

00361
8

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

"ESTUDIO DE LAS GLICOPROTEINAS DE SUPERFICIE DEL
CISTICERCO DE LA Taenia solium"

Tesis que para obtener el grado de Maestria en
Ciencias (Biologia)

presenta el

G. F. B. Abraham Landa Piedra

MEXICO, D.F. 1988.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

Un extracto de cisticercos de Taenia solium fué pasado a través de una columna de sefarosa 2B-Con A. El material retenido (fracción Emm) se analizó en geles de poliacrilamida con SDS. Al teñir los geles con azul brillante de Coomassie se revelaron 19 proteínas de las cuales ocho, también se tñieron con ácido periodico de Schiff (PAS).

A partir de la fracción Emm se purificaron seis glicoproteínas por medio de un método de electroelución, las cuales se designaron de acuerdo a su peso molecular como: Gp1 (180,000), Gp2 (103,000), Gp3 (96,000), Gp4 (68,000), Gp5 (55,000) y Gp6 (45,000). Se prepararon cuatro sueros hiperinmunes en conejo en contra de las glicoproteínas purificadas (anti-Gp1, anti-Gp2-3, anti-Gp5, anti-Gp6). Las fracciones de IgG de estos sueros fueron utilizadas en estudios de inmunocitoquímica para la localización de las glicoproteínas en el tejido de cisticercos de T. solium. Los resultados demostraron la presencia de todas las glicoproteínas en la superficie tegumental del cisticerco. También se demostró la presencia de Gp1 en la superficie tegumental de otros metacéstodos ténidos tales como T. saginata, T. crassiceps, T. pisiformis, así como en el adulto de la T. solium. Ensayos de inmunoelectrotransferencia mostraron que la glicoproteína Gp5 corresponde a la cadena pesada de IgG porcina, indicando que la superficie parasitaria posee componentes tanto parasitarios como del huésped. Ensayos en los que se utilizó a la fracción Emm como antígeno en pruebas de ELISA para el diagnóstico de la neurocisticercosis, mostraron una sensibilidad equivalente a la obtenida con un extracto crudo (85-90 %) o con antígeno B puro (80-90 %), con la ventaja de presentar menor número de reacciones cruzadas con sueros de pacientes infectados por otros parásitos.

INDICE GENERAL

	PAGINAS
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
RESUMEN.....	v
INDICE GENERAL.....	vi
I. INTRODUCCION.....	1
A. CLASIFICACION DEL PARASITO.....	1
B. CICLO BIOLOGICO Y MORFOLOGIA.....	1
C. IMPORTANCIA DE LA CISTICERCOSIS.....	4
1. Cisticercosis humana.....	4
2. Impacto económico de la cisticercosis humana.....	6
3. Cisticercosis porcina.....	6
4. Impacto económico de la cisticercosis porcina.....	8
D. DIAGNOSTICO.....	8
E. RESPUESTA INMUNOLOGICA.....	9
1. Antigenos.....	9
2. Anticuerpos.....	10
3. Células.....	10
F. RESPUESTA INFLAMATORIA DEL HUESPED (CERDO).....	11
G. INTERFASE HUESPED-PARASITO.....	12
1. Superficie parasitaria.....	12
2. Componentes del huésped.....	20
3. Aspectos dinámicos.....	22

II. MATERIALES Y METODOS.....	25
A. MATERIALES.....	25
1. Metacéstodos.....	25
2. Reactivos biológicos y químicos.....	26
B. METODOS.....	27
1. Bioquímicos.....	27
a. Obtención de extractos crudos (EC).....	27
b. Purificación de las glicoproteínas.....	28
c. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS)....	29
d. Electroelución de las glicoproteínas....	29
e. Isoelectroenfoque.....	30
f. Varios.....	30
1) Determinación de proteínas.....	30
2) Determinación de carbohidratos.....	31
2. Inmunológicos.....	31
a. Preparación de sueros hiperinmunes.....	31
b. Purificación de anticuerpos a partir de sueros hiperinmunes.....	31
c. Doble inmunodifusión (DID) e Inmuno- electroforesis (IEF).....	31
d. Ensayo inmunoenzimático (ELISA).....	32
e. Inmuno electrotransferencia (EIT).....	33
f. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	34
g. Inmunoperoxidasa indirecta (IPI).....	35
III. RESULTADOS.....	36
A. OBTENCION DE LAS FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN GLICOPROTEINAS.....	36
B. ANALISIS DE LOS ANTIGENOS DE LAS FRACCIONES Emm y Fmm.....	39

C.	PURIFICACION DE LAS GLICOPROTEINAS A PARTIR DE LA FRACCION Emm.....	40
D.	CARACTERIZACION INMUNOLOGICA DE LAS GLICOPROTEINAS PURIFICADAS.....	42
E.	UTILIDAD DE LA FRACCION Emm EN EL INMUNODIAGNOSTICO DE LA CISTICERCOSIS HUMANA POR LA TECNICA DE ELISA.....	43
F.	LOCALIZACION DE LAS GLICOPROTEINAS EN EL TEJIDO DEL CISTICERCO.....	45
G.	LOCALIZACION DE LAS GLICOPROTEINAS EN METACESTODOS DE OTRAS ESPECIES.....	46
H.	IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA GLICOPROTEINA Gp5.....	47
I.	CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS ANTI-GLICOPROTEINAS POR EIT.....	48
IV.	DISCUSION.....	49
V.	BIBLIOGRAFIA.....	60

I. INTRODUCCION

A. CLASIFICACION TAXONOMICA DEL PARASITO (1).

Reino	: Animalia
Subreino	: Metazoa
Phylum	: Platyhelminthes
Clase	: Cestoda
Orden	: Cyclophyllidea
Superfamilia	: Taenoiidea
Familia	: Taenidae
Genero	: Taenia
Especie	: solium
Etapa larvaria	: Cisticerco

B. CICLO BIOLOGICO Y MORFOLOGIA (Fig. 1).

El humano es el único huésped de la Taenia solium adulta la cual habita en su intestino delgado, en donde puede llegar a vivir hasta 25 años (2). La tenia adulta mide normalmente 1.5 a 5 m, aunque ocasionalmente puede alcanzar los 8 m. Su cuerpo se divide en 3 regiones: escólex, cuello y estróbilo o cuerpo. El escólex que mide alrededor de un milímetro de diámetro (Fig. 2), posee 4 ventosas y un rostelo armado con una doble corona de ganchos. El número de ganchos rostelares puede variar entre 22 y 33; su tamaño promedio es de 165 ± 5 μ m de longitud (3). El

