figura 4. Morfología externa de la cercaria de <i>S. mansoni</i>	15
Figura 5. Morfología ultraestructural de la superficie de la cercaria de <i>S. mansoni</i>	16
Figura 6. Cercario-reacción (CHR).....	18
Figura 7. Cercario-reacción positiva con sueros experimentales de ratón.....	51
Figura 8. Separación de cercarias en cuerpos y colas teñidas con Giemsa.....	52
Figura 9. Cercario-reacción positiva en cuerpos y colas con suero crónico mixto de ratón.....	53
Figura 10. Cercarias completas, cuerpos y colas teñidas con Giemsa luego del tratamiento con detergente.....	54
Figura 11. Análisis electroforético de los extractos del glicocalix de cercarias.....	56
Figura 12. Inmunodifusión doble de Ouchterlony de los extractos del glicocalix de cercarias con suero crónico mixto de ratón.....	56
Figura 13. Inmunoblot del extracto del glicocalix de cercarias completas, de cuerpos y de colas enfrentado a los sueros de infección aguda y crónica de <i>S. mansoni</i>	58
Figura 14. Inmunoblot del extracto del glicocalix de cercarias completas enfrentado a los sueros de infecciones experimentales con <i>S.mansoni</i>	61
Figura 15. “Blot” de glicoproteínas totales del extracto del glicocalix de cercarias completas afines a la concanavalina A.....	62

Figura 16. Purificación de la fosfatasa alcalina del extracto de cercarias completas mediante cromatografía de afinidad en ConA-agarosa.....	64
Figura 17. Análisis electroforético de las fracciones de la cromatografía de afinidad	66
Figura 18. Inmunodifusión doble de Outcherlony de las fracciones de la cromatografía de afinidad con suero crónico mixto de ratón.....	66
Figura 19. Inmunoblot de las fracciones de la cromatografía de afinidad enfrentado a los sueros de infección aguda y crónica de <i>S. mansoni</i>	68
Figura 20. Inmunoblot de las fracciones de la cromatografía de afinidad tratadas con metaperiodato de sodio y enfrentadas a los sueros de infección aguda y crónica de <i>S. mansoni</i>	70
Figura 21. Helminthos presentes en ratón infectado con 100 cercarias de <i>S. mansoni</i>	71

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- Amidiol: tampón amino-2-metil-3-propanol.
- APIA: inmunoensayo de la fosfatasa alcalina.
- BE: extracto butanólico del tegumento de gusanos adultos de *S. mansoni*
- CAA: antígeno circulante anódico.
- CCA: antígeno circulante catódico.
- CHR: cercario-reacción.
- ConA: concanavalina A.
- ConA-agarosa: concanavalina A enlazada a agarosa.
- COPT: precipitación circumoval.
- Eb: extracto del glicocalix de cuerpos.
- Ec: extracto del glicocalix de cercarias completas.
- ELISA: ensayo de inmunoabsorción ligada a enzima.
- ELISA-SEA: ensayo de inmunoabsorción ligada a enzima con antígenos solubles.
- ELISA-SEA-SMP: ensayo de inmunoabsorción ligada a enzima con antígenos solubles de huevo tratados con metaperiodato de sodio.
- Et: extracto del glicocalix de colas.
- F1: fracción no retenida en la ConA-agarosa.
- F2: fracción retenida-eluída en la ConA-agarosa.
- g: gravedad (fuerza gravitacional que actúa sobre 1 gramo de masa a una distancia en centímetros del eje de rotación).
- gr.: gramos
- kDa: kilodalton
- KLH: hemocianina de lapa *Megathura crenulata*
- KRT: Tampón Ringer Tris
- MBL: lectinas de unión a manosa

Mr: movilidad relativa

NP: nitrofenol.

PBS: Tampón Fosfato Salino.

PMSF: fluoruro de fenil-metil-sulfonilo

p-NPP: p-nitrofenol fosfato.

S: sueros de ratón.

Sa1: suero agudo de 1 semana de infección.

Sa2: suero agudo de 2 semana de infección.

Sa3: suero agudo de 3 semana de infección.

Sa4: suero agudo de 4 semana de infección.

Sa5: suero agudo de 5 semana de infección.

Sa6: suero agudo de 6 semana de infección.

Sa7: suero agudo de 7 semana de infección.

Sa8: suero agudo de 8 semana de infección.

Sc: suero crónico mixto (16 semanas de infección).

Sc♀: suero crónico unisexual de gusanos hembras (16 semanas de infección).

Sc♂: suero crónico unisexual de gusanos hembras (16 semanas de infección).

SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de sodio dodecil sulfato.

SEA: antígenos solubles de huevo.

SN: suero normal.

STc: suero crónico anti-*Trypanosoma cruzi*.

Tris: hidrocloreuro de hidroximetil amino metano

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1.- Marco teórico

1.1.1.- Definición: La Esquistosomiasis

Theodor Bilharz, un médico Alemán trabajando en Egipto en 1852, describió por primera vez una enfermedad parasitaria tropical llamada Bilharzia y más tarde Esquistosomiasis. Esta dolencia es causada por helmintos trematodos del género *Schistosoma* (Tabla I), entidad predominantemente antroponótica¹ que habita el torrente sanguíneo del humano (MacManus y Loukas, 2008). De todas las infecciones parasitarias humanas, la esquistosomiasis es una de las enfermedades más difundidas en el mundo y después de la malaria constituye el problema socioeconómico y de salud pública más importante del ser humano (WHO, 1987a).

¹ Enfermedad que existe normalmente en los seres humanos (Aguilar y col., 1999).

Tabla I. Clasificación taxonómica de *Schistosoma*

Phylum	Platyhelminthes
Clase	Trematoda (Rudolphi, 1808)
Subclase	Digenea (Carus, 1863)
Orden	Strigeatida (Larue, 1926) Sudarikov, 1959
Familia	Schistosomatidae (Poche, 1907)
Género	<i>Schistosoma</i> (Weinland, 1858)
Especie	<i>S. haematobium</i> , <i>S. mansoni</i> , <i>S. japonicum</i> , <i>S. mekongi</i> , <i>S. malayensis</i> , <i>S. matthei</i> y <i>S. intercalatum</i>

Tomado de ITIS Standard Report Page: *Schistosoma mansoni*, 2010

1.1.2.- Epidemiología

Existen 7 especies de *Schistosoma* (Tabla I) que infectan al ser humano, pero *S. haematobium*, *S. mansoni* y *S. japonicum* producen la enfermedad con mayor frecuencia (Rojas-Marcos y col., 2009) y se distinguen principalmente por el tipo de huevo producido, hospedador intermediario al cual parasitan, lugar en que se aloja el gusano adulto en el sistema circulatorio del hospedador definitivo y distribución geográfica (Tabla II).

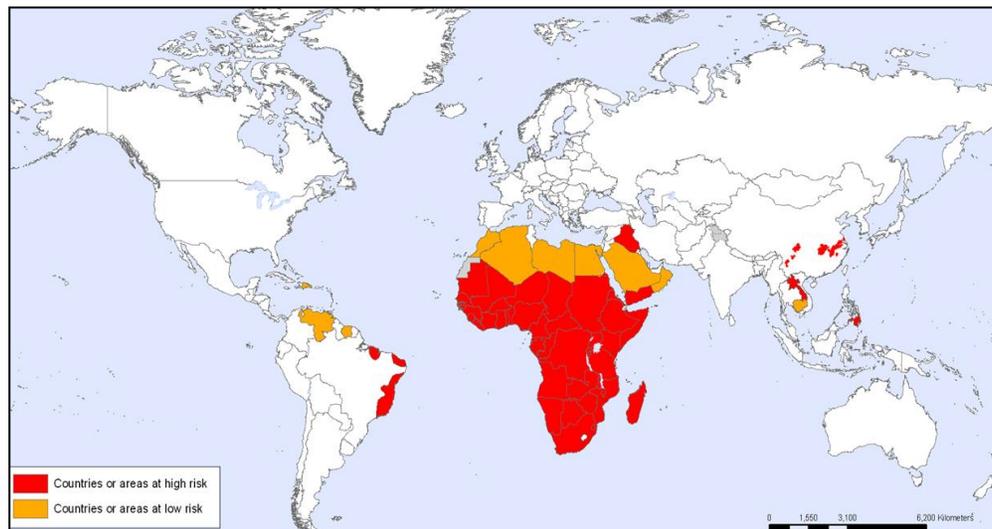
Se estima que 700 millones de personas están en riesgo de contraer la infección en 74 países endémicos pertenecientes a las áreas tropicales y subtropicales de los continentes (Figura 1) y que existen más de 200 millones de personas parasitadas en el mundo (OMS, 2010), de las cuales 70 millones están infectadas con *S. mansoni* (Katz y Rocha, 1991).

Tabla II. Comparación de las principales especies de *Schistosoma* que infectan al hombre

Especie de <i>Schistosoma</i>	<i>S. mansoni</i>	<i>S. japonicum</i>	<i>S. haematobium</i>
Huevo producido	Con espolón lateral	Con espolón rudimentario o sublateral pequeño	Con espolón polar
Género del hospedador intermediario	<i>Biomphalaria</i>	<i>Oncomelania</i>	<i>Bulinus</i>
Tipo de enfermedad	Intestinal	Intestinal	Urinaria
Ubicación en el hospedador definitivo	Venas mesentéricas superiores que drenan el intestino delgado	Venas mesentéricas superiores que drenan el intestino grueso	Plexo venoso de la vejiga urinaria y el recto
Distribución mundial	África, Sur América (Brasil, Surinam y Venezuela), el Caribe (Puerto Rico, St. Lucia, Guadalupe, Martinica, República Dominicana, Antigua y Monserrat) y en partes de Medio Oriente	Países asiáticos (China, Filipinas, Japón, Indonesia y Taiwán)	África, Arabia Saudita, Medio Oriente, Irán, Madagascar y Mauritius. Norte de la India

Información tomada de Cambridge University Schistosomiasis Research Group, 2010; WHO, 1987a y Rojas-Marcos y col., 2009.

La explicación más aceptada para la aparición de la esquistosomiasis en América es que el parásito fue traído desde África durante el tráfico de esclavos, donde encontró el hospedador intermediario, caracoles del género *Biomphalaria*, en los cuales estableció su ciclo de vida con bastante éxito hasta el día de hoy. La distribución geográfica de estos moluscos es mayor que la de la enfermedad y está representado por más de 20 especies en América, pero principalmente tres sirven como hospedador intermediario: *B. tenagophila*, *B. straminea* y *B. glabrata*, siendo ésta última, la especie más susceptible. (Katz y Rocha, 1991).



Tomado de WHO, 2009

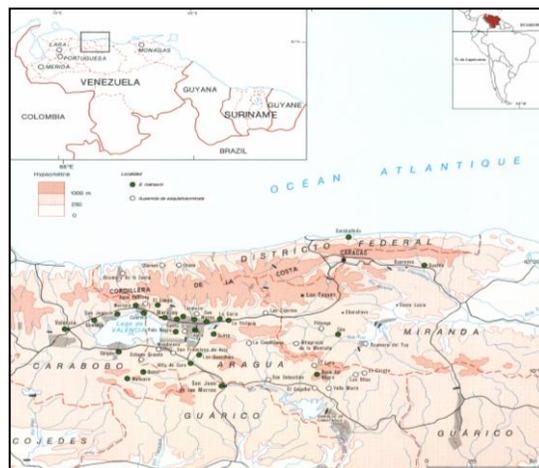
Figura 1. Áreas en riesgo de la Esquistosomiasis

Schistosoma mansoni es la especie establecida en las Américas (WHO, 1987b) y en Venezuela (Figura 2) presenta una distribución focal que abarca aproximadamente 15.000 Km² de la zona centro-costera del país (estados Aragua, Carabobo, el norte de Guárico, Miranda y Vargas) (Alarcón de Noya y col., 2002). En esta región reside la mayor cantidad de habitantes del país (Alarcón de Noya, 2007b). La aplicación de molusquicidas² y el suministro de praziquantel (antihelmíntico) a personas infectadas han disminuido la intensidad de la infección por *S. mansoni* en Venezuela, por lo que el área endémica del país pasó a ser un área de baja transmisión (Alarcón de Noya, 2007b). Esta condición ha convertido a la esquistosomiasis en una parasitosis desatendida por los programas de control, lo que ha traído como consecuencia el repoblamiento de cuerpos de agua por parte

² Sustancias sólidas o líquidas utilizadas para intoxicar y matar especies de moluscos (Cesari y Alarcón de Noya, 1987).

de *Biomphalaria glabrata* (Alarcón de Noya, 2007b) y a la adaptación de éste a zonas situadas fuera del área endémica tradicional en estados como Monagas (Caripe), Cojedes (Tinaquillo), Lara (Valle Anzoátegui) y Portuguesa (Biscucuy y Chabasquén) (Alarcón de Noya y col., 1999).

Principalmente, dos factores son responsables de la endemidad de esta parasitosis: la presencia del hospedador intermediario en aguas dulces y la construcción de viviendas en los márgenes de estos cuerpos de agua, sin servicios de agua potable, ni adecuados sistemas de disposición de excretas (Aguilar y col., 1999).



Tomado de WHO, 1978b

Figura 2. Distribución geográfica de *S. mansoni* en Venezuela

Al igual que casi todas las endemias parasitarias, la esquistosomiasis ataca fundamentalmente a poblaciones rurales y sub-urbanas que viven en condiciones de graves deficiencias de saneamiento ambiental, hábitos higiénicos y condiciones socio-económicas precarias. Esta enfermedad se puede contraer a cualquier edad, pero los niños (3-12 años)

son las principales víctimas por sus hábitos más proclives a estar en contacto periódicamente y durante períodos prolongados, en las horas de mayor calor, con aguas contaminadas por cercarias. Asimismo, sus condiciones inmunitarias no completamente desarrolladas, probablemente permiten la penetración y maduración de mayor número de parásitos. De hecho, la determinación de la prevalencia³ e intensidad⁴ de la infección por *S. mansoni* en este grupo etario es la mejor manera de medir la transmisión de la infección en una población, así como la evaluación de la efectividad de las medidas de control (Aguilar y col., 1999). En los humanos, no existen diferencias de infección por sexo, a no ser que se presenten por un comportamiento diferente motivado a influencias culturales o profesionales (por ejemplo, agricultores, pescadores, lavanderas, etc.). Otros de los factores que favorecen la continuidad de la esquistosomiasis son las migraciones humanas con fines recreativos o cualquier otro, que transportan el parásito desde áreas endémicas a otras localidades no endémicas, así como también los nuevos hábitats de agua dulce creados por las actividades del hombre (sistemas de riego, cuerpos de agua recreacionales o para suministro de agua de consumo humano), cuyas condiciones ecológicas favorecen la instalación de los hospedadores intermediarios y en consecuencia contribuyen a la propagación de la enfermedad (Rojas-Marcos y col., 2009; Aguilar y col., 1999; Katz y Rocha, 1991).

³ Proporción de la población con esquistosomiasis en un área endémica (Cesari y Alarcón de Noya, 1987).

⁴ Número de huevos por gramo de heces (Cesari y Alarcón de Noya, 1987).

1.1.3.- Biología y ciclo evolutivo del parásito

Las especies de *Schistosoma* que infectan al hombre cumplen un ciclo de vida indirecto muy similar, el cual requiere dos hospedadores: el definitivo (el hombre) y el intermediario (el caracol) (Aguilar y col., 1999). Debido a que en Venezuela el único esquistosoma que infecta al hombre es *S. mansoni*, describiremos en detalle su ciclo de vida.

Los huevos de *S. mansoni* salen al exterior con las heces de personas infectadas (Figura 3). Al entrar en contacto con el agua dulce y bajo condiciones favorables de temperatura, luminosidad y salinidad, los huevos eclosionan y liberan una pequeña larva ciliada de gran movilidad llamada miracidio. Los miracidios no se alimentan, dependen de sus reservas de glucógeno y pueden sobrevivir en el agua por 8-12 horas, tiempo en el que deben nadar activamente en la búsqueda de su hospedero intermediario, un caracol del género *Biomphalaria*, al cual penetran por sus partes blandas, de preferencia las bases de las antenas o el pie. Después de la penetración, el miracidio se transforma en esporoquiste madre o primario, estadio en forma sacular que contiene en su interior células germinativas capaces de originar 200-400 esporoquistes hijos o secundarios, éstos abandonan el esporoquiste primario y se dirigen hacia el hepatopáncreas o menos frecuentemente a los ovotestes del molusco. Las células germinativas de los esporoquistes hijos, a través de una fase germinativa (poliembrionía), originan numerosas cercarias hasta el punto de que un sólo miracidio puede producir hasta 300.000 cercarias de cola bifurcada, que bajo el estímulo de la luz y el calor, abandonan el esporoquiste hijo y luego al caracol (Aguilar y

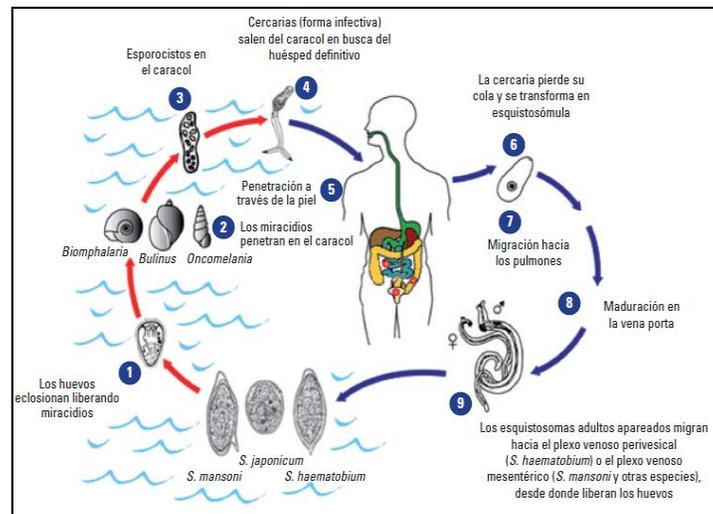
col., 1999; Payares, 1979; Katz y Rocha, 1991). Todas las cercarias que se originan de un sólo miracidio poseen el mismo sexo (citado por Cesari y Alarcón de Noya, 1987).

Las cercarias miden 0.14 mm de largo por 0.04 mm de ancho, no se alimentan, también dependen de sus reservas de glucógeno y pueden sobrevivir en el agua hasta 24 horas. Al encontrar el hospedador definitivo, el hombre, lo penetran activamente por la piel gracias a sus movimientos y a las secreciones líticas de sus glándulas de penetración. Durante el proceso de penetración, la larva pierde la cola y a partir de este momento recibe el nombre de esquistosómulo (gusano adolescente) (Aguilar y col., 1999; Katz y Rocha, 1991).

Los esquistosómulos migran hacia las vénulas cutáneas y en un lapso de 2 a 4 días llegan al corazón derecho y de allí a los pulmones. Pasan de los capilares arteriolares a los venosos y llegan al corazón izquierdo, para ser distribuidos por la circulación arterial sistémica. Normalmente, sólo los que logran alcanzar el sistema porta, consiguen las condiciones para su desarrollo final. Los esquistosómulos necesitan ir hacia el hígado para terminar su crecimiento. En las grandes ramificaciones del sistema porta intrahepático, se hacen adultos y comienzan la cópula (Aguilar y col., 1999). La hembra vive en el canal ginecóforo del macho, mide de 15 a 20 mm de largo por 1 mm de espesor. El macho es más pequeño (10 a 15 mm) y más ancho (3 mm) que la hembra y ambos presentan dos ventosas, una terminal y otra ventral (Katz y Rocha, 1991).

El macho, con ayuda de su musculatura bien desarrollada, migra junto con la hembra en sentido contrario al torrente sanguíneo y se dirige hacia las vénulas,

principalmente aquellas que forman el plexo hemorroidal y vénulas mesentéricas del sigmoides y resto del colon, en donde inician la ovipostura después de 35 días. Para esto la hembra, aún apareada, se introduce en los capilares de la submucosa y mucosa de la pared intestinal y deposita los huevos (unos 300 huevos /día/ hembra), los cuales son inmaduros y necesitan 6 a 7 días para transformarse en huevos viables y maduros. Estos huevos con espolón lateral miden entre 112 a 174 μm de largo por 50 a 70 μm de ancho, contienen un embrión y tienen que seguir su camino a través de la pared intestinal hasta llegar a las heces para salir al exterior. En su tránsito a las heces, estos huevos pueden quedar atrapados en la mucosa intestinal o pueden ser arrastrados por la corriente sanguínea al hígado, atascándose en las vénulas portales y con menor frecuencia en otros tejidos donde induce una respuesta granulomatosa (Aguilar y col., 1999; Katz y Rocha, 1991; Cesari y Alarcón de Noya, 1987).



Tomado de Rojas-Marcos y col., 2009

Figura 3. Ciclo biológico de *Schistosoma*

1.1.4.- Patología y sintomatología

Existen dos fases clínicas reconocidas en individuos infectados con *S. mansoni*, la fase aguda y la fase crónica (Pearce y MacDonald, 2002).