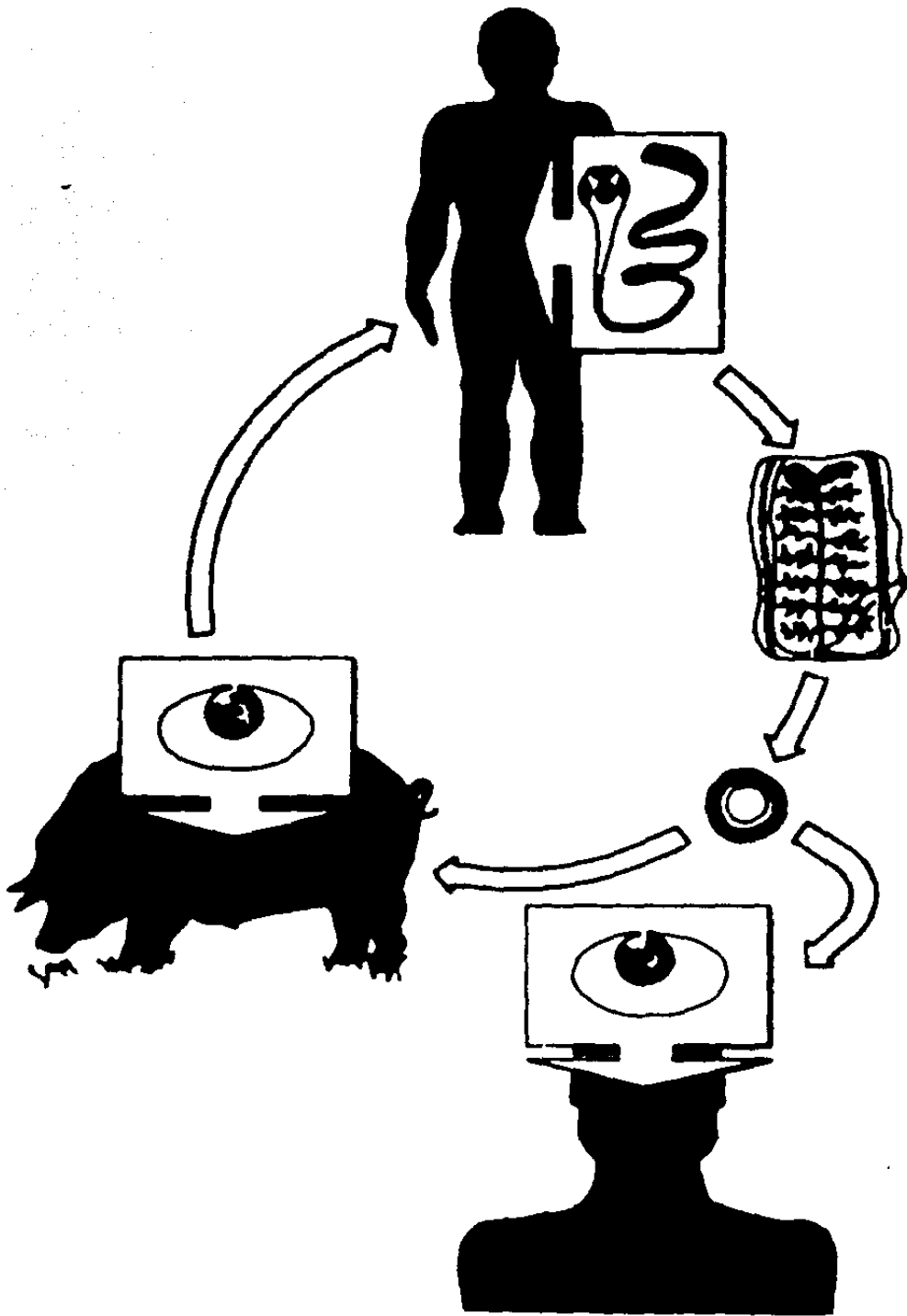


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*.

cuello es corto, sin segmentaciones y de menor diámetro que el escólex. El estróbilo consta de una serie de segmentos fusionados llamados proglótidos. Los proglótidos más cercanos al cuello son los más jóvenes e indiferenciados y de tamaño variable; son más anchos que largos y presentan rudimentos de los órganos genitales. Hacia la parte media del estróbilo se encuentran los proglótidos maduros (Fig. 3A) que son casi cuadrados y que contienen los testículos y un ovario trilobulado (2). Al final del estróbilo se encuentran los proglótidos grávidos que son más largos que anchos (7-12 mm longitud y 5-6 mm de ancho) con un saco uterino central que presenta 7-13 ramificaciones laterales repletas de huevecillos (~50,000 c/u) (Fig. 3B). Los proglótidos grávidos se desprenden espontáneamente del gusano adulto y son liberados en las heces con un promedio de 4-5 por día (2,3). En el medio ambiente, la descomposición de los proglótidos grávidos permite la liberación de los huevecillos que pueden contaminar aguas, suelos y alimentos. La primera expulsión de proglótidos de T. solium generalmente ocurre entre los 62 y 72 días después de la infección (4). Los huevecillos son esféricos, miden de 31-45 μ m de diámetro y presentan una capa externa o vitelo, un embrióforo denso y estriado con una membrana interna (5). Estas envolturas hacen posible la sobrevivencia de la oncosfera o embrión hexacanto en el medio ambiente (6). Al centro se encuentra una oncosfera o embrión hexacanto con 3 pares de ganchos (Fig. 4).



Figura 2. Micrografía electrónica de barrido de un cisticerco evaginado de *T. solium*. V- ventosa, G- gancho, R- rostello, C- cuello (cortesía del Dr Juan Pedro Laclette).

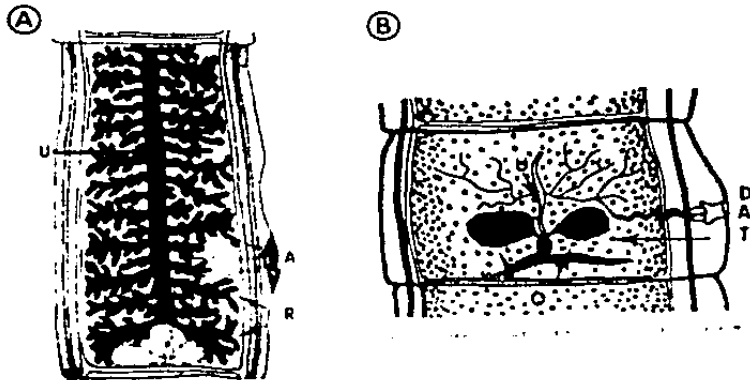


Figura 3. A) Ilustración esquemática del aparato reproductor de *T. solium*. A) un proglótido maduro. B) proglótido grávido mostrando: A- atrio genital, D- ducto genital, O- ovario trilobulado, T- testículo, U- útero, V- vagina y R- ramas uterinas.