La fase aguda es una reacción de hipersensibilidad que suele observarse en pacientes que han visitado recientemente un área endémica sin haber tenido previo contacto con el parásito (Pearce y MacDonald, 2002). Los síntomas tardan en manifestarse entre 4-8 semanas tras la infección inicial y son causados por la respuesta inmunitaria disparada por la migración y maduración de los vermes y el inicio de la oviposición. El cuadro se caracteriza por fiebre, marcada eosinofilia, malestar general, dolor abdominal, diarrea mucosa o mucosanguinolenta, aerocolia, anorexia, vómitos, dolores musculares y articulares, tos seca, hiperreactividad bronquial, urticaria y, en ocasiones, hepatoesplenomegalia. En turistas o personas no expuestas previamente, la penetración de la cercaria a través de la piel puede causar una condición alérgica local, específicamente un exantema papuliforme, pruriginoso, llamado “la comezón del nadador” o dermatitis cercarial que desaparece de manera espontánea en horas o días. Esta dermatitis es más frecuente e intensa tras la infección por esquistosomas de aves. El más habitual es el *Trichobilharzia sp*, cuya reacción es más sensible y evidente probablemente porque la cercaria muere tras la penetración de la piel y no se disemina por el resto del organismo (Rojas-Marcos y col., 2009).

La fase crónica de la infección es causada por la reacción del organismo a los huevos del gusano y no por el gusano mismo. Se inicia después de 14 a 16 semanas de

infección, es asintomática y suele darse en individuos que viven en áreas endémicas (Pearce y MacDonald, 2002). Los huevos depositados en los capilares venosos mesentéricos pueden quedar atrapados en la mucosa intestinal o pueden ser arrastrados por la corriente sanguínea al hígado, atascándose en las vénulas portales y con menor frecuencia en otros tejidos. Estos huevos duran viables aproximadamente 6 días, ocasionando a su alrededor una reacción inflamatoria llamada granuloma que es modulada inmunológicamente a lo largo de la infección, siendo grande al principio, posteriormente reduce su tamaño y es eventualmente sustituido por tejido fibrótico cicatricial. A medida que aumenta la fibrosis, se llega a reducir e inclusive impedir el flujo sanguíneo en el sitio de obstrucción (espacio periportal), conduciendo a la hipertensión portal con su patología clásica de esplenomegalia (aumento de tamaño del bazo), red venosa colateral, y varices esofágicas. El hígado no necesariamente aumenta de tamaño (hepatomegalia), sino que presenta una consistencia dura y nodular a la palpación, mientras que la función y los índices hepáticos, suelen encontrarse conservados hasta fases avanzadas. La ascitis (acumulación de líquido en la cavidad peritoneal) es un signo tardío de la enfermedad y el sangrado por las varices esofágicas es la complicación más seria de esta parasitosis (Rojas-Marcos y col., 2009). Sin embargo, muy pocas personas desarrollan la fibrosis periportal (Pearce y MacDonald, 2002) pues ésta depende de la carga parasitaria, de la frecuencia de contacto de las personas con las aguas contaminadas y del estado inmune⁵ de la población (Alarcón de Noya y col., 2006).

⁵ Presencia o ausencia de resistencia natural o inmunidad adquirida (Aguilar y col., 1999).

Como consecuencia de las medidas de control (a nivel de los hospedadores intermediarios y/o definitivos) la transmisión de la enfermedad puede disminuir. La población de caracoles puede ser reducida con la aplicación de molusquicidas u otro control biológico y de esta manera, pocos caracoles resultan infectados y la producción de cercarias disminuye significativamente si pocos huevos de *S. mansoni* contaminan los cuerpos de agua. Como una cadena, los hospedadores susceptibles son infectados con menos cercarias y el daño patológico producido por los huevos de *S. mansoni* es menos severo. Las manifestaciones clínicas no son tan dramáticas hasta el punto de que la fase aguda de la enfermedad puede pasar inadvertida (Alarcón de Noya y col., 2006).

Ésta es la situación actual de Venezuela, un área de baja transmisión que puede ser definida como aquella donde existe el vector, la prevalencia de casos activos está por debajo del 25%, con predominio de individuos con intensidad moderada de infección (75% o más) y la mayoría (80%) son asintomáticos. De esta manera, la mayoría de las personas infectadas con *S. mansoni* no manifiestan síntomas específicos excepto cuando la enfermedad avanza y los pacientes presentan el hígado y bazo comprometido (Alarcón de Noya y col., 2006), lo cual puede ocurrir hasta después de 20 años⁶.

⁶ Vida media del parásito (Katz y Rocha, 1991).

1.1.5.- Diagnóstico

Además de la encuesta clínica del paciente, orientada a dilucidar su procedencia y la ocurrencia de recientes contactos con cuerpos de agua de zonas endémicas, así como de síntomas inespecíficos de la enfermedad (crisis diarreicas, por ejemplo), la demostración y cuantificación microscópica de los huevos de *S. mansoni* en heces siguen siendo el “patrón de oro” para el diagnóstico de la esquistosomiasis, el cual es útil para el clínico a fin de pronosticar la morbilidad en el paciente y, para el epidemiólogo, para determinar la intensidad de la transmisión en un foco epidemiológico (Aguilar y col., 1999). A pesar de que la presencia de huevos en las heces es el criterio más seguro de infección activa, en Venezuela este método pierde sensibilidad debido a que las personas infectadas con *S. mansoni*, expulsan menos de 100 huevos/ gr de heces. En este sentido, la estrategia diagnóstica de la esquistosomiasis se basa en la utilización de métodos coprológicos y serológicos en conjunto para detectar personas infectadas (Alarcón de Noya, 2007a). Así, Alarcón de Noya y col., (1997) proponen el siguiente algoritmo a ser utilizado en trabajos de campo: el inmunoensayo de la fosfatasa alcalina (APIA⁷) o el ensayo de inmunoabsorción ligada a enzima con antígenos solubles de huevo tratados con

⁷ En inglés: Alkaline Phosphatase ImmunoAssay (Pujol y Cesari, 1990 citado en Alarcón de Noya y col., 1997).

metaperiodato de sodio/borohidrato de sodio (ELISA-SEA-SMP⁸) como primer “screening”, validados por la reacción circumoval (COPT⁹) para casos positivos.

1.1.6.- Tratamiento y control

El tratamiento y control de la esquistosomiasis en Venezuela se basa en la quimioterapia selectiva o individual con praziquantel (Alarcón de Noya y col., 2006), una droga que es efectiva contra todas las especies de *Schistosoma* (Aguilar y col., 1999).

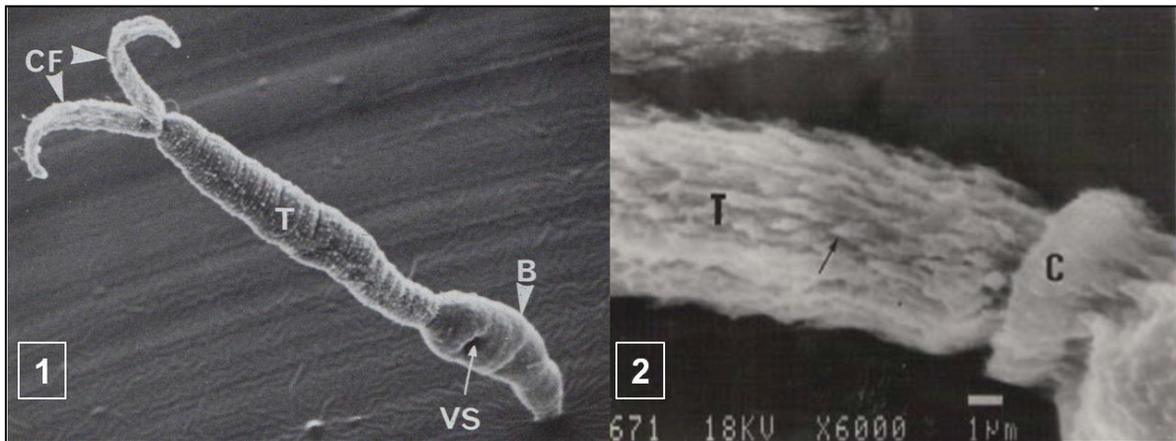
⁸ En inglés: **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - Soluble Egg Antigen with Sodium MetaPeriodate** (Alarcón de Noya y col., 2007).

⁹ En inglés: **CircumOval Precipitin Test** (Spencer y col., 1991 citado en Alarcón de Noya y col., 1997).

1.2.- Antecedentes

1.2.1.- La cercaria: morfología externa y ultraestructural de la superficie

Las cercarias de *Schistosoma mansoni* (Figura 4) son estadios larvales del parásito de gran movilidad. Observaciones al microscopio electrónico de barrido han demostrado que la cercaria está compuesta por un cuerpo cilíndrico y una larga cola bifurcada, la cual le sirve para desplazarse en el agua. Tiene totalmente cubierta la superficie con espinas dirigidas hacia atrás (de aproximadamente 1 μm de longitud) a excepción del anillo que une el cuerpo de la cola. La cercaria presenta unas distintivas ventosas oral y ventral (McLaren, 1980).



Tomado de McLaren, 1980.

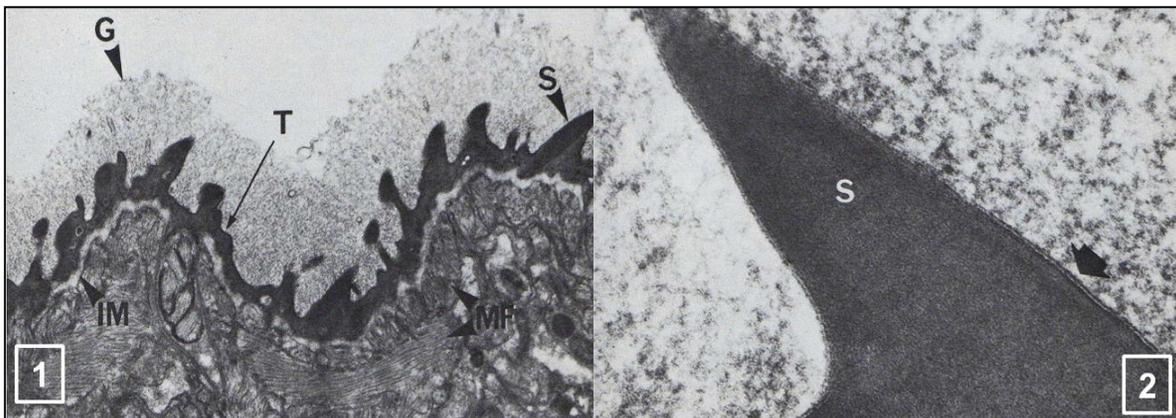
Tomada de Bin y col., 2007.

Figura 4. Morfología externa de la cercaria de *S. mansoni*.

1) Micrografía electrónica de barrido mostrando una cercaria unida al sustrato a través de su ventosa oral. B: cuerpo; VS: ventosa ventral; T: cola; CF: furca caudal (180X).

2) Micrografía electrónica de barrido mostrando el anillo que une el cuerpo (C) de la cola (T), ambos están cubiertos por espinas dirigidas hacia atrás (flecha) (6000X).

Varios autores han estudiado la ultraestructura de la superficie cercarial (Figura 5) (Smith y col., 1969; Morris, 1971; Hockley, 1970; 1973; Hockley and MacLaren, 1973; citados en McLaren, 1980). La larva entera está cubierta por un tegumento citoplasmático sincicial (de aproximadamente 0.5 μm y 0.2 μm de espesor en la región del cuerpo y la cola, respectivamente) encerrado entre dos membranas trilaminares (una externa y una interna o basal), cada una de 8.5 nm de espesor. Este tegumento contiene inclusiones como mitocondrias, espinas, cuerpos discoides y cuerpos cercariales característicos. La membrana trilaminar más externa está cubierta por un denso glicocalix de 1-2 μm de espesor (Samuelson y Caulfield, 1985).



Tomado de McLaren, 1980

Figura 5. Morfología ultraestructural de la superficie de la cercaria de *S. mansoni*

1) Micrografía electrónica de transmisión mostrando el glicocalix (G) de la cercaria y el tegumento (T) delgado y electrondenso. Una capa de material intersticial (IM) y dos capas musculares (ML) están debajo del tegumento. S: espina. (13000 X)

2) Micrografía electrónica de transmisión mostrando la membrana trilaminar externa del tegumento (flecha) y la naturaleza fibrilar del glicocalix. S: espina. (92000 X)

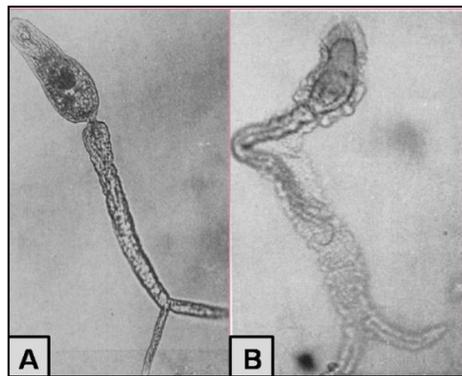
1.2.2.- El glicocalix: características y función

Estudios con microscopía de barrido, de transmisión y de inmunofluorescencia han demostrado la presencia de un abundante material fibroso (Hockley, 1972; Kemp, 1970) y granular (Nanduri y col., 1991) en el glicocalix de la cercaria cuyos componentes presentan aproximadamente, un peso molecular de 5×10^6 Da (Samuelson y Caulfield, 1985), el cual es sintetizado por la misma cercaria en la última etapa del desarrollo dentro del hospedador intermediario (Caulfield y col., 1988).

El glicocalix es una estructura compleja rica en carbohidratos (Xu y col., 1994; Nanduri y col., 1991) compuesto de oligosacáridos probablemente unidos a péptidos (Xu y col., 1994) o a lípidos (Pearce y col., 1991) que se cree forma parte integral de la membrana (Hockley, 1970, 1972; Kemp, 1970; Morris, 1971; Hockley y McLaren, 1973; Stein y Lumsden, 1973; citados en McLaren, 1980). Tinciones histoquímicas de cercarias intactas de *S. mansoni* muestran que el glicocalix contiene carbohidratos neutros y ácidos (Samuelson y Caulfield, 1985), pero reacciona *in situ* con pocas lectinas específicas para residuos de fucosa (Dalton y col., 1987) principal constituyente de las cadenas de carbohidratos del glicocalix (Caulfield y col., 1988). Con la premisa de que la infección con *Schistosoma mansoni* es iniciada con la penetración del cuerpo de la cercaria en la piel intacta del mamífero y no de la cola, Nanduri y col. (1991) separaron los cuerpos de las colas para caracterizar el glicocalix de cada uno a través de una combinación de cromatografías de afinidad y exclusión molecular, junto a métodos de análisis de composición de carbohidratos. Estos autores demostraron que el glicocalix del cuerpo está

constituido por 46% de fucosa y el de la cola por 84% de glucosa. Khoo y col. (1995) (citados en Cumming y Nyame, 1996), reportaron que las glicoproteínas del glicocalix de la cercaria contienen O-glicanos y empleando una combinación de cromatografía de afinidad con lectinas, análisis enzimático, químico y de espectrometría de masas, demostraron que los oligosacáridos contienen un esqueleto basal formado por trisacáridos repetidos de $[\rightarrow 3\text{GalNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\alpha 1\rightarrow]_n$ que están unidos a residuos de fucosa.

Desde la antigüedad se conoce la alta antigenicidad¹⁰ del glicocalix de la cercaria (Culbertson, 1936) y se ha demostrado que es el responsable de la reacción antígeno-anticuerpo que ocurre en la superficie de la cercaria (Kemp y col., 1973), conocida como cercario-reacción (CHR¹¹) (Vogel y Minning, 1949 citado por McLaren, 1980) (Figura 6).



Tomado de Stirewalt y Evans, 1955

Figura 6. Cercario-reacción (CHR)

Cercarias incubadas en suero normal de ratón (A) y en suero de ratón infectado (B)

¹⁰ Capacidad de una molécula para combinarse de forma específica con los productos finales de las respuestas anteriores (es decir, anticuerpos, receptores de superficie celular o ambos) (Goldsby y col., 2004).

¹¹ En alemán: Cercarien **H**üllen **R**eaktion (Vogel y Minning, 1949 citado por McLaren, 1980).

Basados en esta reacción, varios autores han tratado de identificar las macromoléculas antigénicas del glicocalix de la cercaria. En efecto, Payares y Simpson (1985) por radiomarcaje de la superficie cercarial con sondas no permeables, seguido por la solubilización de los componentes de la membrana superficial con detergentes, precipitación directa con concanavalina A-sefarosa y análisis electroforético, identificaron componentes glicoprotéicos de la superficie de la cercaria. La inmunoprecipitación de estos glicoconjugados radiomarcados y el análisis electroforético de los inmunocomplejos formados con diferentes sueros, permitió identificar y caracterizar glicoproteínas antigénicas (Payares y col., 1985b). Este conjunto de glicoproteínas de peso molecular entre 32-40 kDa, fueron reconocidos por una batería de antisueros entre los que encontramos: suero de conejo inmunizado con membranas tegumentarias de gusanos adultos, suero de conejo inmunizado con la glicoproteína de 32 kDa parcialmente purificada de membranas tegumentarias de adultos, suero crónico de ratón y suero de ratones vacunados con cercarias irradiadas.

El glicocalix activa el complemento por la vía alterna (Samuelson y Caulfield, 1986) y es reconocido *in vitro* por lectinas de unión a manosa (MBL¹²), las cuales podrían activar el complemento por esta vía o servir como opsonina facilitando el reconocimiento por células fagocíticas (Klabunde y col., 2000). Se ha demostrado que el glicocalix induce la proliferación de células B obtenidas de los bazos de cepas de ratones normales (Xu y col., 1993) y parece jugar un papel en el desarrollo de la protección inmune, ya que

¹² En inglés: **M**annan **B**inding **L**ectin (Klabunde y col., 2000).

cercarias atenuadas con radiación inducen una respuesta inmune protectora más fuerte que la producida por esquistosómulos en la misma condición (Sher y Benno, 1982). Al contrario, la inmunización con una preparación de glicocalix resultó en un incremento en la carga parasitaria sugiriendo que éste podría ejercer una función inmunosupresiva (Harn y col., 1989). Además, materiales liberados *in vitro* por las cercarias durante su transformación a esquistosómulos, suprimieron la proliferación *in vitro* de linfocitos de sangre periférica en respuesta a mitógenos (Vieira y col., 1986). Todas estas acciones podrían resultar en la disminución de la actividad anti-esquistosomular (Vieira y col., 1986), ya que la pérdida completa del glicocalix que acompaña la transformación cercaria-esquistosómulo es responsable de una reducción en el reconocimiento por anticuerpos y de la resistencia del juvenil a la muerte mediada por anticuerpos específicos (Samuelson y Caulfield, 1986).

McLaren (1980) recopiló las funciones del glicocalix que han sido sugeridas por otros autores:

- 1) Constituye una barrera protectora contra la baja presión osmótica del agua dulce durante la vida libre de la cercaria.
- 2) Protege a la membrana de daños mecánicos o químicos (se piensa que esta es una de las funciones primordiales que cumple el glicocalix).
- 3) Actúa como adhesivo para mantener unidas las cercarias entre ellas y al hospedador durante la penetración.
- 4) Protege contra las secreciones propias de sus glándulas de penetración.

- 5) Actúa como un “repelente de agua” facilitando el desplazamiento de la cercaria al nadar.

Estas funciones desaparecen con la pérdida del glicocalix que ocurre durante la penetración de la piel del hospedador y durante la transformación de cercaria a esquistosómulo (McLaren, 1980), lo cual ha sido relacionado con mecanismos importantes para la adaptación y supervivencia del trematodo a la vida parasitaria (Stirewalt y col., 1983 y Stirewalt, 1975; citados en Nanduri y col., 1991). Este desprendimiento de materiales de la cercaria, durante la penetración de la piel del hospedador, podría jugar un papel importante en la inducción de la respuesta inmune contra una exposición subsiguiente a cercarias (Veira y col., 1986). Igualmente, existe la posibilidad de que el glicocalix sea un agente etiológico de la respuesta inflamatoria que ocurre en la piel (Caulfield y col., 1988).

1.2.3.- Métodos de diagnóstico de la Esquistosomiasis

Un método de diagnóstico ideal debería tener las siguientes características (van Lieshout y col., 2000):

- 1) Ser aplicable en estudios de campo y permitir el procesamiento de gran número de muestras y de bajo costo.
- 2) Ser fácil de realizar sin requerir personal entrenado ni equipos complicados.

- 3) Ser rápido y dar resultados uniformes y reproducibles que sean de fácil interpretación.
- 4) Poseer alta sensibilidad¹³ y especificidad¹⁴ particularmente en áreas o comunidades con baja prevalencia e intensidad de infección.

Todos estos requerimientos no son fáciles de reunir y de hecho no existe un método de diagnóstico que los reúna a todos. De este modo, la elección de un método de diagnóstico particular, depende del campo de aplicación y de las condiciones logísticas y financieras (van Lieshout y col., 2000).