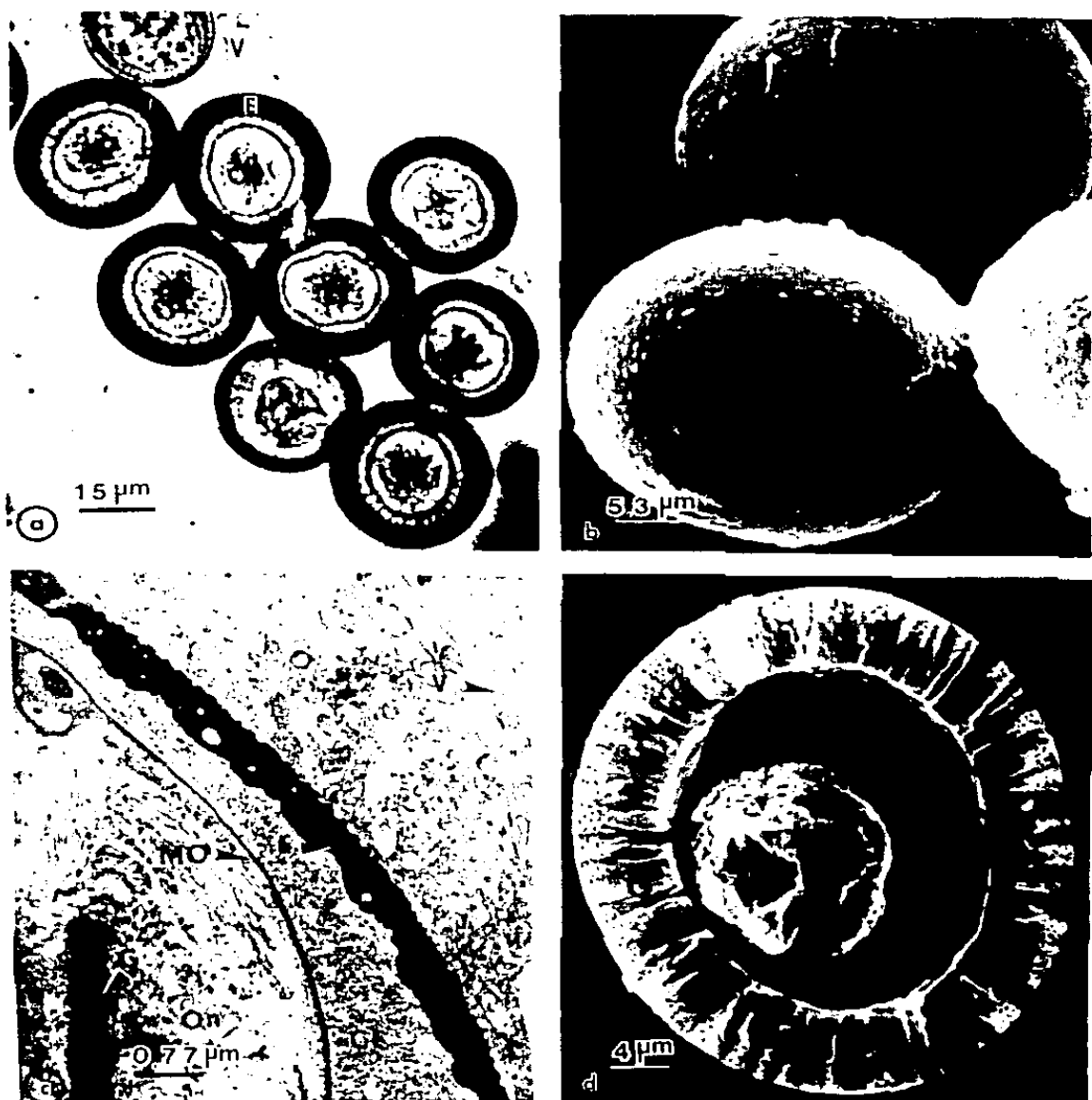


Figura 4. Huevecillos de *E. galium* observados en a) microscopía de luz, microscopía de barrido de b) huevecillos enteros y d) interior de un huevecillo. Así como en microscopía de transmisión c) corte de un huevecillo inmaduro. CE- célula embrioforal, E- embrioforo, G- ganchos oncosferales, Mo- membrana oncosferal, On- oncosfera, V- vitelo (5).

Cuando el hombre o el cerdo ingieren huevecillos por ingestión directa de heces, aguas y/o alimentos contaminados, las enzimas proteolíticas y sales biliares del tracto digestivo degradan la cubierta principal del huevecillo (embrióforo), y al mismo tiempo, proveen la señal para la activación de la oncosfera (5, 7). Al llegar al duodeno se desintegra la cubierta del huevecillo, liberándose la oncosfera. Las oncosferas, aparentemente ayudadas por sus ganchos y por secreciones líticas, atraviesan la pared intestinal, hasta alcanzar capilares linfáticos y sanguíneos a través de los cuales serán transportadas a diferentes tejidos del cuerpo, como el subcutáneo, muscular, vísceras, ojo y sistema nervioso central, etc. Aunque se desconocen muchos eventos después de la penetración de las oncosferas, se sabe que el embrión requiere al menos 10 semanas para convertirse en un cisticerco (8).

El gusano vesicular o cisticerco puede sobrevivir por varios años en los tejidos del huésped intermediario (8). El cisticerco de la *T. solium* está formado por una vesícula translúcida, redonda u ovoide, que mide 0.5-2 cm de diámetro y que se encuentra llena de líquido; el metacéstodo invaginado forma un canal en espiral en cuyo extremo interno se encuentra al escólex (5,7) (Fig. 5).

El ciclo vital se completa cuando el humano ingiere carne de cerdo cisticercoso, cruda o insuficientemente cocida. Nuevamente las enzimas del tracto digestivo y sales biliares, activan al

cisticerco para evaginar el escólex el cual se fija a la pared intestinal (9). Una vez fijo, el pequeño gusano crece y se diferencia hasta convertirse en una Tenia adulta, en aproximadamente ocho semanas.