La importancia de detectar a personas infectadas con esquistosomiasis, especialmente aquellas con baja carga parasitaria, se resume en los siguientes puntos (de Vlas y Gryseels, 1992 citado en Alarcón de Noya y col., 2007a):

- 1) El grado de patología y el recuento de huevos no siempre son proporcionales.
- 2) Las infecciones no detectadas y no tratadas pueden ser responsables de la persistencia de la transmisión.
- 3) La proporción de infecciones no detectadas incrementa después de la quimioterapia, lo cual sobreestima la tasa de cura.

¹³ Capacidad de una técnica de detectar el mayor número de individuos verdaderamente enfermos (Rabello, 1997).

¹⁴ Capacidad de una técnica de ser siempre negativa en la ausencia de enfermedad, no ofreciendo falsos positivos (Rabello, 1997).

- 4) La persistencia de las infecciones de baja intensidad, pueden mantener una forma de inmunidad concomitante¹⁵ que podría interferir con los ensayos de vacuna.

Los métodos de diagnóstico para la detección de la esquistosomiasis pueden ser divididos en dos categorías: métodos parasitológicos o coprológicos y métodos inmunológicos o serológicos (van Lieshout y col., 2000).

1.2.3.1.- Métodos parasitológicos

El diagnóstico de certeza de la esquistosomiasis es el parasitológico, es decir, el hallazgo de huevos de *S. mansoni*. Para este fin se utiliza el examen de heces, la eclosión de miracidios, la biopsia rectal o la punción hepática. De éstos, el examen de heces debe ser el preferido. El método de Kato-Katz es el más utilizado debido a que el diagnóstico es más sensible, específico, práctico, rápido y de bajo costo (Katz y Rocha, 1991). Consiste en examinar microscópicamente una cantidad constante de heces tamizada (sin detritos grandes) entre una lámina portaobjeto y un papel celofán humedecido en solución clarificante de glicerina y verde de malaquita (Katz y col., 1972). Tiene la ventaja adicional de poder ser cuantitativo (Nº de huevos por gramo de heces) y, por ende, indicado para estudios epidemiológicos y para la evaluación terapéutica. Un examen de heces por el método de Kato-Katz tiene una especificidad de 100% y una sensibilidad de 50 huevos por

¹⁵ Resistencia parcial a la infección por *S. mansoni* que es estimulada por los parásitos adultos, cuyo efecto se ejerce únicamente sobre las formas en desarrollo como las cercarias y esquistosómulos a su paso por los tejidos (Aguilar y col., 1999).

gramo de heces (Rabello, 1997; Katz y Rocha, 1991). Sin embargo, ya que este análisis depende de la oviposición, no es útil para el diagnóstico de la esquistosomiasis en los primeros períodos de la fase aguda de la enfermedad (de 1-5 semanas) ni en infecciones unisexuales, pues en ninguno de los casos hay excreción de huevos (Chand y col., 2010). Por otro lado, en casos de baja carga parasitaria donde los pacientes expulsan hasta menos de 10 huevos por gramo de heces (Cesari y Alarcón de Noya, 1987), la sensibilidad disminuye mientras que la especificidad sigue siendo satisfactoria (Rojas-Marcos y col., 2009). Debido a la fluctuación diaria en la excreción de huevos, el análisis de al menos 3 tomas de heces por persona en diferentes días, podría aumentar la probabilidad de encontrar huevos y, por ende de detectar casos positivos (Rojas-Marcos y col., 2009). No obstante, para propósitos epidemiológicos, esto causa problemas de logística y el costo se incrementa (van Lieshout y col.; 2000 Teesdale 1985 citado en Alarcón de Noya y col., 2006). Alternativamente, la sensibilidad del método de Kato-Katz podría ser mejorada por métodos de concentración como los de sedimentación y filtración de muestras de heces (Polderman y col., 1994 citado en Alarcón de Noya y col., 2000), pero estas técnicas necesitan de tiempo y no son adecuadas para la búsqueda rutinaria de casos positivos de esquistosomiasis. Aunque algunos pueden abogar por la biopsia rectal para el diagnóstico de la esquistosomiasis cuando la carga parasitaria es baja, su sensibilidad no es más alta que la alcanzada por repetidos exámenes de heces (Rabello, 1992 citado en Alarcón de Noya y col., 2000). También es una técnica invasiva que puede ocasionar traumas físicos y/o psíquicos en los pacientes y por ello, no es aceptada para la búsqueda rutinaria de casos de esquistosomiasis (Katz y Rocha, 1991; Alarcón de Noya y col., 2000).

1.2.3.2.- Métodos inmunológicos

El diagnóstico inmunológico es, hasta el momento, sólo de presunción y no de certeza. Dos métodos son ampliamente aceptados: detección de antígenos y detección de anticuerpos específicos (Katz y Rocha, 1991).

1.2.3.2.1.- Detección de antígenos

Los parásitos vivos de *S. mansoni* excretan y segregan diferentes antígenos en la circulación del hospedador definitivo. Estos antígenos pueden ser clasificados de acuerdo al estadio de desarrollo del parásito en antígenos cercariales, antígenos asociados al gusano adulto (provenientes del tegumento o del intestino) y antígenos de huevo. Los principales antígenos circulantes provienen del grupo asociado al intestino del gusano adulto, que son liberados en la circulación del hospedador por regurgitación regular del contenido no digerido del tubo digestivo del parásito (van Lieshout y col., 2000). Muchos investigadores se han concentrado en dos glicoconjugados (van Lieshout y col., 2000) que presentan repetidos epítopes (Hamilton y col., 1998): antígeno circulante anódico (CAA¹⁶) y antígeno circulante catódico (CCA¹⁷) (van Lieshout y col., 2000). El desarrollo de anticuerpos monoclonal y/o policlonal mono específico ha hecho posible detectar CAA y CCA tanto en orina como en suero, a través de una ELISA (Hamilton y col., 1998). El hecho de poderse

¹⁶ En inglés: Circulating Anodic Antigen (van Lieshout y col., 2000).

¹⁷ En inglés: Circulating Cathodic Antigen (van Lieshout y col., 2000).

detectar estos antígenos en muestras de orina, ofrece una mayor ventaja que emplear suero, ya que es una forma de obtención de muestra no invasiva y que puede realizarse en estudios epidemiológicos (Disch y col., 1997; van Etten y col., 1996; citados en Hamilton y col., 1998). Este método tiene una especificidad de 100% y es útil para evidenciar infección activa y para evaluar la curación post-tratamiento. En lo que se refiere a sensibilidad, se ha reportado que existe una correlación positiva entre los niveles de antígenos circulantes y la tasa de excreción de huevos de *S. mansoni* (Deelder y col., 1989a; de Jonge y col., 1991; de Clerc y col., 1995; van Lieshout y col., 199b; citados en Hamilton, 1998). Por tanto, la sensibilidad de detección de antígenos disminuye en situaciones donde la prevalencia y/o intensidad de infección son bajas. Otras desventajas que presenta este método es el costo elevado y la dependencia de la producción de anticuerpos monoclonales y/o policlonales mono-específicos (Rabello, 1997).

1.2.3.2.2.- Detección de anticuerpos específicos

Los antígenos de todos los estadios del ciclo de vida de *S. mansoni*, de una u otra forma, han sido analizados como posibles blancos de potencial inmunodiagnóstico.

Huevos

La reacción circumoval (COPT) ha sido considerado el ensayo inmunológico de mayor especificidad y sensibilidad (Alarcón de Noya y col., 2006). Consiste en incubar

suero del paciente con huevos viables del parásito por 48 horas a 37°C. La reacción positiva se visualiza por la formación de precipitados característicos alrededor del huevo que se deben al reconocimiento de los antígenos de secreción-excreción por parte de anticuerpos específicos presentes en el suero del paciente. Tiene la ventaja de ser útil como criterio de curación post-tratamiento, pues sus títulos tienden a disminuir luego de un año de aplicada la quimioterapia. Sus inconvenientes son el tiempo prolongado para su evaluación y la necesidad de una fuente de huevos viables (Aguilar y col., 1999). Por ello, es considerada una técnica de referencia o de validación de casos positivos detectados por otros ensayos de diagnóstico (Aguilar y col., 1999; Noya y col., 2002 citado en Alarcón de Noya y col., 2006).

El ensayo inmunoenzimático con antígenos solubles de huevo (ELISA-SEA) es preferido para el diagnóstico a gran escala. Cumple los requerimientos de bajo costo, reproducibilidad, objetividad y resultados rápidos. A pesar de tener una alta sensibilidad (99%), sobreestima la prevalencia de la esquistosomiasis debido principalmente a la persistencia de los anticuerpos para estos antígenos por tiempo prolongado (por lo que no permite diferenciar entre exposición reciente e infección activa) así como produce reacción cruzada¹⁸ con otras helmintiasis (Rojas-Marcos y col., 2009). De hecho, se ha reportado reacción cruzada entre *S. mansoni* y otros parásitos como *Fasciola hepática*, *Paragonimus westermani* y *Trichinella spiralis*, pero en estos casos particulares esta reacción no interfiere en el diagnóstico de la esquistosomiasis ya que las áreas endémicas de estas parasitosis

¹⁸ Ocurre cuando dos antígenos diferentes comparten un epítipo (porción de un antígeno a la que se une un anticuerpo) común o muy similar (Goldsby, 2004)

usualmente no se solapan (Alarcón de Noya y col., 1996). Estos mismos autores (Alarcón de Noya y col., 1996) mostraron que helmintos intestinales pueden interferir en la vigilancia seroepidemiológica de la esquistosomiasis cuando es usado ELISA-SEA y que particularmente es notable en áreas endémicas de esquistosomiasis con una alta prevalencia de ancilostomídeos. Para solventar este inconveniente y reducir el número de falsos positivos, Alarcón de Noya y col., (2000) hicieron una modificación de ELISA-SEA tratando los antígenos con metaperiodato de sodio/borohidrato de sodio (ELISA-SEA-SMP). La especificidad de ELISA-SEA-SMP mejoró de 73 a 97%, reduciendo el número de falsos positivos y manteniendo la sensibilidad de 99% (Alarcón de Noya y col., 2000).

Gusanos adultos

El inmunoensayo de la fosfatasa alcalina (APIA) (Pujol y col., 1989; Pujol y Cesari, 1990; citados en Alarcón de Noya y col., 1997) es una técnica que detecta anticuerpos contra la fosfatasa alcalina (Mr 260 kDa) presente en un extracto butanólico (BE) del tegumento de gusanos adultos de *S. mansoni* (Payares y col., 1984 citado en Alarcón de Noya y col., 1997). Posee una alta sensibilidad (89%) y especificidad (100%) no mostrando falsos positivos con parásitos intestinales (Alarcón de Noya y col., 1997). Adicionalmente, es de bajo costo pues no requiere de un conjugado enzimático y el BE es estable y reusable. Sin embargo, al igual que ELISA-SEA-SMP, no es capaz de confirmar infecciones activas y puede permanecer positivo mientras otros análisis son negativos durante infecciones unisexuales (COPT, Kato-Katz, por ejemplo), una condición común en áreas de baja

transmisión (Alarcón de Noya y col., 1997). Este análisis en conjunto con ELISA-SEA-SMP ha sido utilizado para la búsqueda de casos de esquistosomiasis (Noya y col., 2002 citado en Alarcón de Noya y col., 2006).

Cercarias y esquistosómulos

Los antígenos de larvas de esquistosoma (cercarias y esquistosómulos) raramente han sido usados para análisis de serodiagnóstico, ya que se ha reportado que no proporcionan los niveles de sensibilidad y especificidad obtenidos con preparaciones de huevos o de gusanos adultos. Esto puede deberse al período relativamente corto en que el hospedador es expuesto a los antígenos larvales durante el curso de la infección y a la pobre inmunogenicidad¹⁹ de la larva migratoria (Hamilton y col., 1998). Esto puede ayudar a explicar por qué hasta ahora no existe un método inmunológico satisfactorio para el diagnóstico de infecciones por esquistosoma antes de que ésta se haga patente (Hamilton y col., 1998). Sin embargo, se ha demostrado que la respuesta de anticuerpos durante la infección es dirigida contra epítopes carbohidratos de glicoproteínas inmunógenas de huevo (Hamilton y col., 1998) y que existe reactividad cruzada en esta respuesta anti-carbohidratos con antígenos de cercarias y gusanos adultos (Eberl y col., 2001). Por lo tanto, una preparación de antígenos cercariales podría ser tan eficiente como la de gusanos adultos o huevos para detectar casos positivos de esquistosomiasis. De hecho, la cercario-

¹⁹ Capacidad de una molécula para inducir una respuesta inmunitaria humoral o mediada por células, o ambas (Golsby y col., 2004).

reacción (Vogel y Minning, 1949 citado por McLaren, 1980) ha sido utilizada como una herramienta para el diagnóstico de la esquistosomiasis (Figura 6). Esta reacción consiste en incubar cercarias vivas con suero sospechosos por 24 horas a 4°C (Cesari y Alarcón de Noya, 1987). La reacción positiva se visualiza mediante la formación de un precipitado que envuelve completamente la cercaria y la inmoviliza y se debe al reconocimiento de componentes de la membrana externa, específicamente del glicocalix, por anticuerpos específicos presentes en el suero del paciente (Kemp y col., 1973).

Recientemente, Chand y col. (2010) desarrollaron un nuevo ELISA para la detección de anticuerpos anti-esquistosoma usando un extracto de cercarias de *S. mansoni*. El extracto antigénico de cercarias fue preparado por un método simplificado para la producción de esquistosómulos (Colley y col. 1974, citado en Chand y col., 2010) que concentra componentes del glicocalix de la cercaria y material glandular en PBS a pH 7.2. Estos autores demostraron que el serodiagnóstico de la esquistosomiasis, en áreas no endémicas usando antígenos cercariales, es equivalente al realizado con antígenos solubles de huevo (SEA) en cuanto a sensibilidad y especificidad. Además sugieren que por ser las cercarias más fáciles de producir que los huevos y por requerirse un número reducido de animales de laboratorio para su obtención, el diagnóstico de la esquistosomiasis en estas áreas usando antígenos de cercarias, podría reemplazar al tradicional ELISA-SEA. Sin embargo, el uso de detergentes cuyas propiedades permiten formar interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas con macromoléculas de membrana solubilizándolas mediante la formación de micelas (McKee y McKee, 2003), podría aumentar el rendimiento en el

aislamiento y purificación de componentes del glicocalix, del cual se conoce su alta antigenicidad (Culbertson, 1936).

Whitfield y col.(2003) demostraron por microscopía electrónica de barrido e infecciones experimentales con piel humana entera y diferenciada, estrato de córneas y cultivos de keratinocitos humanos, que el 88% de las colas de cercarias invaden la piel del hospedador junto con sus cuerpos y sugieren que ésta conducta es una adaptación específica que lleva una mezcla de antígenos larvales (superficiales e internos) a la piel del hospedador humano para aumentar la eficiencia protectora anti-larval de la inmunidad concomitante. Por su parte, Samuelson y Caulfield (1986) aseguran que la transformación cercaria-esquistosómulo está asociada con la liberación del glicocalix sólo del cuerpo de las cercarias y que por tanto las colas son perdidas al inicio de la infección y no participan en interacciones parásito-hospedador. Estos mismos autores (Samuelson y Caulfield, 1986) mostraron por microscopía electrónica de barrido que el glicocalix de la cola podría activar el complemento por la vía alterna de manera más eficiente a como lo hace el del cuerpo, pues éste es desintegrado cuando cercarias vivas son incubadas con suero normal humano mientras que el del cuerpo permanece intacto. Esto podría deberse a que el glicocalix de la cola de la cercaria no posee la misma composición de carbohidratos del cuerpo (Nanduri y col., 1991) pudiendo disparar con más eficiencia la respuesta inmune del hospedador. De cualquier manera, la diferencia que podría ser observada en el estudio de la antigenicidad del glicocalix de cuerpos y colas por separado, podría arrojar información relevante en la detección de la enfermedad por métodos serodiagnósticos.

Se ha demostrado que la fase aguda de la esquistosomiasis puede ser distinguida de la fase crónica a través del análisis de los títulos de isotipos de anticuerpos específicos a antígenos solubles de huevo, antígenos solubles de gusano adulto o a la hemocianina de lapa *Megathura crenulata* (KLH) (Valli y col., 1999; Beck y col., 2008). La posibilidad de que los antígenos de cercarias puedan ser utilizados para discriminar entre infecciones aguda y crónica ha sido estudiada. A través de ELISA se ha demostrado que pacientes con infección aguda mostraron ser más reactivos a antígenos de cercarias que a antígenos de gusanos adultos y huevos (Gazzineli y col., 1985 citado en Hamilton y col., 1998). Asimismo, los títulos de anticuerpos contra antígenos de cercarias resultaron ser más altos que el de los anticuerpos contra gusanos adultos y huevos en pacientes con infección aguda (Lunde y Ottesen, 1980 citado en Hamilton y col., 1998). Estos resultados son potencialmente importantes en el diagnóstico diferencial de la infección aguda y crónica de la esquistosomiasis.

1.3.- Justificación

En Venezuela, la esquistosomiasis es una enfermedad más de tipo recreacional que ocupacional, por lo que su detección se hace difícil por la baja morbilidad existente y la baja sensibilidad de los métodos de diagnóstico coprológico. Dado que las cercarias han sido utilizadas en el diagnóstico serológico de la Bilharziasis, las glicoproteínas presentes en la superficie de estas larvas infectantes serán de nuestro interés para el desarrollo de este trabajo. El empleo del modelo experimental *S. mansoni*-ratón permite simular los parámetros que rigen las fases aguda y crónica de la enfermedad en el hombre, lo que aportará información aplicable al diagnóstico diferencial en pacientes con infección aguda y crónica en áreas de baja transmisión como ocurre en Venezuela.

1.4.- Objetivos de la investigación

1.4.1.- Objetivo general

Estudiar las glicoproteínas presentes en el glicocalix de las cercarias como posibles herramientas para el diagnóstico diferencial de la fase aguda y crónica de la esquistosomiasis, con posible aplicación a pacientes con bajas cargas parasitarias como ocurre en Venezuela.

1.4.2.- Objetivos específicos

- 1) Identificar polipéptidos antigénicos presentes en el glicocalix de las cercarias mediante su reconocimiento por anticuerpos producidos en infecciones experimentales aguda y crónica (mixta y unisexual).
- 2) Aislar, purificar e identificar los componentes glicoprotéicos del glicocalix de la cercaria de *Schistosoma mansoni*.
- 3) Identificar epítopes (tipo glicano o peptídico) presentes en las glicoproteínas antigénicas reconocidos por suero de infección aguda y crónica.
- 4) Evaluar la reacción cruzada con suero contra otras infecciones.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- Material biológico

En este trabajo se utilizó el parásito *Schistosoma mansoni* proveniente de una cepa originaria de Puerto Rico. Caracoles *Biomphalaria glabrata* del mismo origen fueron utilizados como hospedador intermediario. Como hospedadores definitivos, se emplearon hámsters dorado (*Mesocricetus auratus*) y ratones NMRI (*Mus musculus*). Estas especies son mantenidas en el laboratorio de Inmunología y Quimioterapia del Instituto de Biología Experimental (IBE), Facultad de Ciencias, U.C.V., en concordancia con todas las normas de bioseguridad establecidas.

2.2.- Reactivos químicos y suministros

Acrilamida, bis-acrilamida, PMSF, Tris, ConA, ConA-agarosa, α -metil-D-manosa, agarosa, buffer amidiol, NP, metaperiodato de sodio, borohidrato de sodio, albúmina sérica bovina y otros reactivos y sales de uso habitual en el laboratorio fueron adquiridos previamente de la casa SIGMA. Tritón X-100, peroxidasa y p-NPP fueron de los laboratorios BDH, Taab y Kochligh, respectivamente. Los marcadores de peso molecular fueron preteñidos de BIO-RAD y los anticuerpos anti-IgG de ratón conjugado a la enzima peroxidada fueron adquiridos de los laboratorios Pierce Ltd. Los demás reactivos utilizados fueron de calidad analítica y suministrados por los proveedores locales.

2.3.- Mantenimiento del ciclo evolutivo del parásito

Las actividades que se realizan rutinariamente para el mantenimiento del ciclo biológico de *S. mansoni* en condiciones de laboratorio y para la obtención del material necesario para desarrollar los diferentes experimentos del presente trabajo fueron las siguientes:

2.3.1.- Obtención de miracidios a partir de huevos presentes en hígados de animales infectados

El hígado de un hospedador definitivo (hámster y/o ratón) con más de 6 semanas de infección, fue extraído, cortado y licuado por 30 segundos con solución salina hipertónica (NaCl al 1,7%). El homogeneizado fue pasado por tamices de porosidad decreciente (420, 177, 144 y 44 μm de diámetro) y lavado exhaustivamente con la misma solución. Seguidamente, la suspensión de huevos fue recogida del tamiz de menor poro (44 μm de diámetro) en agua deionada y se colocó bajo una lámpara de 100 W por 30-45 minutos para inducir la eclosión de los huevos (Cesari y Alarcón de Noya, 1987).

2.3.2.- Infección mixta y unisexual de caracoles sanos de *Biomphalaria glabrata*

Para la infección mixta, caracoles sanos de *Biomphalaria glabrata* de 0.5-1 cm de diámetro fueron infectados individualmente con 5 miracidios c/u en placas de cultivo con tapa (aproximadamente 96 pozos c/u). Se permitió que procediera la infección a temperatura ambiente por toda la noche, luego estos caracoles fueron trasladados a un

acuario con agua de clorada y mantenidos en la oscuridad a 28°C por 30 días. Para la infección unisexual, los caracoles fueron infectados con 1 sólo miracidio y colocados en un acuario diferente en las mismas condiciones (Cesari y Alarcón de Noya, 1987).

2.3.3.- Obtención de cercarias a partir de caracoles de *Biomphalaria glabrata* con infección mixta y unisexual

Después de 30 días de infección, los caracoles con infección mixta se colocaron en grupos de 10 en 30 ml de agua de clorada bajo un bombillo de 100W por aproximadamente 1 hora para estimular la salida de cercarias. Éstas fueron colectadas cuidadosamente utilizando un colador para retener los desechos de los caracoles. Los caracoles con infección unisexual se colocaron individualmente en 10 ml de agua de clorada y las cercarias se colectaron de la misma forma (Cesari y Alarcón de Noya, 1987).

2.3.4.- Infección del hospedador definitivo (hámster y/o ratón)

Hámsters jóvenes previamente anestesiados con nembutal sódico (750 mg de nembutal, 12.5 mL de alcohol absoluto y 112,5 mL de agua destilada; inyección: 0.2 mL/20gr del peso del animal), fueron infectados con 1000 cercarias, provenientes de caracoles con infección mixta para preservar la cepa, aplicando la técnica del anillo descrita por Smithers y Terry (1965).

Para la realización de los experimentos, 2 grupos de 15 ratones jóvenes previamente anestesiados fueron infectados con 100 y 50 cercarias mixtas, respectivamente. Otros 3 grupos de 4 ratones con 20 cercarias mixtas y 250 cercarias hembras o machos, respectivamente, con la misma técnica (Smithers y Terry, 1965).

2.3.5.- Obtención de gusanos juveniles y adultos a partir de hospedadores definitivos (hámster y/o ratón) infectados experimentalmente con cercarias de *S.mansoni*

Hámster y/o ratones infectados fueron sacrificados con una sobredosis de solución anestésica y enseguida se tomó una muestra sanguínea por punción cardíaca para obtener el suero sanguíneo (ver apartado 2.4.). Posteriormente, se obtuvieron los gusanos desde la vena porta mesentérica de los animales según la técnica de perfusión del corazón con solución salina citrada descrita por Smithers y Terry (1965). Estos gusanos fueron recogidos, contados e identificados bajo la lupa, luego se comprobó bajo el microscopio la presencia y viabilidad de los huevos, así como la presencia de pigmento bilharziano en muestras de hígado e intestino.

Para evaluar la fase aguda de la infección, grupos de 3 a 4 ratones previamente infectados con cercarias mixtas fueron sacrificados semanalmente durante 8 semanas post-infección. Los ratones infectados con 100 cercarias fueron autopsiados en las primeras 4 semanas post-infección y, los infectados con 50 cercarias, en las 4 semanas restantes. El inóculo de 100 cercarias se aplicó para lograr un estímulo antigénico más fuerte en los animales, ya que durante las primeras 4 semanas post-infección hay ausencia de huevos,

principal estímulo antigénico durante la infección con *S. mansoni* (Eberl y col., 2001). A partir de las 4 semanas post-infección, se redujo el inóculo a 50 cercarias ya que aproximadamente en este período comienza la oviposición (Pearce y MacDonald, 2002).

Después de 16 semanas post-infección, fueron sacrificados los grupos de ratones infectados con 20 (infección mixta) y 250 (infección unisexual) cercarias para evaluar la fase crónica de la infección. El inóculo de 20 cercarias mixtas se realizó para garantizar la sobrevivencia de los ratones durante el experimento y el de 250 cercarias unisexuales (hembras o machos), igualmente para lograr un estímulo antigénico más fuerte en los animales debido a la ausencia de huevos.

2.4.- Obtención de suero sanguíneo

Los sueros fueron obtenidos a partir de la muestra sanguínea extraída por punción cardíaca. Para esto, la sangre fue incubada a 37°C por 1 hora y toda la noche a 4 °C, luego de lo cual el suero fue separado mediante centrifugación a 400 g por 10 minutos y guardado a -20 °C hasta su uso.

2.5.- Cercario-reacción (CHR)

En una lámina escavada se mezclaron 50 µl de una suspensión de cercarias (5-10 cercarias) junto con 50 µl del suero a evaluar. Estas láminas se colocaron en una cámara húmeda a 4 °C por 24 horas y se examinaron bajo el microscopio (100X). Se estableció

como criterio de positividad de la reacción, la formación de una membrana irregular evidente, tipo envoltura, alrededor de todo el cuerpo de la cercaria (Cesari y Alarcón de Noya, 1987).

2.6.- Coloración de cercarias con Giemsa

Las cercarias se colocaron sobre una lámina portaobjeto y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se fijaron con metanol al 100% y luego se lavaron brevemente con agua corriente para finalmente colorearlas con giemsa diluida 1:20 en agua destilada durante 1 hora. El exceso de colorante fue removido con agua corriente y se dejó secar al aire.

2.7.- Actividad enzimática de la fosfatasa alcalina

Para seguir el proceso de extracción, identificación y aislamiento de componentes antigénicos de los extractos de cercarias, se utilizó la fosfatasa alcalina como marcador enzimático, una glicoproteína presente en la superficie de la cercaria de *S. mansoni* que contiene residuos de glucosa y/o manosa en su estructura (Payares y col., 1984). Esta enzima fue determinada midiendo la tasa de hidrólisis de p-nitrofenol fosfato (p-NPP) a 37°C en un volumen final de 0.2 ml conteniendo 50 mM de tampón amidol pH 9.5, 1 mM de p-NPP y 1 mM de MgCl₂. La reacción fue detenida con la adición de 0.8 mL de 0.5 N de NaOH y la absorbancia del producto de reacción, el nitrofenol (NP), se leyó a 405 nm. Una

curva estándar con NP (5-100 μM) fue preparada para calcular los micromoles de sustrato hidrolizado (Payares y col. 1984).

2.8.- Preparación de extractos de superficie (glicocalix) de cercarias

2.8.1.- Separación de cercarias en cuerpos y colas

La suspensión de cercarias (ver apartado 2.3.3.) fue concentrada añadiendo 40 $\mu\text{g/ml}$ de fenergan²⁰ y centrifugada a 650 g por 2 minutos. El sedimento resultante fue resuspendido en 1 ml de agua destilada y sometido a 5 pases sucesivos por una aguja de 21x1 ½” con jeringas de insulina a 4 °C. Inmediatamente, esta preparación fue resuspendida en 2 ml de agua destilada y dejada en reposo por 3 minutos a 4 °C para dejar sedimentar los cuerpos que son más pesados que las colas. Posteriormente, se separó 1 ml de sobrenadante (que contiene las colas) del sedimento (que contiene los cuerpos) y se repitió este procedimiento al menos 10 veces para finalmente centrifugar cuerpos y colas a 650 g por 2 minutos (Ramalho-Pinto y col., 1984 modificado)

²⁰ Fármaco anti-histamínico (fenotiazina) con actividad inmovilizante sobre la cercaria de *S. mansoni* (Payares y Ercoli, 1978).

2.8.2.- Elección del detergente a utilizar

Se hizo un ensayo para determinar el detergente que sería usado para la extracción del glicocalix y para el resto de los experimentos. Para esto, 3 grupos de 3000 cercarias concentradas (apartado 2.8.1), fueron resuspendidas en 0.5 ml de triton X-100 al 1%, 2 mM de PMSF en PBS (Tampón Fosfato Salino) pH 8.2, nonidet P-40 al 0.5% y deoxicolato de sodio al 0.5%, respectivamente. Estas preparaciones fueron sometidas a 50 pases sucesivos por una aguja de 21x1 ½” con jeringas de insulina a 4 °C para posteriormente ser incubadas a la misma temperatura por 1 hora y centrifugadas a 23.000 g por 10 minutos (Ramalho-Pinto y col., 1984 modificado). A estos extractos se le determinó la actividad de la fosfatasa alcalina. Debido a que el extracto en deoxicolato de sodio obtuvo mayor actividad enzimática de la fosfatasa alcalina, fue elegido para la extracción del glicocalix. Sin embargo, este detergente precipitó en KRT (Tampón Ringer Tris) pH 7.4, por lo cual no fue usado en el ensayo de purificación de la fosfatasa alcalina y glicoproteínas del glicocalix de la cercaria. En su lugar, se utilizó el triton X-100 en el resto de los experimentos.

2.8.3- Separación del glicocalix de cercarias completas, de cuerpos y de colas mediante solubilización en detergente

Los sedimentos de cercarias completas, de cuerpos y de colas por separado fueron resuspendidos en 0.5 ml de triton X-100 al 1%, 2 mM de PMSF en KRT pH 7.4 ó en 0.5 ml de deoxicolato de sodio al 0.5%, 2 mM de PMSF en PBS pH 8.2. Igualmente, estas preparaciones fueron sometidas a 50 pases sucesivos por una aguja de 21x1 ½” con jeringas

de insulina a 4°C para posteriormente ser incubadas a la misma temperatura por 1 hora y centrifugadas a 23.000 g por 10 minutos (Ramalho-Pinto y col., 1984 modificado). Los sobrenadantes obtenidos se identificaron como: extracto del glicocalix de cercarias completas (Ec), de cuerpos (Eb) y de colas (Et).

2.8.4- Antigenicidad de los extractos del glicocalix de cercarias

Para evaluar y garantizar la antigenicidad de los extractos de cercarias preparados, se utilizó la técnica de inmunodifusión doble de Outcherlony (Cesari y Alarcón de Noya, 1987) con suero crónico de ratón. Los geles de 1,1 % de agarosa en tampón veronal fueron preparados sobre láminas portaobjetos. Estas láminas se colocaron en una cámara húmeda a 4 °C por 24 horas y se observaron las bandas de precipitación con luz indirecta. Luego de 3 lavados con NaCl al 0.85% de 30 minutos c/u, los geles fueron secados para posteriormente teñirlos con azul de Coomassie (metanol al 25% v/v, ácido acético glacial al 10% v/v, azul de Coomassie G-250 al 0.005% p/v, en agua destilada).

2.9.- Aislamiento de glicoproteínas de los extractos del glicocalix de cercarias por cromatografía de afinidad en concanavalina A-agarosa

Los componentes glicoprotéicos de los extractos de cercaria solubilizados en triton X-100 fueron separados en una columna de concanavalina A-agarosa (ConA-agarosa) de 1mL. La columna se lavó con tampón de equilibrio (triton X-100 al 0.1 % en KRT pH 7.4)

para luego cargar la muestra. Las proteínas que no se enlazaron fueron eluidas lavando la columna con 10 volúmenes del tampón de equilibrio, mientras que las que se enlazaron fueron eluidas con 10 volúmenes del mismo tampón conteniendo 0.5 M de α -metil-D-manosa como azúcar competidor. Fracciones de 2 ml fueron recogidas y a cada una de éstas, se le determinó la actividad de la fosfatasa alcalina. Se juntaron las fracciones en donde eluyeron las proteínas que no se unieron a la columna (F1) y aquellas con mayor actividad enzimática (F2). La antigenicidad de estas fracciones (F1 y F2) fue evaluada por inmunodifusión doble de Outcherlony (apartado 2.8.4.).

2.10.- Composición polipéptica de los extractos experimentales mediante SDS-PAGE

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE²¹) fue ejecutada bajo condiciones reductoras y disociantes acorde con la técnica descrita por Laemmli (1970). Para esto, dichas muestras fueron diluidos 1:1 en tampón de muestra 2X (2 ml de agua destilada, 0.5 ml de 0.5 M de Tris-HCl, pH 6.8, 0.4 ml de glicerol, 0.8 ml de SDS al 10%, 0.2 ml de 2- β -mercaptoetanol y 0.1 ml de azul de bromofenol al 0.05%) y hervidas a 100 °C durante 3 minutos para luego ser cargados y separados en geles de poliacrilamida al 12,5% a voltaje constante (120 V) por aproximadamente 1 ½ hora. Los marcadores de peso molecular usados fueron preteñidos de BIO-RAD que incluyeron: miosina (206,3 kDa), β -galactosidasa (118,1 kDa), albúmina sérica bovina (97,3 kDa), albúmina de huevo (54,8 kDa), anhidrasa carbónica (37,6 kDa),

²¹ En inglés: Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (Laemmli 1970).

inhibidor de tripsina (29,4 kDa), lisozima (17,5 kDa) y aprotinina (6,7 kDa), los cuales corrieron en paralelo.

2.10.1.- Tinción con nitrato de plata

Una réplica de los geles de electroforesis corridos fueron teñidos con nitrato de plata, según la técnica descrita por Merrill y col. (1982), para visualizar las proteínas totales de las muestras con alta sensibilidad. Para esto, los geles se fijaron por 20 minutos en una solución de metanol al 50% y ácido acético al 12% luego de lo cual, se realizaron 3 lavados de 10 minutos c/u con agua destilada. Posteriormente, los geles se incubaron en solución A (0.0034 M de dicromato de potasio y 0.0032 M de ácido nítrico) por 5 minutos con agitación, y luego en solución B (0.012M de nitrato de plata) por 20 minutos. Al final, para revelar las proteínas, los geles se incubaron en solución C (0.28 M de carbonato de sodio, 0.5 ml/L de formaldehído) hasta verse las bandas. La reacción se detuvo con ácido acético al 1%.

2.11.- Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa desde el gel de electroforesis

La electrotransferencia se realizó siguiendo el protocolo descrito por Towbin y col. (1979) con el objetivo de realizar las pruebas restantes en un soporte sólido. Para esto, las muestras separadas en los geles de poliacrilamida (apartado 2.10) fueron transferidos como

una réplica a papel de nitrocelulosa, durante toda la noche a 4 °C y a voltaje constante (30 V).

2.11.1.- Identificación de proteínas y glicoproteínas totales en papel de nitrocelulosa

Para visualizar las proteínas totales transferidas y la calidad de transferencia al papel de nitrocelulosa, se sumergió una tira de éste (0,4 cm de ancho) en colorante rojo Ponceau al 1% en ácido tricloroacético al 5% hasta verse las bandas. La coloración se detuvo con agua destilada.

Las glicoproteínas totales fueron identificadas en base a su afinidad con la lectina ConA. Para esto, tiras de papel de nitrocelulosa (0,4 cm de ancho) fueron incubadas en solución de bloqueo (albúmina sérica bovina al 3%, NaCl al 0.9%, 10 mM de Tris-HCl pH 7.4) durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, una tira de papel de nitrocelulosa bloqueada se incubó por 2 horas a temperatura ambiente, en solución de ConA (1mg/ml de ConA en albúmina sérica bovina al 1.5%, NaCl al 0.9%, Tris-HCl de 10 mM pH 7.4) y otra en la misma solución conteniendo 0,4 M de α -metil.D-manosa como azúcar competidor. Después de la incubación, se removió la ConA no enlazada con 6 lavados de 5 minutos c/u en solución de lavado (NaCl al 0.9%, 10 mM de Tris-HCl pH 7.4). Por último, las tiras se incubaron en solución de peroxidasa (1mg/ml de peroxidasa en albúmina sérica bovina al 1.5%, NaCl al 0.9%, 10 mM de Tris-HCl pH 7.4) por 2 ½ horas a temperatura ambiente, para luego lavar nuevamente y revelar las bandas de glicoproteínas. Para esto, las tiras se incubaron en solución de revelado (15 mg de cloronaftol en 5 ml de metanol, luego

diluir en 25 ml de 20 mM de tampón Tris-HCl pH 7.6 y finalmente agregar 15 µl de H₂O₂ al 30%) hasta que se vieran las bandas y la reacción se detuvo con agua destilada (Weiss y col., 1991 modificado).

2.11.2.- Identificación de proteínas antigénicas mediante la técnica de inmunoblot

El reconocimiento de proteínas antigénicas fue llevado a cabo mediante la técnica de inmunoblot (Towbin y col., 1979). Para ello, el espectro total de proteínas inmovilizadas en tiras de papel de nitrocelulosa (0.4 ó 3.5 cm de ancho, dependiendo del experimento), fueron incubadas en solución de bloqueo (albúmina sérica bovina al 3%, NaCl al 0.9%, 10 mM de Tris-HCl pH 7.4) durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, estas tiras bloqueadas se incubaron con el antisuero diluido en solución de incubación de anticuerpo (albúmina sérica bovina al 1.5%, NaCl al 0.9%, 10 mM de Tris-HCl pH 7.4) durante toda la noche a 4 °C, luego se removieron los anticuerpos no enlazados, con 6 lavados de 5 minutos c/u en solución de lavado (NaCl al 0.9%, 10 mM de Tris-HCl pH 7.4). Finalmente, las tiras fueron incubadas con el anticuerpo secundario (anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa) diluido 1: 2000 en la misma solución de incubación de anticuerpo por 2 horas a temperatura ambiente, después se realizaron 6 lavados de 5 minutos c/u. Para reducir el “background”, el último lavado se realizó con tritón X-100 al 0.01%, SDS al 0.005%, albúmina sérica bovina al 1.5%, NaCl al 0.9% en 10 mM de Tris-HCl pH 7.4, para proceder a revelar las bandas de antígenos con solución de revelado (apartado 2.11.1). Los antisueros obtenidos en las primeras 3 semanas post-infección se diluyeron 1:25, los de las

semanas 4-7 post-infección 1:50 y los de las semanas 8 y 16 (mixta o unisexual) así como el suero anti-*T. cruzi*, se les hizo una dilución 1:100.

2.11.3.- Identificación de epítopes (tipo glicano o peptídico) de glicoproteínas antigénicas mediante tratamiento con metaperiodato de sodio/borohidrato de sodio

Los antígenos glicoprotéicos del glicocalix de las cercarias fueron deglicosilados por oxidación con metaperiodato de sodio seguido por reducción con borohidrato de sodio, con el objeto de identificar los epítopes (tipo glicano o peptídico) antigénicos reconocidos por los sueros experimentales, tal y como fue realizado por Alarcón de Noya y col. (2000). Para esto, las tiras bloqueadas fueron incubadas en 2 mM de metaperiodato de sodio en 50 mM de tampón acetato pH 7.4, en la oscuridad, a temperatura ambiente y durante 1 hora. Después de 1 lavado de 10 minutos con tampón acetato, las tiras fueron incubadas en 50 mM de borohidrato de sodio en PBS pH 7.4, por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados de 5 minutos c/u con NaCl al 0.9%, 10 mM de Tris-HCl pH 7.4, se procedió a realizar el inmunoblot como fue descrito en el apartado 2.11.2.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1.- Anticuerpos anti-glicocalix a lo largo del desarrollo de una infección por *S. mansoni*

En la Tabla III mostramos los resultados obtenidos en el estudio realizado para evaluar la aparición de anticuerpos contra el glicocalix cercarial a lo largo del desarrollo de la infección realizada en grupos de ratones. Como podemos observar, los primeros vermes fueron detectados a los 28 días después de la infección. Para esta fecha no se detectaron huevos del parásito ni en hígado ni en intestino. A partir de la 5ta semana de infección (35 días), tanto vermes como huevos inmaduros fueron detectados en el hígado y una semana más tarde (42 días) encontramos vermes bien desarrollados y huevos maduros e inmaduros en hígado e intestino. Este resultado se repitió a partir de esta fecha. Únicamente, se observó pigmento bilharziano en los hígados de ratones con más de 16 semanas de infección (>112 días). Llama la atención, la cercario-reacción negativa obtenida hasta la 7ma semana de infección (49 días). Cabe destacar que en la 8va semana de infección (56 días), al igual que con los sueros controles positivos (sueros de infecciones mixtas y unisexuales colectados después de 16 semanas de infección), todos produjeron cercario-reacción positiva (Tabla III, Figura 7).

Tabla III. Cinética de aparición de anticuerpos anti-glicocalix a lo largo del desarrollo de una infección por *S. mansoni* en ratones de laboratorio

Total de ratones infectados: 36

Vía de infección: Percutánea

Obtención de suero: En todos los grupos

Grupo Nº	Nº de ratones	Inóculo (Nº de cercarias)	Tiempo de observación (días)*	Vermes	Pigmento bilharziano**	Huevos		Cercario- reacción (CHR)
						Hígado	Intestino	
1	4	100	7	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	4	100	14	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
3	4	100	21	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
4	3	100	28	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
5	4	50	35	(+)	(-)	(+)***	(-)	(-)
6	4	50	42	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
7	4	50	49	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
8	3	50	56	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
Control-	2	20	>112	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Control-	2	250****	>112	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
Control-	2	250*****	>112	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)

* Después de la infección

(+) Presencia

** Pigmento bilharziano en hígado

(-) Ausencia

*** Huevos inmaduros

**** Cercarias hembras

***** Cercarias machos

Esta cercario-reacción positiva se observa alrededor de la cercaria tal como se indica en la Figura 7A. Si lo comparamos con la cercario-reacción obtenida con los controles positivos podemos observar una gran similitud (Figura 7B, C y D). Es interesante, la reacción positiva obtenida con suero proveniente de infecciones unisexuales donde hay ausencia de huevos del parásito (Figura 7C y D).