Cabe mencionar que el cerdo es el principal huésped intermedio de la T. solium, aunque otras especies como el perro, jabali, monos, etc., incluyendo al hombre, pueden también ser infectados (3, 10, 11, 12).

C. IMPORTANCIA DE LA CISTICERCOSIS.

La cisticercosis por T. solium está considerada como un serio problema de salud pública y de economía en el mercado e industria de alimentos elaborados con carne de cerdo en algunos países de Asia, Africa y América Latina; incluyendo a México (8, 13-17).

1. Cisticercosis humana:

La cisticercosis humana es una enfermedad importante en México por su prevalencia aparentemente alta así como por la severidad de sus manifestaciones clínicas. Cuando la larva se localiza en el sistema nervioso central causa cuadros neurológicos, que pueden producir invalidez e incluso la muerte (18, 19, 20).

Se desconoce la prevalencia real de la cisticercosis humana en el país por varios motivos, entre ellos destacan: la falta de

estudios epidemiológicos al respecto; asimismo, no existe un método de diagnóstico utilizable a nivel masivo con un 100 % de eficiencia. Además, cuando el parásito se localiza en tejido muscular o subcutáneo la infección puede cursar asintóticamente.

Existen algunos reportes que sugieren que la prevalencia de este padecimiento es alta. Por ejemplo, estimaciones obtenidas a partir de estudios de autopsias en distintas instituciones hospitalarias (18-31), indican que la prevalencia podría alcanzar un 2 %. A su vez, estudios seroepidemiológicos han demostrado la presencia de anticuerpos anticisticerco en 1-3.8 % de la población abierta en México (32-37). Los datos antes mencionados deben ser tomados con cautela puesto que la población hospitalaria no constituye una muestra representativa de la población total. Asimismo, la presencia de anticuerpos en un individuo demuestra solamente que ha tenido contacto con el parásito y no necesariamente, que esté infectado. Por los estudios seroepidemiológicos antes mencionados se sugirió que el riesgo de contraer la enfermedad es variable en las diferentes áreas geoeconómicas del país (Fig. 6). El mayor porcentaje de sueros positivos se encontró en el área # 5 constituida por los estados de Guanajuato, Jalisco, Michoacán y Nayarit, que corresponde a la región más importante en la producción de cerdos (36). No se encontró ningún factor que determinara o se asociara claramente con la prevalencia de la enfermedad en las distintas clases culturales, económicas y so-

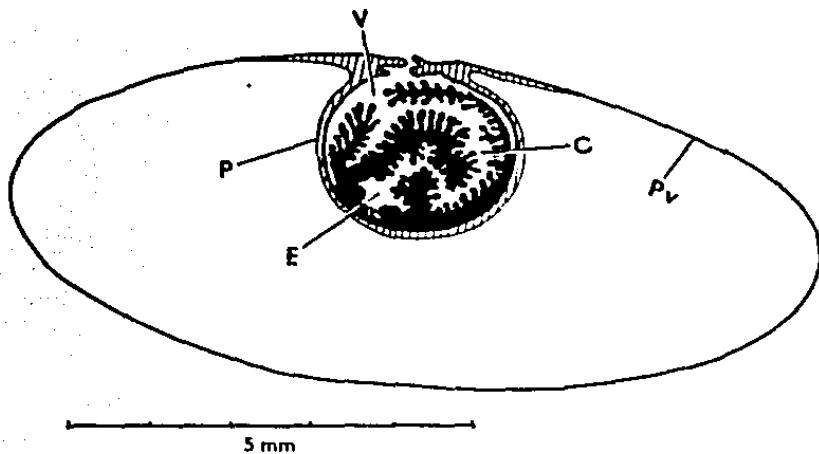


Figura 5. Ilustración esquemática del metacéstodo de *T. solium*. E- escólex, C- canal espiral, V- espacio vestibular, P- pared vestibular y Pv- pared vesicular (150).

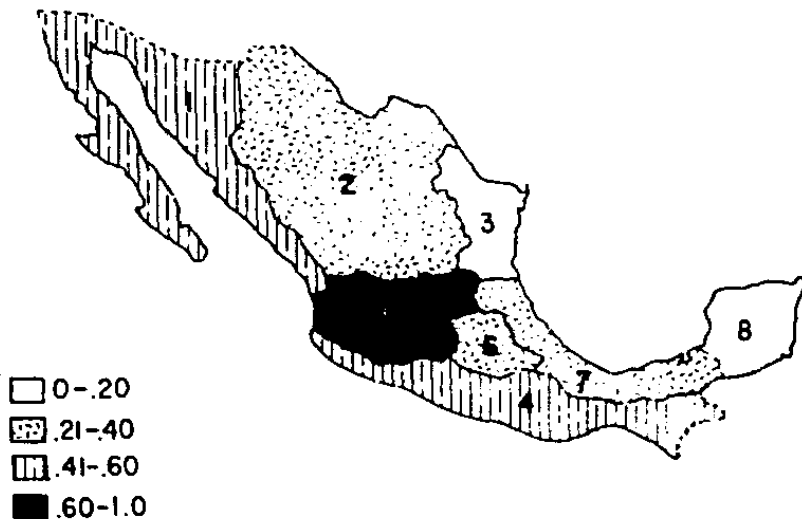


Figura 6. Mapa de las áreas geoeconómicas de la República Mexicana indicando la frecuencia por regiones de anticuerpos anti-cisticerco. El mayor porcentaje corresponde al área número 5, seguida de las áreas cercanas al océano pacífico (36).

ciales dentro de las áreas geoeconómicas de México (36). Esto hace suponer que el riesgo de contraer la enfermedad está determinado por una asociación compleja de factores o por un factor único que no discrimina entre los distintos grupos socioculturales.

2. Impacto económico de la cisticercosis humana:

Estudios de Velasco-Suárez y cols., realizados en el año de 1981, reportaron que 42,000-98,000 individuos de los 70 millones de habitantes que tenía el país; estaban afectados por neurocisticercosis. Los autores calcularon pérdidas económicas anuales de esos individuos en 60,000 pesos/año/enfermo, debidas a una incapacidad para asistir a su trabajo, entre 2,500 y 5,900 millones de pesos (equivalentes a 110-255 millones de dólares); sin incluir gastos de atención médica hospitalaria que solventan durante la atención, a pacientes con neurocisticercosis (37).

3. Cisticercosis porcina:

La información disponible sobre la prevalencia y distribución geográfica de la cisticercosis porcina ha sido obtenida a partir de investigaciones en los registros de los rastros del país. Numerosos estudios nos hablan de la prevalencia de la cisticercosis porcina en México (38-44). Los resultados varían dependiendo de las zonas estudiadas y el método empleado para detectar la parasitosis. Por ejemplo en 1954 se encontró que la frecuencia de la cisticercosis en cerdos en diferentes localidades del país era de 4.6 % (43), otro estudio realizado en San Luis Potosí por

observación macroscópica obtuvo un porcentaje de 4.3 %, este porcentaje aumentó al 24 % al estudiar los sueros de los cerdos por fijación de complemento y aunque esta prueba no es muy sensible indica que a la inspección ocular se escapan un gran número de cerdos infectados (44). En el rastro de Ecatepec, Estado de México, se analizaron por IEF 3,000 sueros de cerdos, obteniéndose una positividad de 38.6 %; sin embargo por inspección sanitaria, únicamente el 0.3 % de estos cerdos fueron decomisados (45).

El estudio más completo se realizó durante los años 1980-81 con información de 75 rastros en 22 estados de la República (39). El promedio nacional resultó ser de 1.55 % con un rango desde 0.004 % en Monterrey, N. L. hasta un 10 % en Ocampo, Gto. y en la Piedad, Mich.; sin embargo, al igual que en el caso de la cisticercosis humana estas cifras no son confiables debido a las siguientes razones: Un gran número de cerdos son sacrificados sin pasar por una inspección sanitaria; la inspección de carne se lleva a cabo bajo la supervisión de tres autoridades distintas, cada una con sus propios estándares y reglamentos (Secretaría de Salubridad y Asistencia que controla alrededor de 200 rastros en las grandes ciudades; la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos que controla los animales de exportación y las autoridades municipales que controlan los rastros de las localidades menores). Además, el método utilizado para la inspección no detecta a todos los cerdos infectados, por lo que animales con infecciones ligeras pueden pasar desapercibidos (46).

4. Impacto económico de la cisticercosis porcina:

En un estudio realizado en el estado de Sonora en un periodo de 7.5 años (1967-1974), se encontró que el 0.54 % de los cerdos sacrificados estaban infectados, representando pérdidas de 1,300,000 millones de pesos (equivalente a 56,719 millones de dólares) (47). En el año de 1980 de acuerdo con Acevedo Hernández, el 1.55 % de los cerdos sacrificados fueron encontrados infectados durante la inspección sanitaria, provocando pérdidas económicas que ascendieron a 1,000 millones de pesos en ese año (equivalentes a 43 millones de dólares en ese año) (48).

D. DIAGNOSTICO.

El diagnóstico de la cisticercosis cerebral humana se realiza tomando en cuenta la sintomatología o cuadro clínico del paciente, en combinación con técnicas radiológicas como la tomografía axial computarizada (TAC) (49) y/o inmunológicas como la inmunoelectroforesis (36), hemaglutinación (32, 50), fijación de complemento (51), ensayo inmunoenzimático (ELISA) y el ensayo de inmunoelectrotransferencia (EIT) en suero y líquido cefalorraquídeo (52). En el caso de otras localizaciones del cisticercosis como la subcutánea o la muscular, el diagnóstico se confirma por biopsia. Finalmente en la cisticercosis ocular, el oftalmoscopio permite la observación "in situ" del parásito vivo (53-55).

E. RESPUESTA INMUNOLOGICA.

La presencia de uno o de varios cisticercos en los tejidos del huésped intermediario induce la formación de una respuesta inmunológica. A pesar de esto, los cisticercos logran sobrevivir por largos periodos de tiempo, es decir los niveles de anticuerpos y células específicos parecen tener poca o ninguna relación con el estado clínico del paciente. A continuación se presenta un resumen de la información disponible acerca de los componentes moleculares que participan en la respuesta del huésped cisticercoso.

1. Antígenos:

Estudios de inmunolectroforesis (IEF) en los que se enfrenta un extracto crudo de cisticercos en contra de sueros de pacientes neurocisticercosos, permitieron establecer una clasificación de los antígenos parasitarios de acuerdo a su movilidad relativa. Ocho fueron los antígenos reconocidos, a los que se denominó con las primeras letras del alfabeto (Fig. 7). Un antígeno isoeléctrico designado como antígeno B (AgB) resultó ser el más frecuentemente reconocido (84 %) por los sueros de pacientes, que tuvieron niveles de anticuerpos detectables por IEF. Otros antígenos menos reconocidos fueron: el antígeno A (47%), el antígeno E (35%), el C (30 %), etc.. (36, 56).

2. Anticuerpos:

De acuerdo con los anteriores estudios, se encontró que la respuesta humoral en contra del cisticerco de la *T. solium* es muy heterogénea. Esta heterogeneidad se refiere no solo al número y al tipo de antígenos que cada suero reconoce sino también a la clase de inmunoglobulinas que produce cada paciente (Tabla I). Por ejemplo el 77 % de estos sueros de pacientes contenían anticuerpos contra 1-3 antígenos, mientras que sólo el 1 % reconoce a los 8 antígenos ya mencionados. Con respecto a las clases de inmunoglobulinas que constituyen los anticuerpos anticisticerco, se encontró IgG en el 98 % de los sueros, IgM en el 80 %, IgE en el 37 %, IgA en el 29 % e IgD en el 24 % (36, 56).

3. Células:

La respuesta inmune celular en la cisticercosis humana ha sido estudiada utilizando las técnicas de transformación blastoide y formación de rosetas por linfocitos T y B. Los resultados mostraron que los niveles circulantes de linfocitos T y B en los pacientes con cisticercosis son normales, asimismo, no hubo diferencias significativas entre la respuesta a mitógenos de las células de pacientes cisticercosos y las de individuos normales (56, 57). Sin embargo, la respuesta al PPD que en la población abierta en México es notablemente alta (64 %), se encuentra significativamente disminuida en los pacientes con cisticercosis (17 %). Esto sugiere una depresión en la funcionalidad de los linfocitos T y está de acuerdo con fenómenos de inmunosupresión reportados en ratones infectados por *Taenia crassiceps* (58-60).

Frecuencia %
(116 sueros)

B 84
A 47
E 35
C 30
D 25
G 22
H 21
F 14



Figura 7. Diagrama de las 8 bandas de precipitación encontradas por inmunolectroforesis de sueros humanos contra un extracto de cisticercos de T. solium (56).

Tabla I. Frecuencia en porcentaje de la reacción de IEF de los 8 antígenos encontrados por el cisticerco de T. solium y las 5 clases de inmunoglobulinas (56).