Figura 7. Cercario-reacción positiva con sueros experimentales de ratón

A: suero de 8 semanas de infección, B: suero crónico mixto (>16 semanas de infección); C y D: sueros de más de 16 semanas de infección unisexual ♀ y ♂, respectivamente. La flecha indica el precipitado a modo de molde característico de la reacción positiva (40X).

3.2.- Cercario-reacción de las diferentes regiones de la cercaria

El proceso de separación de las cercarias en cuerpos y colas fue monitoreado bajo el microscopio de luz (Figura 8). Cinco pases sucesivos por la aguja de 21x1 ½” fueron suficiente para separar las cercarias. La Figura 8A muestra las cercarias enteras antes de separar mecánicamente los cuerpos de las colas (Ramalho-Pinto y col., 1984), mientras que en las figuras subsiguientes podemos observar el proceso de enriquecimiento en cuerpos (8B) y colas (8C). Los cuerpos y las colas conservaron por poco tiempo los movimientos de las estructuras internas propios de cercarias vivas.

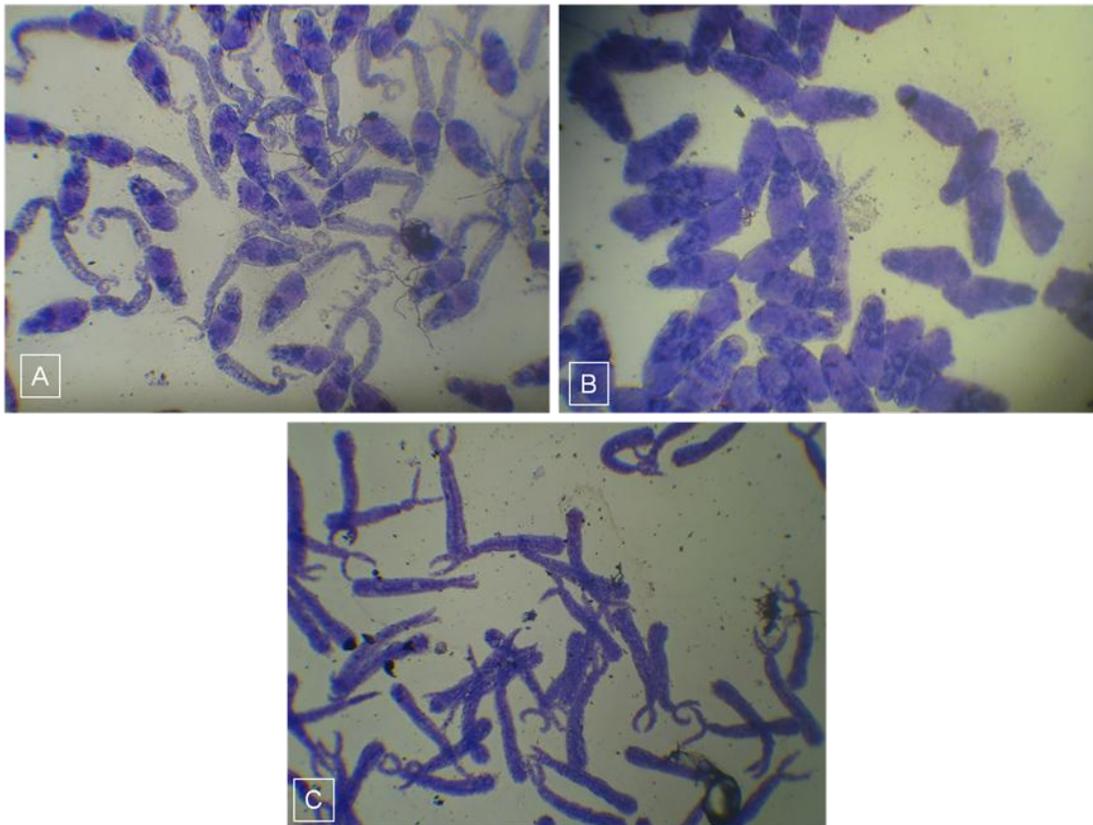


Figura 8. Separación de cercarias en cuerpos y colas teñidas con Giemsa.

A: cercarias completas (20X), B: cuerpos y C: colas (40X).

Una vez separados los cuerpos y colas de las cercarias, procedimos a evaluar la cercario-reacción con un suero de ratón crónico mixto (Figura 7B). Como podemos observar en la Figura 9, tanto los cuerpos (9A) como las colas (9B) dieron reacción positiva. Sin embargo, la reacción positiva fue más notable en los cuerpos (Figura 9A).

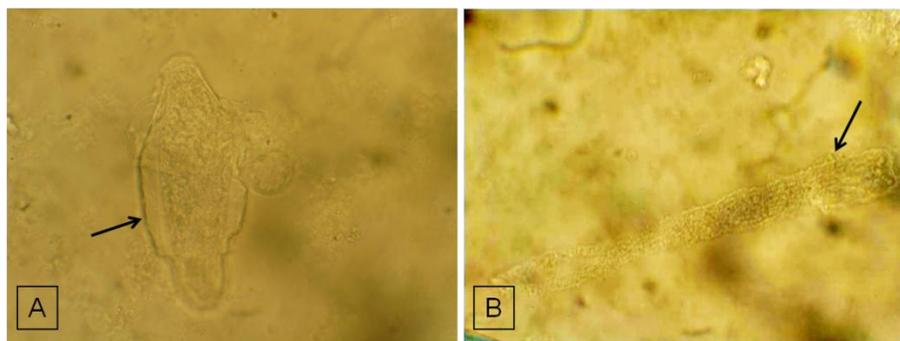


Figura 9. Cercario-reacción positiva en cuerpos y colas con suero crónico mixto de ratón.

A: cuerpos, B: colas. La flecha indica el precipitado a modo de molde característico de la reacción positiva (40X).

3.3.- Extracción del glicocalix de cercarias, cuerpos y de colas

La extracción del glicocalix se llevó a cabo mediante 50 pases sucesivos por aguja 21x1 ½” en presencia de deoxicolato de sodio (0,5 %). Este procedimiento se realizó en cercarias completas, en cuerpos y en colas. En la Figura 10 podemos observar cercarias completas (10A), cuerpos (10B) y colas (10C) luego del tratamiento con detergente. La extracción del glicocalix en cercarias completas produjo la separación en cuerpos y colas (Figura 10A). Sin embargo, estas estructuras conservaron su morfología externa ya que no se desintegraron durante el proceso. El ensayo de cercario-reacción realizado con cercarias,

cuerpos y colas tratadas con detergente, usando el mismo suero crónico utilizado en el experimento anterior (Figura 9) no dio reacción positiva (no mostrado).

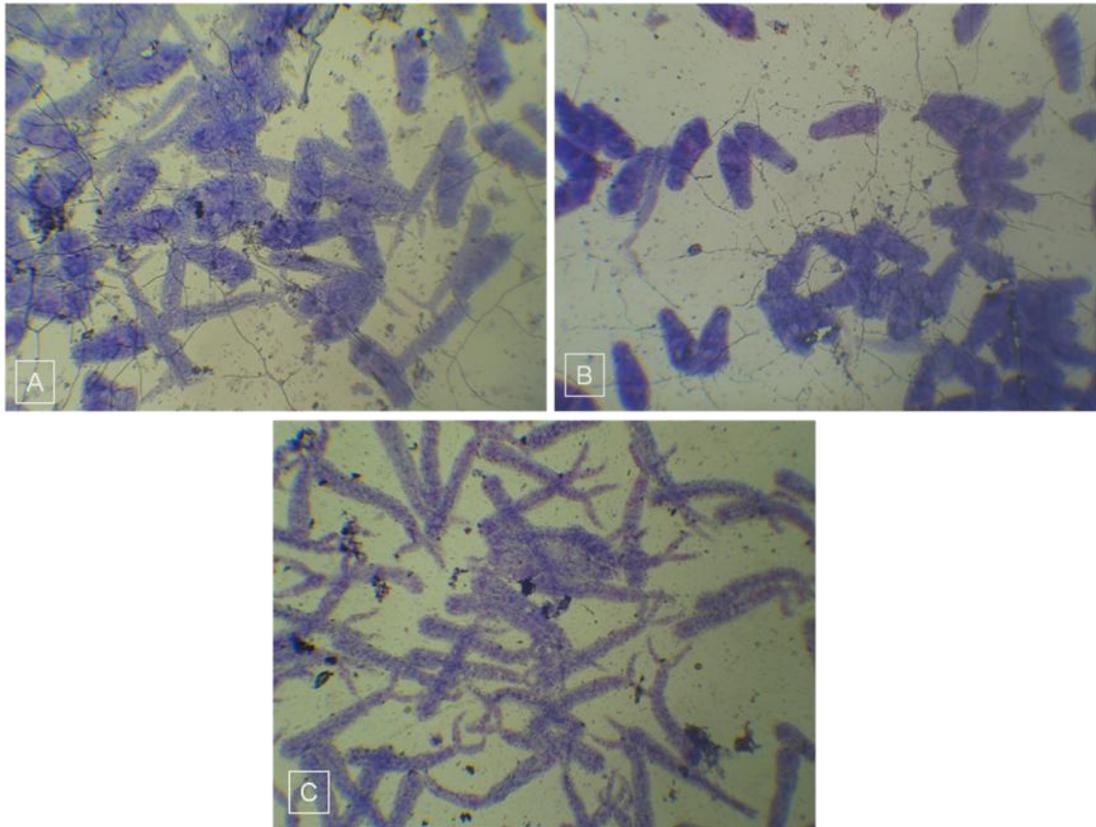


Figura 10. Cercarias completas, cuerpos y colas teñidas con Giemsa luego del tratamiento con detergente.

A: cercarias completas, B: cuerpos y C: colas (40X).

3.4.- Composición polipeptídica y antigenicidad de los extractos del glicocalix de cercarias completas, de cuerpos y de colas

La separación de los polipéptidos componentes de los extractos del glicocalix se llevó a cabo mediante electroforesis SDS-PAGE. Como se puede observar en la Figura 11, el perfil polipeptídico de los diferentes extractos está constituido por proteínas de un amplio rango de peso molecular. Sin embargo, la concentración de proteínas extraídas de las colas fue mucho menor (carril Et), por lo que fue necesario sobreteñir con plata (Merril y col., 1982). Podemos apreciar un alto grado de similitud entre el perfil de polipéptidos del extracto de glicocalix de cercarias completas (carril Ec) y el de cuerpos (carril Eb). En el extracto de las colas (carril Et) se observó un perfil simple compuesto principalmente de polipéptidos dominantes que oscilaron entre 6,7-37,6 kDa.

Estos extractos fueron enfrentados al suero crónico (control positivo) en una inmunodifusión (Ouchterlony). La Figura 12 muestra una banda de precipitación continua (reacción de identidad) entre el suero crónico y los extractos de cercarias enteras (Et), cuerpos (Eb) y colas (Et).

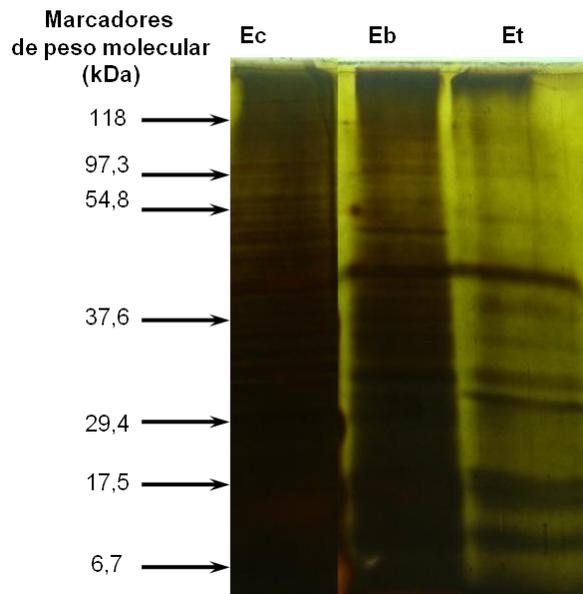


Figura 11. Análisis electroforético de los extractos del glicocalix de cercarias.

Carriles Ec, Eb y Et: extracto de glicocalix de cercarias completas, de cuerpos y colas, respectivamente. Gel de acrilamida al 12,5% teñido con nitrato de plata. Los marcadores de peso molecular empleados en este gel fueron preteñidos de BIO-RAD Ltd., los cuales incluyeron: miosina (206,3 kDa), β -galactosidasa (118,1 kDa), albúmina sérica bovina (97,3 kDa), albúmina de huevo (54,8 kDa), anhidrasa carbónica (37,6 kDa), inhibidor de tripsina (29,4 kDa), lisozima (17,5 kDa) y aprotinina (6,7 kDa).

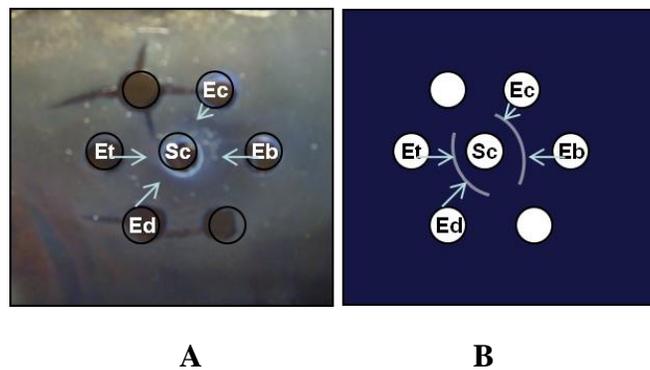


Figura 12. Inmunodifusión doble de Outcherlony de los extractos del glicocalix de cercarias con suero crónico mixto de ratón. B es un esquema de A. Pozos Ec y Ed: extracto del glicocalix de cercarias completas en triton X-100 y en deoxicolato de sodio, respectivamente; pozos Eb y Et: extracto del glicocalix de cuerpos y colas en deoxicolato de sodio, respectivamente; pozo Sc: suero crónico mixto de ratón (>16 semanas de infección). La flecha indica la banda de precipitación formada. Gel de agarosa al 1.1%.

3.5.- Antígenos polipeptídicos presentes en los extractos de glicocalix de cercarias completas, de cuerpos y de colas reconocidos por sueros de infección aguda y crónica de *S. mansoni*

A fin de identificar los antígenos responsables por la reacción de identidad obtenida mediante inmunodifusión (Figura 12), empleamos la técnica de inmunoblot. Para ello, separamos electroforéticamente los polipéptidos componentes de cada extracto, transferimos e inmovilizamos el espectro de proteínas en papel de nitrocelulosa y los enfrentamos a los diferentes antisueros. Como se observa en la Figura 13, el perfil antigénico obtenido en los extractos de cercarias completas, cuerpos y colas, reconocido por los sueros de infección aguda y crónica fueron muy parecidos (Figura 13A y B). Sin embargo, en el extracto completo el suero agudo reconoció 7 antígenos polipeptídicos entre 46,7 y 106,7 kDa. Este mismo patrón fue reconocido por el suero de infección crónica además de una banda polipeptídica de 104,4 kDa. El rango de peso molecular de las bandas polipeptídicas reconocidas por los sueros en el extracto de cuerpos y colas estuvo entre 35 y 106,7 kDa. El suero de infección aguda reconoció 7 antígenos en el extracto de cuerpos y 3 en el extracto de colas, mientras que el suero de infección crónica reconoció 8 y 4 antígenos. Es de hacer notar que antígenos identificados en el extracto de cercarias completas se hicieron más evidentes en cuerpos y/o colas separados, entre ellas una banda de 53,6 kDa identificada en los extractos de cuerpos y colas por ambos sueros y un doblete de 83,6-85,9 kDa identificado por ambos sueros en el extracto de cuerpos. Asimismo, bandas identificadas fuertemente en el extracto de cercarias completas se hicieron menos evidentes en el extracto de cuerpos, entre ellas un doblete de 104,4-106,7 kDa que fue

identificado por el suero de infección crónica. Las bandas de 51,3 y 60,5 kDa fueron coloreadas con gran intensidad e identificadas únicamente en el extracto de cercarias completas por ambos sueros. Una banda de 35 kDa fue identificada por ambos sueros en los extractos de cuerpos y colas, pero no en el extracto de cercarias completas y fue coloreada con mayor intensidad en el extracto de cuerpos y por el suero de infección aguda.

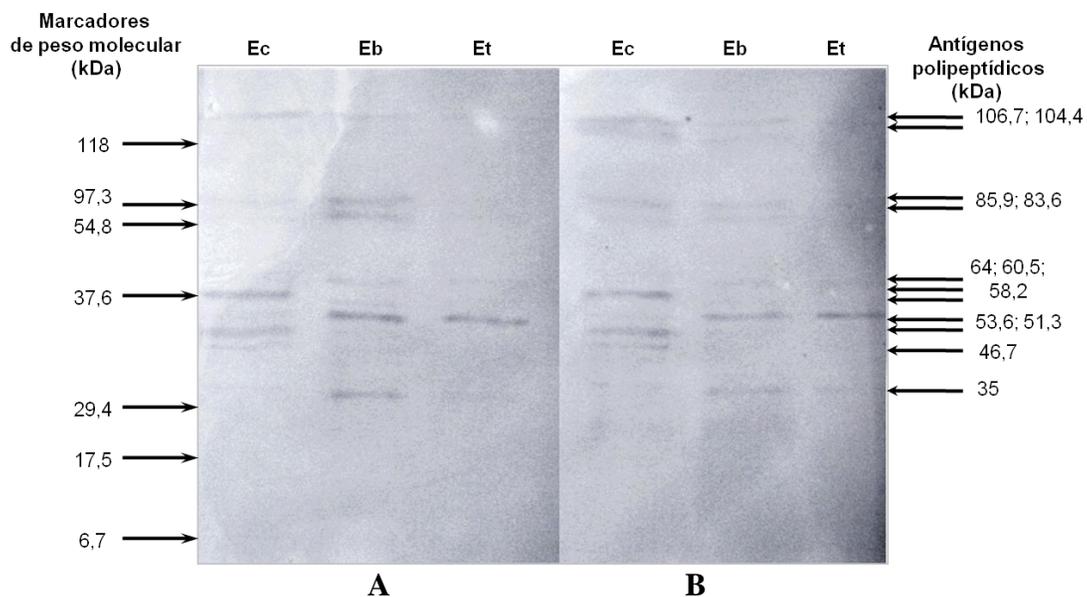


Figura 13. Inmunoblot del extracto del glicocalix de cercarias completas, de cuerpos y de colas enfrentados a los sueros de infección aguda y crónica de *S. mansoni*.

A y B: sueros de ratones con infección aguda (8 semanas) y crónica (>16 semanas), respectivamente. Carriles Ec, Eb y Et: extracto de glicocalix de cercarias completas, de cuerpos y colas, respectivamente. Los marcadores de peso molecular empleados fueron preteñidos de BIO-RAD ltd.

3.6.- Antígenos polipeptídicos presentes en el extracto de glicocalix de cercarias completas reconocidos por sueros de ratones a diferentes semanas de infección con *S.mansoni*

La Figura 14A muestra un inmunoblot donde el extracto de cercarias completas fue enfrentado a sueros experimentales obtenidos a diferentes semanas de iniciada la infección. Un patrón de reconocimiento antigénico similar fue observado desde las semanas 1-8 (Sa1-Sa8), así como también por suero crónico (Scm) y sueros de infecciones unisexuales (Sc ♀ , Sc ♂ y) de más de 16 semanas post-infección. Este mismo patrón fue detectado por el suero normal de ratón, lo que sugiere un elevado “background” producto de posibles uniones inespecíficas. Para solventar este inconveniente, se repitió el inmunoblot incluyendo un lavado antes de incubar en solución de revelado con tritón X-100 al 0.01%, SDS al 0.005%, albúmina sérica bovina al 1.5%, NaCl al 0.9% en 10 mM de Tris-HCl pH 7.4. Como se observa en la Figura 14B, el suero normal no reconoció ninguna banda y se redujo considerablemente el número de bandas antigénicas reconocidas por los sueros inmunes. A pesar de que la intensidad de las bandas de reacción fue muy baja para ser fotografiadas, nos permitió hacer un esquema tal como se muestra en la Figura 14B.

Desde la semana 1 a la 6, se observó un patrón de reconocimiento formado por 8 antígenos de pesos moleculares entre 16,5-84,3 kDa de los cuales los más evidentes fueron los de 16,5; 19,3; 47,6 y 50,4 kDa (Figura 14B). Tres bandas adicionales fueron reconocidas por los sueros de la semana 7 y 8, las cuales fueron más intensas y presentaron pesos moleculares entre 104-109,8 kDa. Además de todos estos antígenos reconocidos, los

sueros de infección crónica mixta y unisexual de hembra y macho, identificaron un polipéptido de 67,4 kDa de peso molecular. El suero de la semana 8 fue elegido como representativo de la fase aguda por su notable reacción positiva en el ensayo de cercario-reacción al igual que el suero crónico mixto como representativo de la fase crónica (Figura 7A y B, respectivamente).

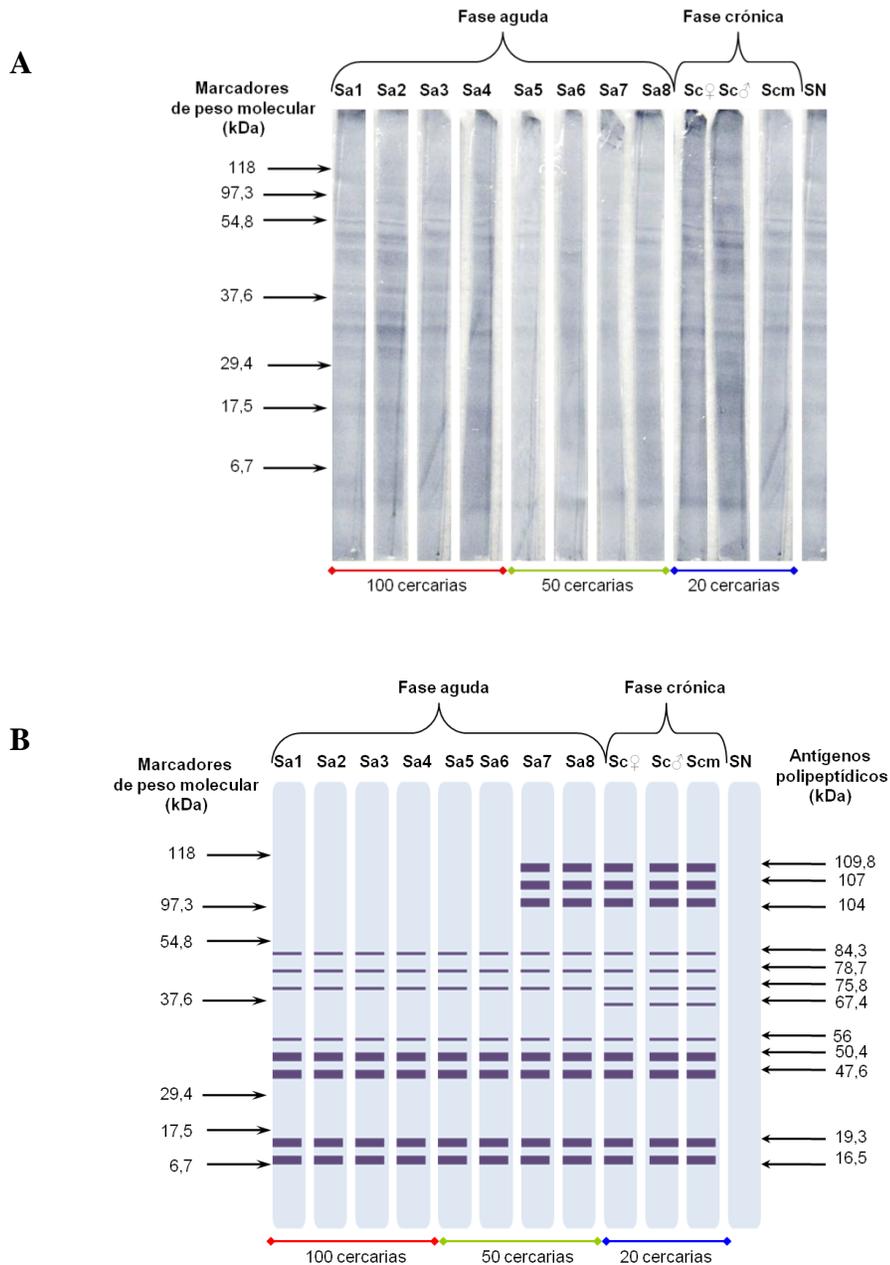


Figura 14. Inmunoblot del extracto del glicocalix de cercarias completas enfrentado a los sueros de infecciones experimentales con *S.mansoni*.

A y B: resultados obtenidos antes y después del lavado con detergentes, respectivamente. Carriles Sa1-Sa8: sueros de ratón durante la infección aguda desde la semana 1 a la 8. Carriles Sc♀, Sc♂ y Scm: suero de ratón crónico unisexual de hembra y macho y mixto, respectivamente (>16 semanas de infección). Carril SN: suero normal de ratón. Infección de ratones con 100(—), 50(—) y 20(—) cercarias. Los marcadores de peso molecular empleados fueron preteñidos de BIO-RAD Ltd.

3.7.- Identificación y aislamiento de glicoproteínas afines a la concanavalina A presentes en el extracto de glicocalix de cercarias completas

En la Figura 15 mostramos una transferencia a papel de nitrocelulosa que nos permitió identificar las glicoproteínas con afinidad a la ConA, presentes en el glicocalix de cercarias completas. Quince bandas de reacción entre 8,7 y 111 kDa de peso molecular fueron identificadas (15A). Los polipéptidos dominantes fueron los de 55,4; 64,2-62; 73,2 y 84,3 kDa. La especificidad de esta unión se confirmó con el control en el cual el azúcar competidor, α -metil-D-manosa, inhibió completamente la unión de la ConA a las glicoproteínas unidas a la membrana, no observándose bandas de reacción (15aB).

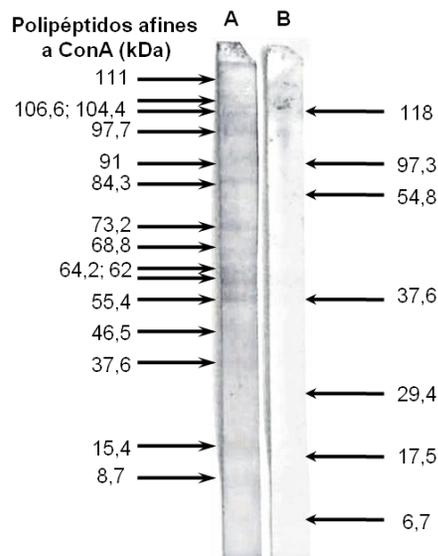


Figura 15. “Blot” de glicoproteínas totales del extracto del glicocalix de cercarias completas identificadas con concanavalina A.

Carril A: glicoproteínas identificadas. Carril B: control en presencia de 0,4 M α -metil-D-manosa. . Los marcadores de peso molecular empleados fueron preteñidos de BIO-RAD Ltd.

Estas glicoproteínas identificadas fueron aisladas del extracto del glicocalix de cercarias completas mediante cromatografía de afinidad en una matriz de Con A-agarosa. El extracto de glicocalix cargado en la columna fue obtenido de aproximadamente 100.000 cercarias. Debido al tamaño microscópico de la cercaria, al diminuto espesor del glicocalix y, por tanto, a la relativamente pequeña concentración de proteínas extraídas, no se siguió el proceso de aislamiento mediante determinación de la concentración de proteínas. En su lugar, se determinó la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina, una glicoproteína considerada como marcador de las membranas tegumentales de adultos de *S. mansoni* y también encontrada en la superficie de las cercarias y en otros estadios del ciclo de vida del parásito y además posee residuos de glucosa y/o manosa en su estructura afines a la ConA (Payares y col., 1984). La actividad enzimática del extracto del glicocalix de cercarias completas fue de $2,8 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mL}$ y el volumen cargado fue 0.5 mL. Las fracciones recogidas de la columna fueron de 2 mL.

En la Figura 16 mostramos el perfil típico de elusión de la fosfatasa alcalina en una cromatografía de afinidad en ConA-agarosa. Las fracciones 1-2 fueron unidas y representan los polipéptidos que no fueron retenidos por la ConA y la F2 fue la que mostró el valor máximo de actividad enzimática.

22

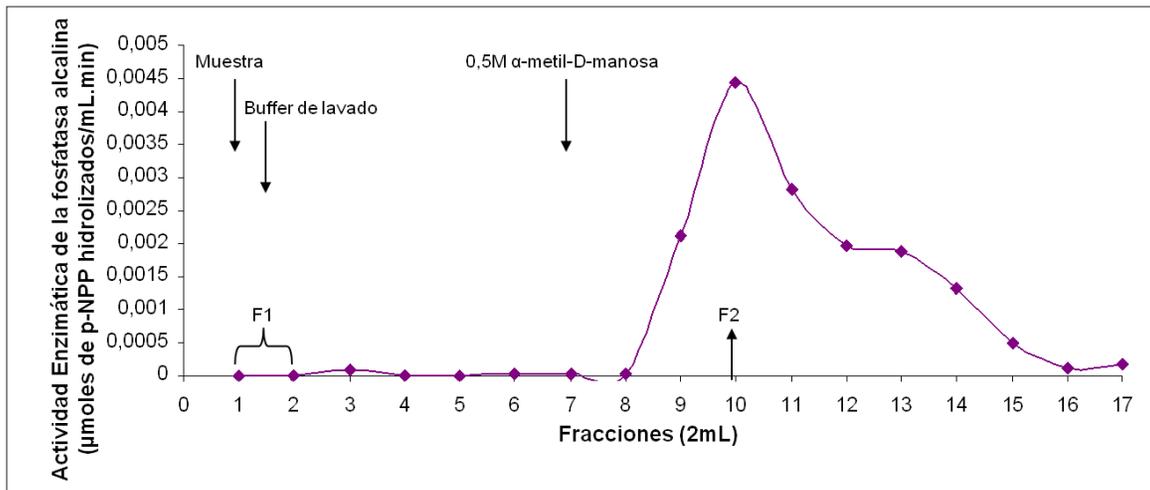


Figura 16. Purificación de la fosfatasa alcalina del extracto de cercarias completas mediante cromatografía de afinidad en ConA-agarosa

F1: polipéptidos que no fueron retenidos por la ConA, F2: polipéptidos unidos-eluidos de la ConA-agarosa

²² En toda reacción química, los moles consumidos son iguales a los moles formados. La materia no se crea ni se destruye, solo se transforma (Brown y col., 2004). Es decir, los moles de p-NPP hidrolizados son iguales a los moles de NP formados.

3.8.- Composición polipeptídica y antigenicidad de las fracciones de la cromatografía de afinidad

En la Figura 17 mostramos el perfil polipeptídico del extracto de glicocalix de cercarias completas (carril Ec) comparado al de la fracción no retenida (carril F1) y retenida-eluída (carril F2) de la columna de afinidad. En la fracción F1 (carril F1), las bandas fueron muy tenues a pesar de que el gel fue sobreteñido con nitrato de plata (Merril y col., 1982). Esta fracción de polipéptidos pudo haber sido diluida debido a que en la columna de afinidad se cargaron 0.5 mL del extracto y el volumen de la fracción recogida fue de 4 mL. En la fracción F2 (carril F2) se pueden apreciar numerosas glicoproteínas. Sin embargo, el patrón polipeptídico es más simple que el observado en el extracto del glicocalix de cercarias completas (carril Ec). La banda de 63 kDa detectada como un polipéptido dominante es un artefacto debido al mercaptoetanol (Tasheva y Dessev, 1983).

Nuevamente, la antigenicidad de estas fracciones fue evaluada mediante inmunodifusión frente a suero crónico. En la Figura 18 podemos observar que tanto los extractos del glicocalix de cercarias completas (pozos Ec y Ed) como la fracción F2 (pozo F2) de la columna, formaron bandas de precipitación continua (reacción de identidad). La fracción F1 (pozo F1), no mostró bandas de precipitación.

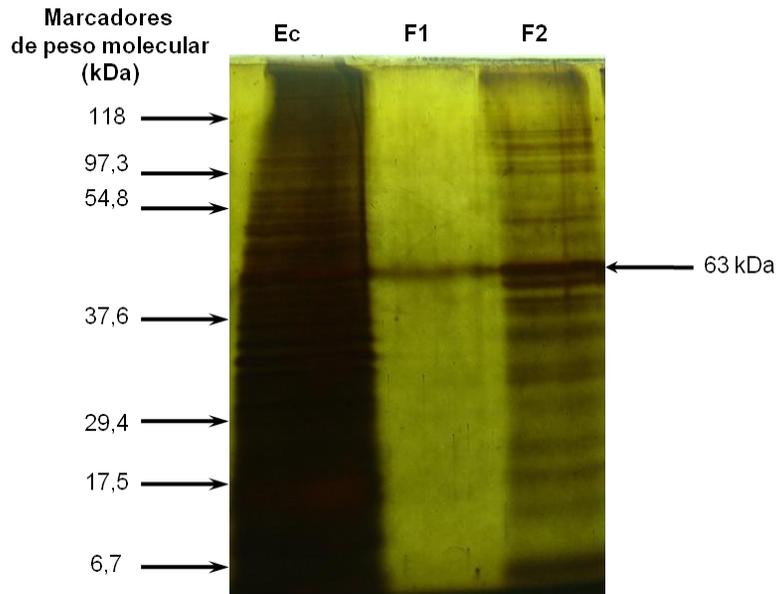


Figura 17. Análisis electroforético de las fracciones de la cromatografía de afinidad.

Carril Ec: extracto del glicocalix de cercarias completas; carril F1: polipéptidos no unidos a la columna; carril F2: polipéptidos unidos a la columna (glicoproteínas afines a la ConA). Gel de acrilamida al 12,5% teñido con nitrato de plata. Los marcadores de peso molecular empleados fueron preteñidos de BIO-RAD Ltd.

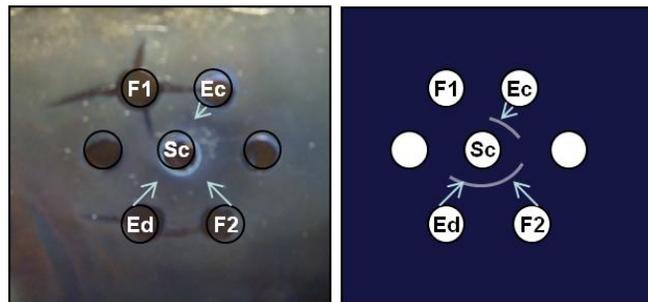


Figura 18. Immunodifusión doble de Ouchterlony de las fracciones de la cromatografía de afinidad con suero crónico mixto de ratón.

B es un esquema de A. Pozos Ec y Ed: extracto del glicocalix de cercarias completas en triton X-100 y en deoxicolato de sodio, respectivamente; pozo F1: polipéptidos no unidos a la columna; pozo F2: polipéptidos eluidos de la columna (glicoproteínas afines a la ConA); pozo Sc: suero crónico mixto de ratón (>16 semanas de infección). La flecha indica la banda de precipitación formada. Gel de agarosa al 1.1%.

3.9.- Glicoproteínas antigénicas presentes en el extracto de glicocalix de cercarias completas, reconocidas por suero de infección aguda y crónica de *S. mansoni*

En la sección anterior (3.8), reportamos la formación de bandas de inmunoprecipitación entre el extracto total y la fracción F2 de la cromatografía en ConA-agarosa y el suero crónico de ratón. El inmunoblot mostrado a continuación (Figura 17), nos permitió identificar los antígenos dominantes que podrían ser responsables de esa reacción de identidad. El extracto del glicocalix de cercarias completas y las fracciones F1 y F2 de la cromatografía de afinidad fueron enfrentadas a sueros de ratones con infección aguda y crónica (Figura 17A y B). Como se puede observar, ambos antisueros reconocieron antígenos en el extracto total y en la fracción F2 de glicoproteínas. Los sueros utilizados no identificaron antígenos en la fracción no retenida (carril F1 en A y B). De las glicoproteínas totales con afinidad a la ConA (entre 8,7 y 111 kDa de peso molecular), muy pocas resultaron ser antigénicas. El suero de infección aguda reconoció 5 antígenos glicoprotéicos entre 65 y 100 kDa, de los cuales la banda de 65 kDa fue coloreada con mayor intensidad. Por su parte, el suero de infección crónica reconoció 8 antígenos glicoprotéicos en esta misma fracción entre 15 y 108,2 kDa de peso molecular, siendo el doblete de 97,5-100 kDa las bandas más evidentes.

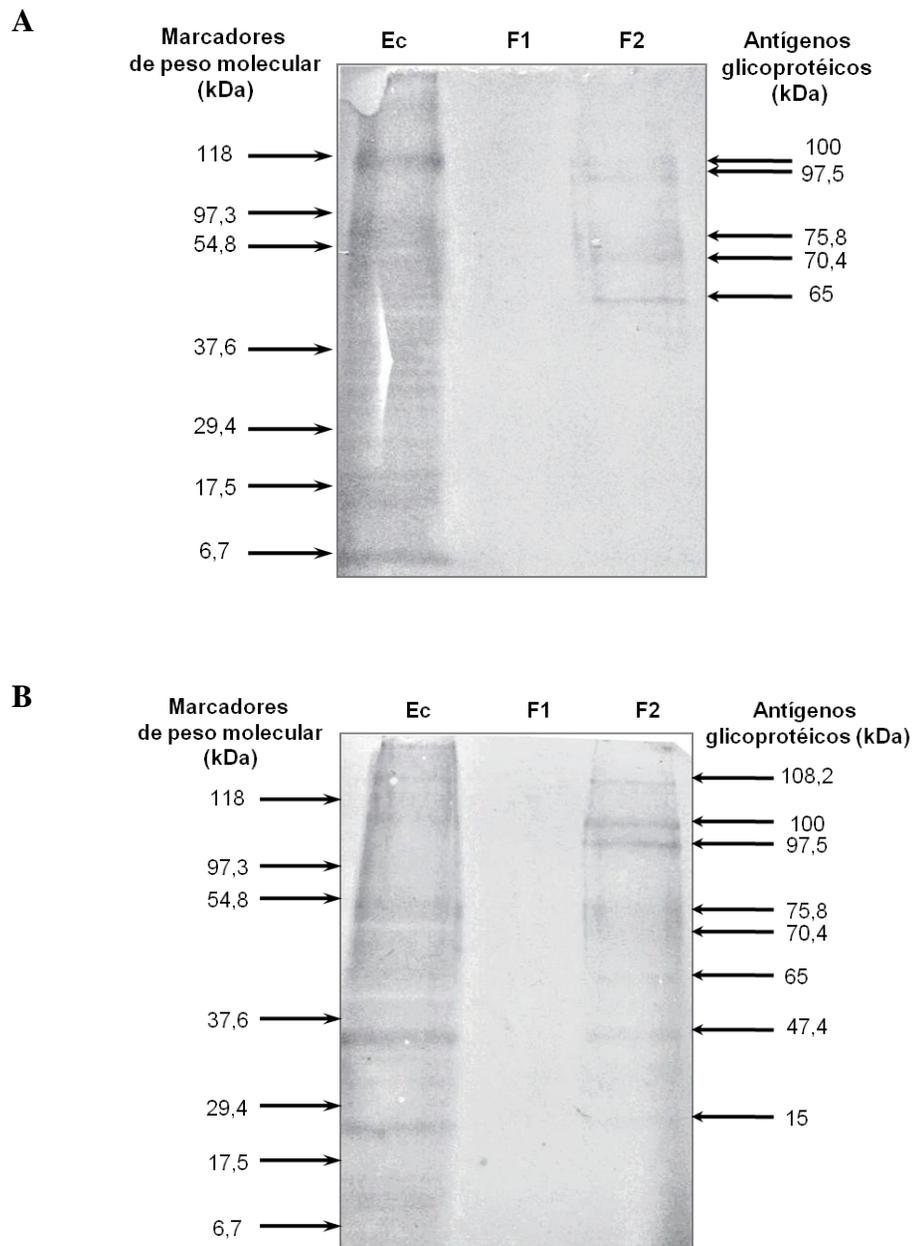


Figura 19. Inmunoblot de las fracciones de la cromatografía de afinidad enfrentado a los sueros de infección aguda y crónica de *S. mansoni*.

A y B: sueros de ratones con infección aguda (8 semanas) y crónica (16 semanas), respectivamente Carril Ec: extracto de cercarias completas; carril F1: polipéptidos no unidos a la columna; carril F2: polipéptidos unidos a la columna (glicoproteínas afines a la ConA). Los marcadores de peso molecular empleados fueron preteñidos de BIO-RAD Ltd.