Inmunoglobulinas	Bandas de precipitación							
	B	A	E	C	D	G	H	F
IgG	98	83	69	100	29	45	37	30
IgM	70	41	23	31	12	20	16	20
IgE	25	18	19	18	0	0	11	0
IgA	22	10	19	17	6	12	5	0
IgD	20	0	11	6	0	0	6	0

F. RESPUESTA INFLAMATORIA DEL HUESPED (CERDO).

El cisticerco de la T. solium en los tejidos del hombre y del cerdo induce una reacción inflamatoria local, que puede ser considerada como un granuloma crónico por el tipo de células que presenta (61). Estudios de la reacción inflamatoria que rodea al cisticerco de la T. solium en el músculo esquelético de cerdos infectados, han mostrado que existen diferentes tipos celulares tales como: macrófagos, células epitelioides, células gigantes, fibroblastos, eosinófilos y neutrófilos, linfocitos y células plasmáticas, estas últimas localizadas casi siempre a distancia del parásito. El infiltrado inflamatorio no es constante en cuanto al número y tipos celulares, por ejemplo algunos granulomas contienen un número considerable de células plasmáticas, mientras que otros presentan muy pocas. Además, el infiltrado inflamatorio es más abundante en los polos y en frente a la salida del canal espiral que en otras áreas. Las células más abundantes en la cercanía de la superficie parasitaria son los macrófagos y los eosinófilos. A mayor distancia se encuentran linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, células epitelioides, células gigantes, células cebadas y fibroblastos (61, 62). Recientemente, se demostró que existe una síntesis de anticuerpos de las clases IgG, IgM e IgA en la reacción inflamatoria (62). La

evolución del granuloma generado por el cisticerco de la *I. solium* ha sido poco estudiado a lo largo del tiempo, principalmente porque no se cuenta con un modelo experimental. Asimismo la participación relativa de macrófagos, células T, eosinófilos etc., en el granuloma no ha sido investigada.

Los resultados antes mencionados, además de escasos, aportan poca información sobre la respuesta inmune del huésped en la vecindad del parásito. Por ejemplo la especificidad y los niveles de anticuerpos y células circulantes pueden no tener relación con lo que ocurren en la interfase huésped-parásito.

Así pues, la comprensión de los mecanismos que participan en el mantenimiento de la relación huésped-cisticerco, solamente se logrará a través del estudio detallado de los componentes moleculares que por parte del huésped y del parásito participan en ella.

G. INTERFASE HUESPED-PARASITO.

La interfase huésped parásito ha sido definida como la región de contacto físico y químico entre ambos organismos. Es a través de esta interfase que los dos organismos interaccionan entre sí. (63).

1. Superficie Parasitaria:

Las características morfológicas y bioquímicas de la superfi-

cie externa de los parásitos, determinan como se establecerá la interacción con sus huéspedes. En el caso de los metacéstodos ténidos, la superficie que estos organismos le presentan a sus respectivos huéspedes, es un tegumento citoplásmico, sincicial y continuo en toda la cara externa de la pared vesicular. Los céstodos carecen de tracto digestivo, por lo que obtienen sus nutrientes y excretan sus desechos a través de la superficie tegumental (64). En congruencia con su capacidad absortiva esta superficie aparece aumentada por microtricas, que son estructuras similares a las microvellosidades del epitelio intestinal de vertebrados e invertebrados (65, 66). A su vez, la superficie más externa del tegumento es una membrana plásmatica que presenta un rico glicocálix constituido por glicoproteínas y glicolípidos (61, 63, 64, 67) (Fig. 8). Algunas glicoproteínas aparentemente están involucradas en fenómenos de transporte de solutos (63, 64, 68), mientras que otras pudieran jugar papeles como receptores de señales o en la protección del parásito (63).

Micrografías de microscopia electrónica de la superficie de los céstodos indican que el glicocálix está constituido por estructuras filamentosas adheridas a la membrana (63, 69). Esta cubierta filamentosa es uniforme y no se altera por lavado con ácido etilendiamino tetracético (EDTA) y otros agentes quelantes los cuales pueden separar material débilmente unido a la membrana (63, 64). Esta evidencia se ha usado como argumento en favor de que al menos tales estructuras son componentes integrales de la membrana.

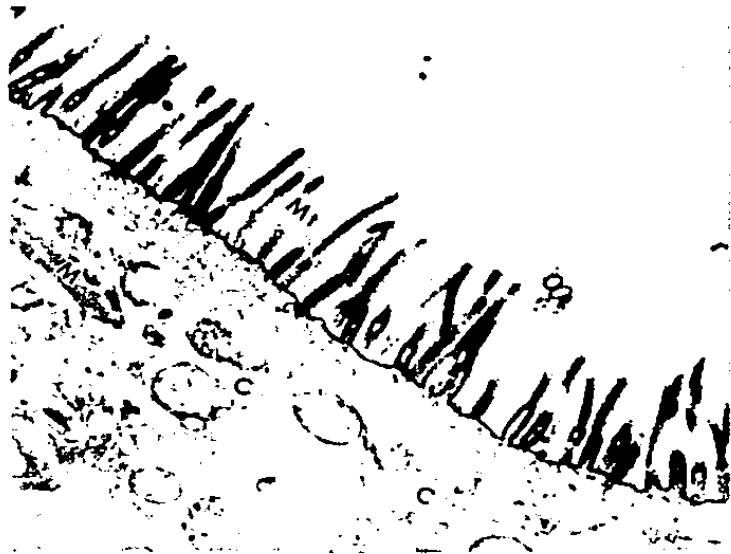


Figura 8. Micrografia electrónica de transmisión de un corte de pared vesicular del cisticerco de T. solium mostrando: C- canales citoplásmicos, M- músculo, Mt- microtricas. La superficie del tegumento de la pared vesicular fué post-fijada con rojo de rutenio para hacer evidente el glicocálix.

La presencia de carbohidratos en la superficie de los céstodos T. solium y T. crassiceps, se ha demostrado por microscopía electrónica con tinciones tales como PAS, rojo de rutenio, subnitrato alcalino de bismuto y con lectinas como Concanavalina A (Con A) conjugadas con ferritina o peroxidasa (61, 67, 69, 70). Por los anteriores estudios, se sabe que el glicocálix contiene sitios aniónicos y catiónicos, siendo los sitios aniónicos mucho más abundantes, lo que le da una carga fuertemente negativa (63). A esta carga negativa se le ha atribuido la propiedad de adsorción de moléculas iónicas del medio externo, por medio de uniones electrostáticas. Por ejemplo, H. diminuta y Lacistorhynchus tenuis adsorben hierro coloidal y calcio "in vitro" (69, 71, 72). Por otros estudios se ha demostrado que la adsorción de calcio tiene relación con la actividad de enzimas presentes en el tegumento (73), por ejemplo: la actividad de fosfohidrolasa alcalina decrece si se utilizan agentes quelantes como EDTA.