3.10.- Epítopes (tipo glicano o peptídico) de glicoproteínas antigénicas reconocidos por suero de infección aguda y crónica de *S. mansoni*

La Figura 18 muestra un inmunoblot del extracto del glicocalix de cercarias completas y de las fracciones F1 y F2 de la cromatografía de afinidad tratado con metaperiodato de sodio/borohidrato de sodio. Las transferencias fueron enfrentadas a sueros de infección aguda y crónica, antes y después de la oxidación/reducción descrita (apartado 2.11.3.). De los 5 antígenos glicoprotéicos entre 65 y 100 kDa identificados por el suero de infección aguda, sólo el antígeno de 65 kDa fue reconocido por este mismo suero luego del tratamiento con metaperiodato de sodio/borohidrato de sodio (Figura 18A). Por otro lado, de los 8 antígenos glicoprotéicos entre 15 y 108,2 kDa identificados por el suero de infección crónica antes del tratamiento, solamente los de 65; 75,8; 97,5-100 y 108,2 kDa fueron reconocidos después del tratamiento. La banda de 108,2 y 65 kDa mantuvieron la intensidad de su coloración. El doblete de 97,5-100 kDa reconocido por el suero de infección crónico, disminuyó la intensidad de su coloración al igual que la banda de 75,8 kDa.

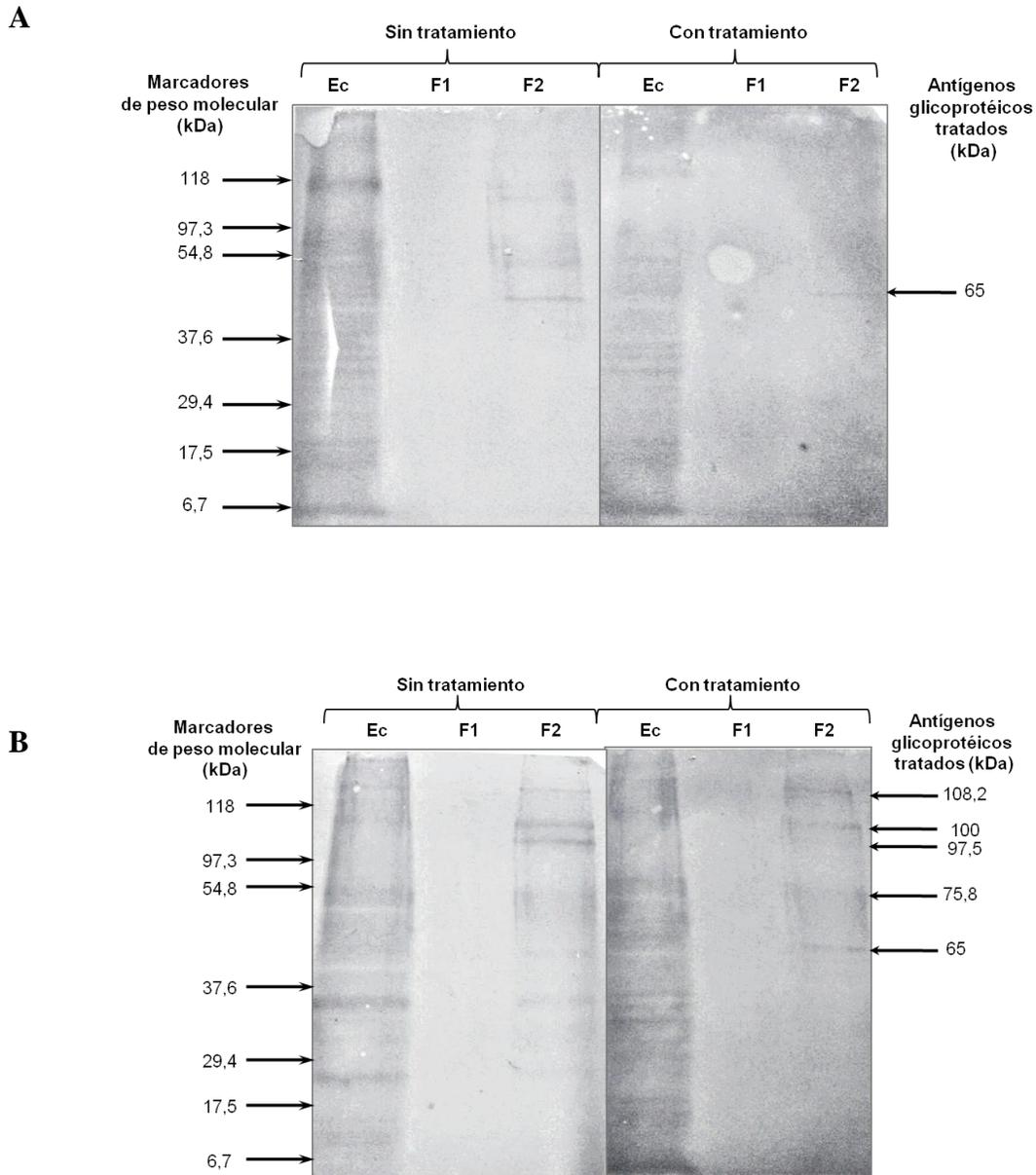


Figura 20. Inmunoblot de las fracciones de la cromatografía de afinidad tratadas con metaperiodato de sodio/borohidrato de sodio y enfrentados a los sueros de infección aguda y crónica de *S. mansoni*.

A y B: sueros de ratones con infección aguda (8 semanas) y crónica (16 semanas), respectivamente Carril Ec: extracto de cercarias completas; carril F1: polipéptidos no unidos a la columna; carril F2: polipéptidos unidos a la columna (glicoproteínas afines a la ConA). Los marcadores de peso molecular empleados fueron preteñidos de BIO-RAD Ltd.

3.11.- Reactividad cruzada con sueros de otras infecciones parasitarias

Se llevaron a cabo mediante la misma técnica de Immunoblot ensayos para evaluar la posible reactividad cruzada con otras parasitosis. Por un lado, el extracto del glicocalix de cercarias completas y de las fracciones de la cromatografía de afinidad (F1 y F2) antes y después del tratamiento con metaperiodato de sodio/borohidrato de sodio fueron enfrentados al suero de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*. No se observaron bandas de reacción en ninguna de las condiciones experimentales descritas (no mostrado). Por otro lado, ratones con infección mixta *S. mansoni* e *Himenolepis* sp. (Figura 21), cuyos antisueros fueron evaluados frente a antígenos del glicocalix cercarial, no mostraron un patrón de reconociendo diferente del reconocido por infecciones mono específicas (no mostrado).



Figura 21. Helmintos presentes en ratón infectado con 100 cercarias de *S. mansoni*. Céstodos adultos del género *Hymenolepis*. Ex: escólex y Es: estróbilo, característicos del género *Hymenolepis* (20X)

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

Tal y como mencionamos en la introducción (ver 1.1.4), Venezuela es un área de baja transmisión para la Esquistosomiasis la cual puede ser definida como aquella donde existe el vector, la prevalencia de casos activos está por debajo del 25%, con predominio de individuos con intensidad moderada de infección (75% o más) y la mayoría (80%) son asintomáticos (Alarcón de Noya y col., 2006). Esta condición dificulta el diagnóstico parasitológico, lo cual ha llevado a la búsqueda de técnicas rápidas, sencillas, con alta sensibilidad y especificidad, aplicables en el despistaje seroepidemiológico en estudios de campo, ya que las infecciones no detectadas y no tratadas pueden ser responsables de la persistencia de la transmisión (de Vlas y Gryseels, 1992 citado en Alarcón de Noya y col., 2007a).

El estudio y el uso de las cercarias para fines de diagnóstico, podría aportarnos información relevante para el control de la Esquistosomiasis. En primer lugar, el glicocalix de la cercaria es altamente antigénico siendo el responsable de la reacción antígeno-anticuerpo (cercario-reacción) que ocurre en presencia de sueros de pacientes. Por otro lado, las cercarias son más fáciles de obtener que otros estadíos del parásito y por su “estrategia evolutiva” de poliembrionía, pueden producirse en gran número a partir de un reducido número de caracoles y ratones (Payares, 1979; Chand y col., 2010).

El estudio cinético de anticuerpos contra el glicocalix reportado en este trabajo mostró que antes de la 8va semana de infección (fase aguda) no se detectó una cercario-

reacción positiva. Estos resultados sugieren que 7 semanas de infección con 50-100 cercarias no fueron suficientes para inducir una cercario-reacción positiva, a pesar de que durante este tiempo ocurrió la maduración del parásito y ya habían aparecido huevos en hígado e intestino. Considerando que durante las primeras 5 semanas de infección la respuesta inmune dominante es del tipo T_{H1} y entre las semanas 5-6 la respuesta T_{H1} disminuye y comienza a emerger una fuerte respuesta T_{H2} (Pearce y MacDonald, 2002),²³ no es extraño que los anticuerpos contra el glicocalix no hayan aparecido o estén en muy baja concentración. Por otro lado, los resultados obtenidos con los diferentes inóculos (100, 50 y 20 cercarias) concuerdan con los reportados por Norden y Stran (1985) y Mikhail y col. (1997), quienes aseguran que la intensidad de la infección no afecta la aparición de anticuerpos específicos. A pesar de que la cercario-reacción ha sido atribuida a una reacción cruzada con antígenos de huevo (Hamilton y col., 1998), la cercario-reacción obtenida con sueros provenientes de infecciones unisexuales sugiere lo contrario, o más bien podría ser una reacción cruzada con los vermes adultos. Por el contrario, el suero colectado durante la infección crónica siempre produjo una cercario-reacción positiva.

Una pequeña modificación del método mecánico para la transformación cercaria-esquistosómulo descrito por Ramalho-Pinto y col. (1974), nos permitió separar las cercarias en cuerpos y colas sin producir pérdida del glicocalix. Esto fue confirmado por la cercario-

²³ Las células T_H segregan varias citocinas que juegan una función central en la activación de las células B, células T y otras que participan en la reacción inmunitaria. Los cambios de patrón de citocinas ocasionados por las células T_H , pueden modificar el tipo de respuesta inmunitaria que se desarrolla entre otros leucocitos. La *respuesta T_{H1}* produce un perfil de citocinas que interviene en la inflamación y activa en particular ciertas células T y macrófagos, en tanto que la *respuesta T_{H2}* activa sobre todo células B y reacciones inmunitarias que dependen de anticuerpos (Goldsby y col., 2004).

reacción positiva resultante en cuerpos y colas una vez separados. Asimismo, 50 pases sucesivos por una aguja 21x1 ½” en presencia de detergentes (Peña y Payares, 2008) fueron suficiente para la extracción del glicocalix de las cercarias, de cuerpos y colas. La ausencia de cercario-reacción luego del tratamiento con detergentes, parece haber sido consecuencia de la remoción del mismo. La integridad de cuerpos y colas fue conservada lo que indica y confirma que los componentes solubilizados en el detergente, probablemente formen parte de la superficie de la cercaria. De hecho, el análisis electroforético de los extractos de glicocalix de cercarias completas, de cuerpos y de colas reveló que un conjunto de polipéptidos fueron extraídos, algunos de los cuales (como veremos más adelante) resultaron ser antigénicos.

Tres detergentes: triton X-100, nonidet P-40 y deoxicolato de sodio fueron empleados para extraer el glicocalix. La fosfatasa alcalina (Payares y col., 1984), una glicoproteína presente en la superficie de la cercaria de *S. mansoni* fue utilizada como un marcador durante la purificación de las glicoproteínas. Con la premisa de que la velocidad de reacción enzimática es proporcional a la concentración de la enzima (McKee y McKee, 2003), el extracto con mayor actividad de la fosfatasa alcalina fue seleccionado como el que solubilizó la mayor cantidad de glicoproteínas del glicocalix. El extracto en deoxicolato de sodio fue el que tuvo mayor actividad enzimática, seguido de tritón X-100 y nonidet P-40. Esto pudo deberse a que el deoxicolato de sodio es un detergente iónico con mayor capacidad de disociar la estructura de la membrana y extraer con más eficiencia las

proteínas integrales extremadamente hidrofóbicas (Latorre y col., 1996).²⁴ Sin embargo, este detergente no fue usado para los ensayos de aislamiento de glicoproteínas debido a que precipitó en KRT pH 7.4, el cual contiene los iones necesarios y el pH indispensable para el acoplamiento de glicoproteínas a la ConA en la cromatografía de afinidad (Affinity Chromatography, 1979). Generalmente, los detergentes iónicos precipitan a pH cercanos a su punto isoeléctico por lo que su uso está restringido a pH sobre 7 y 7.5 (Latorre y col., 1996). Para solventar esta dificultad, se utilizó el triton X-100 en la mayoría de los experimentos, el cual fue el segundo con mayor actividad enzimática y además ha sido usado para extraer componentes de la superficie de cercarias y de esquistosómulos (Payares y col., 1985 a y b).

4.1.- Antígenos presentes en los extractos del glicocalix de cercarias, reconocidos por sueros de infecciones experimentales con *S. mansoni*.

El empleo de técnicas más sensibles como el inmunoblot nos permitió identificar un parámetro físico, como es el peso molecular relativo de los antígenos, con sueros obtenidos durante la fase aguda y crónica de la infección. En general, el perfil antigénico reconocido

²⁴ **Clasificación de detergentes:** existen tres grandes grupos de detergentes según la naturaleza química de la porción polar de la molécula: iónicos, no-iónicos y zwitteriónicos. **Detergentes iónicos:** la porción polar de estos detergentes presenta grupos químicos cargados ya sea positiva o negativamente. A este grupo pertenecen los detergentes que presentan la mayor polaridad dentro de estas moléculas anfífilas. **Detergentes no-iónicos:** la porción polar de estos detergentes no posee carga y por lo tanto corresponde a una cabeza que siendo hidrofílica presenta una polaridad intermedia. **Detergentes zwitteriónicos:** la porción polar de estos detergentes está formada por un enlace covalente de naturaleza polar como lo son enlaces formados por N-O o S-O. También forman parte de este grupo los detergentes que en esta porción polar presentan átomos polarizados unidos por un enlace covalente y que además presentan carga neta que los transforma en zwitteriónicos a bajo pH (Latorre y col., 1996).

por estos sueros en los extractos de cercarias completas, cuerpos y colas fue muy similar (Figura 13). Sin embargo, algunas diferencias en términos del número de antígenos reconocido por cada antisuero y más específicamente, el peso molecular de los reconocidos intensamente por uno u otro suero (85,9-83,6 kDa por suero agudo y 104,4 kDa por suero crónico) podrían ser objeto de estudios posteriores orientados a diseñar una herramienta para el diagnóstico de la fase de la infección.

Un resultado que llama la atención fue la aparición de nuevos antígenos luego de la separación de la cercarias en cuerpos y colas. Estos resultados indican que quizás el proceso de separación y enriquecimiento en cuerpos y colas, antes de la extracción del glicocalix, podría haber expuesto nuevos antígenos que estaban ocultos en las cercarias completas o haber modificado mediante un proceso proteolítico los antígenos ya existentes. Nuestros resultados indican que un menor número de antígenos fue reconocido por los sueros en las colas si se compara con el obtenido con los cuerpos. Esto no es sorprendente ya que el glicocalix de estas estructuras difiere en cuanto a composición glicosídica (46% de fucosa en el cuerpo y 84% de glucosa en la cola) (Nanduri y col., 1991) y por tanto, podría diferir en antigenicidad así como en su facilidad de “desprendimiento” durante el proceso de separación en cuerpos y colas, pues la cercario-reacción fue más notable en cuerpos que en colas. El proceso de separación también parece haber sido responsable de una observación cualitativa en la cual los antígenos fueron más evidentes en los extractos de cuerpos y/o de las colas separadas. Del mismo modo, algunos antígenos identificados fuertemente en el extracto de cercarias completas se hicieron menos evidentes en el extracto de cuerpos (Ej. el doblete de 104,4-106,7 kDa). Estos resultados ameritan una

discusión posterior pues el proceso de extracción del glicocalix en cercarias completas, culmina con su separación en cuerpos y colas.

El estudio cinético efectuado mediante cercario-reacción, discutido al inicio, fue extendido al inmunoblot empleando cercarias completas. El elevado “background” mostrado por el suero normal, fue resuelto aumentando las condiciones de exigencias durante los lavados. El empleo de detergentes nos permitió eliminar lo unido inespecíficamente. En efecto, el suero normal no reconoció ninguna banda y se redujo considerablemente el número de antígenos reconocidos por los antisueros. A pesar de que la cercario-reacción fue negativa en las primeras semanas de infección (semanas 1-7), el inmunoblot, por ser más sensible, produjo resultados positivos durante este mismo periodo. El cambio detectado en el patrón antigénico después de la 7ma semana de infección (transición fase aguda–fase crónica) con nuevos antígenos detectados (104-109,8 kDa), sugiere que eventos inmunitarios producidos pudieron estimular la producción de anticuerpos contra otros polipéptidos que no fueron reconocidas en las primeras 6 semanas de infección. Estos resultados confirman los obtenidos por Norden y Strand (1985) quienes además proponen que esta diferencia encontrada permite discriminar entre infección aguda y crónica.

El conjugado usado en los experimentos de inmunoblot fue una anti-IgG. En este sentido, anticuerpos IgG contra antígenos de cercarias (de 41 kDa) fueron detectados a partir de las semanas 4-5 post-infección (Hanyunga y col., 1987) y contra antígenos de gusanos adultos de *S. mansoni* (de 31-32 kDa) a partir de la segunda semana post-infección

(Mikhail y col., 1997). Nuestros resultados indican que estos anticuerpos pueden ser detectados a partir de la primera semana de infección, ya que el perfil de reconocimiento antigénico obtenido por el suero de las semanas 2-5 post-infección es muy similar al de la semana 1. Cabe destacar que muchas variables pueden influenciar la medida de la respuesta inmune en los hospedadores infectados, entre ellas: (a) la intensidad de infección en los ratones, (b) las especies de hospedador infectado, (c) la cepa de hospedadores infectados, (d) el sistema de análisis, (e) la edad del hospedador, (f) factores ambientales, (g) el estado inmune y de salud de los ratones pues unos tienden a morir más pronto que otros y (h) el antígeno de *S. mansoni* analizado (Norden y Strand, 1985).

4.2.- Caracterización de los antígenos identificados en extractos del glicocalix

El empleo de la lectina concanavalina A (Con A) como herramienta para identificar, caracterizar y purificar glicoconjugados de la membrana tegumentaria de *S. mansoni* ha sido bien documentado (Payares y col., 1984; Payares y Simpson, 1985; Payares y col. 1985a y b y Norden y Strand, 1985). En este sentido, hemos llevado a cabo la identificación directa de glicoproteínas y hemos utilizado la cromatografía de afinidad en ConA-agarosa para su purificación (Figuras 15 a 18). El tamaño microscópico de la cercaria (0.14 mm de largo por 0.04 mm de ancho) (Katz y Rocha, 1991), así como el diminuto espesor del glicocalix (1-2 μm) (Samuelson y Caulfield, 1985) y, por tanto, la relativamente pequeña concentración de proteínas extraídas, no nos permitió seguir el proceso de aislamiento a través de la determinación de la concentración de proteínas.

Nuevamente, la fosfatasa alcalina, una glicoproteína con residuos de manosa y/o glucosa en su estructura (Payares y col., 1984) fue utilizada como un marcador de las glicoproteínas de la superficie cercarial. La actividad enzimática de la fosfatasa alcalina así como el análisis electroforético de las fracciones obtenidas en la cromatografía de afinidad, nos mostró que esta herramienta resultó ser útil para separar el complejo patrón polipeptídico del extracto de cercarias en dos patrones más simples. Asimismo, la aplicación de inmunodifusión e inmunoblot a las fracciones glicoproteicas, permitió identificar la naturaleza glicosídica de los antígenos. Estos resultados confirman los reportados por Payares y Simpson (1985) y Norden y Strand (1985). Efectivamente, el glicocalix está compuesto por un gran número de glicoproteínas (Figura 17) de las cuales un número reducido fue identificado como antígenos (Figura 19A y B). Resulta contradictorio que una larva infectante tenga expuesta en su membrana externa una gran cantidad de glicoconjugados que podrían convertirse en material inmunogénico potencialmente nocivo para la supervivencia del parásito.

Para fines diagnósticos, el suero de infección aguda reconoció 5 antígenos glicoprotéicos entre 65 y 100 kDa mientras que el suero de infección crónica reconoció 8 antígenos glicoprotéicos en esta misma fracción entre 15 y 108,2 kDa de peso molecular. Debido a su intensidad de reacción, la glicoproteína de 65 kDa, podría ser potencialmente útil para el diagnóstico de infecciones agudas, mientras que las de 97,5-100 y 108,2 kDa en conjunto con la de 65 kDa, para detectar infecciones crónicas.

Los resultados discutidos hasta aquí indican la naturaleza glicosídica de los antígenos identificados. La posibilidad de que los epítopes de estas macromoléculas estén

constituidos por oligosacáridos también fue investigada. Para ello, las proteínas inmovilizadas en papel de nitrocelulosa fueron sometidas a un proceso de oxidación/reducción. Los resultados obtenidos (Figura 20) muestran que después de este tratamiento, los anticuerpos presentes en la infección aguda sólo reconocieron el antígeno de 65 kDa, mientras que los anticuerpos de la infección crónica, además del 65 kDa reconocieron 4 antígenos adicionales (Figura 20A y B). Estos resultados parecen indicar que durante la fase aguda de la infección predominan los epítopes de tipo carbohidrato, mientras que en la fase crónica también son reconocidos epítopes en las cadenas polipeptídicas. De esta manera, puede que el doblete de 97,5-100 kDa reconocido por el suero de infección crónica haya disminuido la intensidad de su coloración después del tratamiento, por la oxidación/reducción de sus epítopes tipo glicano. El tratamiento con metaperiodato de sodio/borohidrato de sodio,²⁵ produce cambios bioquímicos y conformacionales en la parte glicosídica de las glicoproteínas que impiden que los anticuerpos puedan reconocer epítopes glicosídicos eliminándose de esta manera cualquier tipo de reacción (Woodward y col., 1985 citado en Alarcón de Noya, 2001).