Estudios de localización en microscopía óptica utilizando diferentes lectinas marcadas con isotiocianato de fluoresceína (Con A, lectina de Lens culinaris (LCH), aglutinina de germen de trigo (WGA), aglutinina de cacahuete, aglutinina de Ricinus communis (RCA) y una aglutinina que une a fucosa), mostraron que sólo la Con A y la LCH se unieron a la superficie de los cisticercos, sugiriendo que la mayor cantidad de carbohidratos expuestos en la superficie del metacéstodo de T. taeniaeformis son

D-manosa y/o D-glucosa, y que la mayor abundancia de estos carbohidratos se encontraba en el tegumento del escólex (67, 70). Otros estudios en los que se utilizaron las lectinas para detectar los carbohidratos por la técnica de inmunoelectrotransferencia en extractos de T. solium, describen 24 glicoproteínas conteniendo cadenas de oligosacáridos con N-acetil-D-glucosamina y alfa-D-galactosa. En contraste, oligosacáridos con grupos de beta-D-galactosa, L-fucosa, N-acetil-D-galactosamina y ácido siálico no fueron detectables usando lectinas específicas para estos azúcares (74). Análisis bioquímicos de la membrana del cisticerco de la T. hydatigena (75) han revelado que los polisacáridos del tegumento contienen glucosa, glucosamina, galactosamina y 14 aminoácidos. El tratamiento de los metacéstodos con enzimas específicas para carbohidratos ha contribuido a su caracterización. Por ejemplo, la incubación de H. diminuta con neuraminidasa libera ácido siálico identificable por métodos químicos (64, 76). Estudios bioquímicos de tegumentos aislados de Hymenolepis diminuta, revelaron una composición de 24 proteínas, 6 de las cuales eran glicoproteínas que se encontraban localizadas externamente en la membrana tegumental (77). Por estudios similares, se han identificado alrededor de 20 polipéptidos en la superficie tegumental del plerocercóide de S. mansonioides (78). Asimismo, la incubación de cisticercos de T. solium con glucosidasa y tripsina, remueve una gran cantidad de carbohidratos y proteínas de la superficie (61).

Con respecto a los mecanismos de síntesis e incorporación de los carbohidratos y proteínas a la superficie, se han realizado estudios en que adultos de *H. diminuta*, larvas y adultos de *L. tenuis* y larvas de *T. crassiceps* fueron incubados con azúcares y aminoácidos radioactivos. Autorradiografías en cortes de los parásitos, mostraron que a tiempos cortos la mayor incorporación de marca se localizaba en el Golgi de los citones tegumentales. Posteriormente, la fracción proteica asociada con el tegumento era la que presentaba una mayor incorporación de radioactividad (64, 76, 79, 80). Se ha sugerido por lo tanto, que los componentes de superficie son sintetizados en el retículo endoplásmico de los citones tegumentales; incorporados a vesículas en el aparato de Golgi y transferidos hasta el tegumento (76, 79, 80). Al igual que muchas células animales (81, 82), el glicocálix de los cés-todos es una estructura dinámica y se ha calculado que su tiempo medio de recambio "in vitro" en *H. diminuta* y *T. crassiceps*, es de alrededor de 6 horas (76, 80). Sin embargo, existe poca información sobre el tipo de moléculas que aparecen en el glicocálix y de la función que éstas desempeñan. Entre los datos de que se dispone se puede mencionar que Con A al unirse a la superficie de las microtrícas de *H. diminuta*, inhibe la absorción de una gran variedad de nutrientes (hexosas, pirimidinas y aminoácidos). Se ha sugerido que tal inhibición se debe a la unión de la Con A con glicoproteínas acarreadoras lo cual induce su inmovilización en la membrana (83). La florizina interactúa específicamente en la

superficie del tegumento con el sitio de transporte de glucosa inhibiéndolo. Este mismo efecto se ha observado en la superficie del tegumento de otros céstodos (84).

También se ha demostrado que un material de superficie, extraído por lavados de los metacéstodos de la T. taeniaeformis con Tris-HCl y EDTA, tiene la capacidad de inhibir la cascada de coagulación y de consumir complemento (85, 86). La composición de este material es muy heterogénea ya que se pueden encontrar desde polisacáridos, proteínas y glicosaminoglicanos, hasta aminoácidos como prolina, ácido glutámico y aspártico con sus amidas correspondientes. Asimismo, se demostró que los grupos sulfato de la fracción antes mencionada son indispensables y los responsables de la inhibición de la coagulación, así como del consumo del complemento. Por tinciones histoquímicas se demostró que los polisacáridos sulfatados se encuentran en mayor abundancia sobre la superficie de la pared vesicular del cisticerco que sobre el escólex. También, se ha demostrado que los polisacáridos que poseen abundantes residuos polisulfatados impiden la unión de C3 y leucocitos a la superficie del cisticerco (87). Adicionalmente se demostró que el ataque celular era dependiente del complemento, ya que si un suero es calentado a 56 °C durante 30 min el ataque celular es abatido. Además, los glicosaminoglicanos sulfatados inhiben a las enzimas lisosomales de leucocitos (88). Por ejemplo, el dextrán sulfato suprime la respuesta inmune "in vivo". También se ha reportado que dextranas polisulfatadas se

unen a proteínas regulatorias del complemento como Beta 1H, la cual normalmente funciona inhibiendo el C3 de la fase fluida y la activación del factor B (89, 90). Con base en lo anterior, se ha propuesto que la continua exposición y/o secreción de estas moléculas genera una barrera contra el ataque celular y humoral del huésped.

Productos de secreción de metacéstodos de T. taeniaeformis (glicosaminoglicanos, proteínas, hexosaminas y glicoproteínas) obtenidos "in vitro" (85, 86, 87, 91), inducen la formación de células T supresoras y una disminución significativa en la producción de interleucina-2 en esplenocitos de ratas infectadas y normales. Asimismo, los productos de secreción adicionados a cultivos de esplenocitos de rata normal disminuyen la respuesta proliferativa inducida por los mitógenos Con A y Fitohemaglutinina además de inducir una población celular supresora que abate la producción de interleukina-2, inhibiendo la proliferación y diferenciación específica de linfocitos T citotóxicos (92). Se ha demostrado que los extractos de la T. solium tienen un efecto mitogénico sobre linfocitos B de ratón (activación policlonal) (57). También se ha demostrado que estos mismos productos de secreción-excreción del metacéstodo de la T. taeniaeformis causan hiperplasia de la mucosa gástrica "in vivo" e "in vitro" estimulando el crecimiento y la producción de moco por células de estómago (91, 93). Asimismo, inhiben la producción de testosterona "in vivo" e "in vitro" en las células Leydig de rata (94).