Eberl y col. (2001) sugieren que una respuesta inmunitaria contra epítopes tipo glicano es producida en la etapa aguda de la infección, mientras que la respuesta contra epítopes peptídicos se produce predominantemente en la etapa crónica. Estos mismos autores (Eberl y col., 2001) suponen que dada la intensidad y la reactividad cruzada de la

²⁵ El metaperiodato de sodio rompe el anillo glicosídico de los azúcares y lo transforma en aldehídos (oxidación) y por acción del borohidrato de sodio, se convierten en alcoholes (reducción) (Woodward y col., 1985 citado en Alarcón de Noya, 2001).

respuesta anti-carbohidratos producida en la fase aguda de la infección, esta podría ser una “cortina de humo” para perturbar la respuesta del sistema inmunológico e impedir el reconocimiento de epítopes peptídicos más vulnerables en la larva (Eberl y col. 2001).

El hecho de que en la infección aguda se produzcan anticuerpos que reconocen epítopes polipeptídicos en la glicoproteína de 65 kDa y en la fase crónica contra otras moléculas (97,5-100 y 108,2 kDa), podría ser útil para la identificación de su secuencia polipeptídica y consecuentemente para la síntesis química de epítopes lineales destinados a la discriminación de estas dos fases de la enfermedad. Sin embargo, es necesario hacer una electroforesis en dos dimensiones para determinar si las glicoproteínas reconocidas antes y después del tratamiento con metaperiodato de sodio/borohidrato de sodio son las mismas.

Finalmente, el problema de las reacciones cruzadas con otras parasitosis, especialmente las producidas por ancilostomídeos intestinales (Alarcón de Noya y col., 1996) u otros trematodos como *Fasciola hepatica*, no fue investigado por falta de antisueros específicos. Sin embargo, el hecho de que los adultos de *S. mansoni* al igual que los tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* posean un glicocalix y sean residentes habituales del torrente sanguíneo (Buscaglia y col., 2006), nos condujo a investigar una posible reactividad cruzada entre ellos. Los extractos del glicocalix de cercarias completas y las fracciones de la cromatografía en ConA-agarosa (F1 y F2), fueron enfrentados a sueros de ratones con una infección crónica por *T. cruzi* antes y después del tratamiento con metaperiodato de sodio/borohidrato de sodio. Los resultados obtenidos mediante la técnica de inmunoblot, no mostraron reconocimiento de antígenos por los sueros anti *T. cruzi*

El establecimiento de una infección mixta *S. mansoni/Himenolepis sp* detectada en ratones durante los estudios cinéticos (Figura 21), y el análisis del antisuero respectivo frente al glicocalix de las cercarias (a través de inmunoblot), no produjo resultados concluyentes sobre una posible reactividad cruzada entre estos dos platelmintos. Un ensayo de pre-absorción del suero *S. mansoni/Himenolepis sp.* con céstodos del género *Hymenolepis*, podría ser útil para determinar si existe o no reactividad cruzada (Alarcón de Noya y col., 1996).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

- 1) Se confirmó la utilidad de las cercarias vivas en el diagnóstico serológico de la esquistosomiasis. Sin embargo, la cercario-reacción sólo fue visible al final de la fase aguda (8va semana de infección) y durante la fase crónica (>16 semanas de infección) e independiente de la presencia de huevos en hígado e intestino.
- 2) A pesar de que la cercario-reacción fue negativa durante la fase aguda, la técnica de inmunoblot permitió detectar anticuerpos contra componentes del glicocalix en esta fase.
- 3) Los patrones electroforéticos de los antígenos del glicocalix reconocidos por anticuerpos presentes en la fase aguda y crónica fueron muy parecidos. La cercario-reacción positiva parece haber sido consecuencia de la aparición de anticuerpos contra tres antígenos de alto peso molecular (104, 107 y 109,8 kDa).
- 4) El glicocalix de la cercaria está compuesto de glicoproteínas de las cuales un número reducido fue identificado como antígenos. Sin embargo, después de 16 semanas de infección (fase crónica), el patrón de antígenos glicoprotéicos con afinidad a la ConA se hace más complejo que el de 8 semanas de infección (fase aguda) con el reconocimiento de otras glicoproteínas de bajo peso molecular.
- 5) Los anticuerpos producidos durante la fase aguda parecen estar dirigidos contra epítopes glicosídicos mientras que los producidos durante la fase crónica, reconocen

epítopes glicosídicos y peptídicos en los mismos antígenos. La excepción la constituyó el antígeno de 65 kDa que fue reconocido antes y después del tratamiento por ambos antisueros, mientras que los antígenos dominantes de 97,5-100 y 108,2 kDa fueron reconocidos por el suero crónico antes y después del tratamiento. Estos resultados podrían ser útiles para estudios de secuenciación polipeptídica conducente a la síntesis química de epítopes lineales destinados al diagnóstico de las dos fases de la enfermedad.

- 6) Las cercarias pueden ser separadas mecánicamente en cuerpos y colas conservando los componentes del glicocalix y su antigenicidad. Sin embargo, nuevos antígenos aparecieron en ambas regiones como consecuencia de la separación (35; 53,6; 58,2 y 64 kDa).
- 7) La evaluación de la reactividad cruzada con parásitos relacionados es requerida para determinar la especificidad de los epítopes de estos antígenos glicoprotéicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Affinity Chromatography. Principles and Methods (1979). Pharmacia Fine Chemicals. Sweden.

Aguilar, C.M., Dávila, I., Pacheco, M., Incani, R.N. (1999). Guía de Parasitología. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.

Alarcón de Noya, B., Ruiz, R., Losada, S., Colmenarez, C., Contreras, R., Cesari, I.M., Noya, O. (2007a). Detection of schistosomiasis cases in low-transmission areas based on coprologic and serologic criteria. The Venezuelan experience. *Acta Trop.* **103**: 41-49.

Alarcón de Noya, B. (2007b). En Venezuela están los tres géneros de parásitos de mayor importancia mundial en salud pública. Disponible: http://boletin.uc.edu.ve/index.php?option=com_content&view=article&id=7936%3Aen-venezuela-estlos-tres-gros-de-partos-de-mayor-importancia-mundial-en-salud-pca&Itemid=12. [Consulta: 2010, octubre].

Alarcón de Noya, B., Ruiz-Guevara, R., Colmenares, C., Losada, S., Noya, O. (2006). Low transmission areas of schistosomiasis in Venezuela: consequences on the diagnosis, treatment, and control. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **101**(Suppl.I): 29-35.

Alarcón de Noya, B., Ruiz, R., Colmenares, C., Losada, S., Cesari, I.M., Toro, J., Noya, O. (2002). Schistosomiasis mansoni in areas of low transmission. Epidemiological characterization of Venezuela foci. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **97**(Suppl.I): 5-10.

Alarcón de Noya, B., Colmenares, C., Noya, O. (2001). Comunidad Antigénica y Reactividad Cruzada: su repercusión en el Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Parasitarias. Especial referencia a Esquistosomiasis. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica.* **20**(2): 163-171.

Alarcón de Noya, B., Colmenares, C., Lanz, H., Caracciolo, M.A., Losada, S., Noya, O. (2000). *Schistosoma mansoni*: immunodiagnosis is improved by sodium metaperiodate which reduces cross-reactivity due to glycosilated epitopes of soluble egg antigen. *Exp. Parasitol.* **95**: 106-112.

Alarcón de Noya, B., Balzan, C., Arteaga, C., Cesari, I., Noya, O. (1999). The Last Fifteen Years of Schistosomiasis in Venezuela: Features and Evolution. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **94**(2): 139-146.

Alarcón de Noya, B., Cesari, I.M., Losada, S., Colmenares, C., Balzà, C., Hoebeke, J., Noya, O. (1997). Evaluation of alkaline phosphatase immunoassay and comparison with other methods in areas of low transmission of schistosomiasis. *Acta Trop.* **66**: 68-78.

Alarcón de Noya, B., Colmenarez, C., Losada, S., Fermín, Z., Masroua, G., Ruiz, L., Soto, L., Noya, O. (1996). Do intestinal parasites interfere with the seroepidemiologic surveillance of *Schistosoma mansoni* infection?. *Epidemiol. Infect.* **116**(3):323-329.

Beck, L., Van-Lume, D.S.M., Souza, J.R., Domingues, A.L.C., Favre, T., Abath, F.G.C., Montenegro, M.L.S. (2008). Discriminating acute from chronic human schistosomiasis mansoni. *Acta Trop.* **108**: 229-233.

Bin Dajem, S.M., Mostafa, O.M.S. (2007). Scanning Electron Microscopical Studies on *Schistosoma mansoni* cercariae Exposed to Ultraviolet Irradiation. *Aust. j. basic appl. sci.* **1**(4): 776-784.

Brown, T.L., Bursten, B.E., Burdge, J.R. (2004). *Química: la ciencia central*. Novena edición. Editorial Pearson Prentice Hall. Madrid, España.

Buscaglia, C.A., Campo, V.A., Frasc, A.C.C., Di Noia, J.M. (2006). *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**:229-236.

Cambridge University Schistosomiasis Research Group (1998). Geographical Distribution of Schistosomiasis. [Documento en línea]. Disponible: <http://www.path.cam.ac.uk/~schisto/Background/Distribution.html> [Consulta: 2010, febrero].

Caulfield, J. P., Yuan, H. C., Cianci, C. M., Hein, A. (1988). *Schistosoma mansoni*: development of the cercarial glicocalix. *Exp. Parasitol.* **65**: 10-19.

Cesari, I., Alarcón de Noya, B. (1987). Esquistosomiasis mansoni. Diagnóstico y Control. Manual de campo y laboratorio. Centro de Estudios Avanzados-I.V.I.C. Caracas, Venezuela

Chand, M.A., Chiodini, P.L., Doenhoff, M.J. (2010). Development of a new assay for the diagnosis of schistosomiasis, using cercarial antigens. *Trans. R Soc. Trop. Med. Hyg.* **104**(4):255-258.

Culbertson, J.T. (1936). The cercaricidal action of normal serum. *J. Parasitol.* **28**: 111-125.

Cumming, R.D., Nyame, A.K. (1996). Glycobiology of schistosomiasis. *FASEB J.* **10**(8): 838-848.

Dalton, J.P., Lewis, S.A., Aronstein, W.S., Strand, M. (1987). *Schistosoma mansoni*: Immunogenic Glycoproteins of the Cercarial Glycocalyx. *Exp. Parasitol.* **63**: 215-226.

Eberl, M., Langermans, J.A.M., Vervenne, R.A., Kwame Nyame, A., Cummings, R.D., Thomas, A.W., Coulson, P.S., Wilson, R.A. (2001). Antibodies to glycans dominate the host response to schistosome larvae and eggs: Is their role protective or subversive?. *J. Infect. Dis.* **183**: 1238-1247.

Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.A., Kuby, J. (2004). *Inmunología*. Quinta edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Mexico D.F, México.

Hamilton, J.V., Klinkert, M., Doenhoff, M.J. (1998). Diagnosis of schistosomiasis: antibody detection, with notes on parasitological and antigen detection methods. *Parasitology*. **117**: S41-S57.

Hanyunga, E.G., Møllegård, I, Duncan, J.F. Jr., Sumner, M.P., Stek, M. Jr., Hunter, K.W. Jr.(1987). Early diagnosis of *Schistosoma mansoni* in mice using assays directed against cercarial antigens isolated by hydrophobic chromatography. *J. Parasitol.* **73**(2):351-362.

Harn, D.A., Cianci, C.M.L., Caulfield, J.P. (1989). *Schistosoma mansoni*: Immunization with Cercarial Glycocalyx Preparation Increases the Adult Worm Burden. *Exp. Parasitol.* **68**: 108-110.

Hockley, D.J. (1972). *Schistosoma mansoni*: the development of the cercarial tegument. *Parasitology* **64**: 243-252.

ITIS Standard Report Page: *Schistosoma mansoni*. [Documento en línea]. Disponible: http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=55320 [Consulta: 2010, febrero]. Actualizado 2010.

Katz, N., Rocha, R. S. Esquistosomiasis. En Atias, A. (1991). *Parasitología Clínica*. Publicaciones Técnicas Mediterraneo Santiago de Chile, Chile.

Katz, N., Chaves, A., Pellegrino, J. (1972). A simple device for quantitative stool thick smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Pablo.* **14**: 397-340.

Kemp, W.M., Damian, R.T., Greene, N.D. (1973). *Schistosoma mansoni*: immunohistochemical localization of the CHR reaction in the cercarial glycocalyx. *Exp. Parasitol.* **33**: 27-33.

Kemp, W.M. (1970). Ultrastructure of the cercarial hüllen reaktion of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* **56**: 713-723.

Klabunde, J., Berget, J., Jensenius, J.C., Klinkert, M., Zelck., U.E., Kremsner, P.G., Kun, J.F.J. (2000). *Schistosoma mansoni*: Adhesion of Mannan-Binding Lectin to Surface Glycoproteins of Cercariae and Adult Worms. *Exp. Parasitol.* **95**: 231–239.

Laemmli, U.K. (1970). Change of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Latorre, R., López-Barneo, J., Bezanilla, F. y Llinás, R. (1996). *Biofísica y Fisiología celular*. Publicaciones Universidad de Sevilla. Sevilla, España

McKee, T., McKee, J.R. (2003). *Bioquímica: la base molecular de la vida*. Tercera edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España.

McLare, D.J. (1980). *Schistosoma mansoni*: The parasite surface relation to host Immunity. Editorial Research Studies Press. London, Inglaterra.

McManus, D.P., y Loukas, A. (2008). Current Status of Vaccines for Schistosomiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**(1): 225-242.

Merril, C.R., Goldam, D., Sedman, S.A., Ebert, M.H. (1981). Ultrasensitive strain for protein to polyacrilamide gels. *Science*. **211**: 1437-1438.

Mikhail, M.M., Mansour, M.M., Farid, Z., Harrison, R. (1997). *Schistosoma mansoni* antigens applicable to diagnosis of prepatent infections. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* **27**(1):1-20.

Nanduri, J., Dennis, J.E., Rosenberrys, T.L., Mahmoud, A.A.F., Tartakoff, A.M. (1991). Glycocalix of Bodies Versus Tails of *Schistosoma mansoni* Cercariae. *J. Biol. Chem.* **266**: 1341-1347.

Norden, A.P., Stran, M. (1985). Identification of antigenic *Schistosoma mansoni* glycoproteins during the course of infection in mice and humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**(3):495-507.

Organización Mundial de la Salud (2010). Centro de Prensa. Esquistosomiasis. [Documento en línea]. Disponible: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/es/index.html> [Consulta: 2010, febrero]. Actualizado 2010

Payares, G., McLaren, D.J., Evans, W.H., Smithers, S.R. (1985a). Antigenicity and immunogenicity of the tegumental outer membrane of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasite. Immunol.* **7**(1):45-61.

Payares, G., McLaren, D.J., Evans, W.H., Smithers, S.R. (1985b). Changes in the surface antigen profile of *Schistosoma mansoni* during maturation from cercaria to adult worm. *Parasitology* **91**: 83-99.

Payares, G., Simpson, J.G. (1985). *Schistosoma mansoni* surface glycoproteins. Analysis of their expression and antigenicity. *Eur. J. Biochem.* **153**(1): 195-201.

Payares, G., Smithers, S.R., Evans, W.H. (1984). Purification and topographical location of tegumental alkaline phosphatase from adult *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **13**: 343-360.

Payares, G. (1979). Estudio sobre la biología del *Schistosoma mansoni*. Trabajo de Ascenso categoría Profesor Asistente. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela

Payares, G., Ercoli, N. (1978). *Schistosoma mansoni*: virulence and immunogenicity of immobilized cercaria. *Exp. Parasitol.* **45**(1): 1-7.

Pearce, E.J., MacDonald, A.S. (2002). The Immunobiology of Schistosomiasis. *Nat. Rev. Immunol.* **2**(7): 499-511.

Pearce, E.J., Magee, A.I., Smithers, S.R., Simpson, A.J.G. (1991). Sm25, a major schistosoma tegumental glycoprotein, is dependent on palmitic acid for membrane attachment. *EMBO J.* **10**(10): 2741-2746.

- Peña, M. y Payares, G. (2008). Proteínas y antígenos de la membrana tegumentaria externa de la cercaria de *Schistosoma mansoni*. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*. **5**: 165-168.
- Rabello, A. (1997). Diagnosing Schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **92**(5): 669-676.
- Ramalho-Pinto, F.J., Gazzinelli, G., Howells, R.E., Mota-Santos, T.A., Figueiredo, E.A., Pellegrino, J. (1984). *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule *in vitro*. *Exp. Parasitol.* **36**: 360-372.
- Rojas-Marcos, J., Azcoaga, A., Vidal, S., Ceresuela, E. (2009). Actualización. Esquistosomiasis humana: manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento. [Documento en línea]. Disponible: <http://www.jano.es> [Consulta: 2010, febrero].
- Samuelson, J.C., Caulfield, J.P. (1986). Cercarial Glycocalyx of *Schistosoma mansoni* Activates Human Complement. *Infect. Immun.* **51**(1): 181-186.
- Samuelson, J.C., Caulfield, J.P. (1985). The cercarial glycocalyx of *Schistosoma mansoni*. *J. Cell. Biol.* **100**(5): 1423-1434.
- Sher, A., Benno, D. (1982). Decreasing immunogenicity of schistosome larvae. *Parasite Immunol.* **4**: 101-107.
- Smithers, S.R., Terry, R.J. (1965). The infection of laboratory host with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. *Parasitology* **55**: 695-700.
- Stirewalt, M.A., Evans, A.S. (1955). Serologic reactions in *Schistosoma mansoni* infections. I. Cercaricidal, precipitation, agglutination, and CHR phenomena. *Exp. Parasitol.* **4**(2):123-42.
- Tasheva, B., Dessev, G. (1983). Artifacts in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis due to 2-mercaptoethanol. *Analyt. biochem.* **129**: 98-102.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**(9): 4350-4354.

Valli, L.C.P., Kanamura, Y., Da Silva, R.M., Ribeiro-Rodrigues, R., Dietze, R. (1999). Schistosomiasis mansoni: immunoblot analysis to diagnose and differentiate recent and chronic infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **61**(2):302-307.

van Lieshout, L., Polderman, A.M., Deelder, A.M. (2000). Immunodiagnosis of schistosomiasis by determination of the circulating antigens CAA and CCA, in particular in individuals with recent of light infections. *Acta Trop.* **77**: 69-80.

Vieira, L.Q., Gazzinelli, G., Kusel, J.R., De Sousa, C.P.S., Colley, D.G. (1986). Inhibition of human peripheral blood mononuclear cell proliferative responses by released materials from *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasite Immunol.* **8**: 333-343.

Weiss, W., Postel, W., Gorg, A. (1991). Barley cultivar discrimination: I. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and glycoprotein blotting. *Electrophoresis* **12**(5): 323-330.

Whitfield, P.J., Bartlett, A., Khammo, N., Brain, A.P.R., Brown, M.B., Marriott, C., Clothier, R. (2003). Delayed tail loss during the invasion of human skin by schistosome cercariae. *Parasitology.* **126**: 135-140.

WHO (2009). Schistosomiasis: countries o areas at risk [Documento en línea]. Disponible: http://www.nps.org.au/health_professionals/publications/nps_radar/2009/august_2009/brief_item_praziquantel [Consulta: 2010, febrero].

WHO (1987a). Atlas of the global distribution of Schistosomiasis [Documento en línea]. Disponible: <http://www.who.int/wormcontrol/documents/maps/en/contents.pdf> [Consulta: 2010, febrero]. Actualizado 2010

WHO (1987b). Atlas of the global distribution of Schistosomiasis. Venezuela-Suriname. [Documento en línea]. Disponible: http://www.who.int/wormcontrol/documents/maps/en/venezuela_suriname.pdf [Consulta: 2010, febrero]. Actualizado 2010.

Xu, X.F., Stack, R. J., Rao, N., Caulfield, J.P. (1994). *Schistosoma mansoni*: Fractionation and Characterization of the Glycocalyx and Glycogen-like Material from Cercariae. *Exp. Parasitol.* **79**: 399-409.

Xu, X.F., Holm, M.J., Chiu,L., Devens, B.H., Caulfield,J.P. (1993). The cercarial glycocalyx of *Schistosoma mansoni* is a lymphocyte mitogen. *Mol. Biol. Cell.* **4**: 455a.