Esta misma fracción tiene la propiedad de consumir el complemento debido posiblemente a los glicosaminoglicanos que existen en la fracción (85, 86, 87). Finalmente, se ha reportado una proteína de 19,000 dal, denominada taeniastatina (un inhibidor de proteinasas) de T. taeniaeformis, que bloquea la generación de interleucina-2 y la proliferación de timocitos murinos inducidos por interleucina-1, además de inhibir la proliferación de linfocitos murinos inducidos por mitógenos (Con A, PHA y PWM) (95, 96, 97).

Por otra parte se ha reportado un antígeno denominado B de la T. solium, el cual es secretado a la interfase huésped-parásito, tiene la propiedad de interaccionar con colágena. Recientemente se ha demostrado que este antígeno es capaz de inhibir la vía clásica del complemento posiblemente al interaccionar con la región tipo colágena de C1q. Lo anterior ha sugerido que este antígeno podría modular la respuesta inflamatoria que el huésped forma en contra del parásito (98, comunicación personal).

También recientemente se ha reportado la purificación de una enzima tetramérica compuesta por 4 subunidades con un peso molecular de 16,600, con actividad de superóxido dismutasa capaz de inactivar moléculas citotóxicas derivadas del oxígeno como aniones superóxido, radicales OH^{\cdot} , H_2O_2 y $\text{O}_2^{\cdot -}$. La actividad de esta enzima se ha detectado en el fluido que circunda la superficie del metacéstodo de T. taeniaeformis, lo que sugiere que esta enzima podría ser utilizada para inactivar las moléculas citotóxicas producidas por los leucocitos del huésped (99).

Los céstodos también han desarrollado mecanismos de inactivación de enzimas. Por ejemplo, la tripsina, la alfa y beta-quimotripsina y la lipasa son inactivadas en forma irreversible por el adulto de H. diminuta. los mecanismos de inactivación de estas enzimas aún no han sido aclarados (100,101,102).

Los parásitos ténidos no sólo interaccionan con sus huéspedes por medio de moléculas constituyentes de membrana externa, sino también por medio de moléculas del fluido vesicular que son secretadas a la interfase huésped-parásito. Estudios sobre fluidos vesiculares de metacéstodos, han demostrado el importante papel que juegan algunos de sus componentes en la relación huésped parásito: Factores presentes en el fluido vesicular del quiste hidatídico y de la T. taeniaeformis interaccionan con el complemento produciendo su consumo a través de una activación por las vías clásica y alterna, estas interacciones con el complemento resultan también en la generación de anafilotoxinas (103, 104).

2. Componentes del huésped:

No todos los componentes de la superficie tegumental de los céstodos son sintetizados por el parásito. Se ha demostrado la presencia de inmunoglobulinas del huésped sobre la superficie de los metacéstodos de T. solium (105), T. taeniaeformis (106), T. crassiceps (107), Hymenolepis diminuta, H. microstoma (108, 109), y de Mesocostoides corti (110, 111). Algunos estudios indican que

IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 están presentes en la superficie de cisticercos de T. crassiceps, aunque IgG1 e IgM se encuentran en mayor cantidad (107). Asimismo, se han encontrado todas las clases y subclases anteriores a excepción de IgA en M. corti, aunque nuevamente IgG1 e IgM eran las más abundantes (110). También se encontró IgM, IgA, IgG1 y IgG2 sobre la superficie de H. microstoma y H. diminuta (108, 109). Finalmente, en el caso de T. solium y T. taeniaeformis, sólo se investigó la presencia de IgG (105, 106). Es posible que las inmunoglobulinas tengan un papel protector (106); sin embargo, la presencia del recubrimiento de superficie por inmunoglobulinas del huésped, no es suficiente para proteger totalmente al parásito contra el ataque por anticuerpos del huésped. Una gran proporción de cisticercos de T. crassiceps obtenidos de ratones con infecciones prolongadas, sufren daño inmunológico tanto "in vivo" como "in vitro" (112, 113-115).

Las inmunoglobulinas no son los únicos componentes del huésped en la superficie de los metacéstodos. También se ha demostrado la presencia del factor C3 del complemento en la superficie de cisticercos de T. solium obtenidos de humano (116) y de cerdo (62), así como de T. taeniaeformis obtenidos de rata (67). En el caso de T. taeniaeformis, la cantidad de C3 sobre la superficie guarda una relación inversa con la abundancia de azúcares sulfatados en el glicocálix. Cabe hacer notar que las inmunoglobulinas siempre se han observado distribuidas uniformemente sobre la superficie de los metacéstodos.

3. Aspectos dinámicos:

Se sabe que los metacéstodos son capaces de absorber "in vitro" e "in vivo" una gran variedad de moléculas del huésped hacia su fluido vesicular, tales como IgG, albúmina, etc. sin que éstas sufran cambios estructurales, ni funcionales (117, 118). Algunos autores han sugerido que este fenómeno podría actuar como un mecanismo de evasión, al absorber anticuerpos específicos en contra de la superficie del parásito (63, 117, 118).

Además de las funciones absorptivas y secretoras del tegumento, recientemente se ha demostrado una capacidad pinocítica notable (119, 120) en plerocercoides de Schistocephalus solidus y Lingula intestinalis (céstodos pseudofilidos). En estos organismos, los pinosomas son transportados de la superficie hasta la membrana basal del tegumento. Posteriormente, pueden ser descargadas hacia el tejido intersticial subyacente o acarreados hasta las células subtegumentales, en donde se fusionan con lisosomas. El transporte o movimiento de los pinosomas, desde la superficie externa hasta la membrana basal del tegumento, ocurre en alrededor de 6 min. Este potencial endocítico puede tener dos funciones, la primera puede estar relacionada con requerimientos nutricionales no cubiertos por el transporte activo de solutos, mientras que la segunda función puede ser protectora. El proceso de pinocitosis acoplado al catabolismo lisosomal, bien pudiera servir para reciclar regiones de la membrana externa que han sido dañadas o bloqueadas. Tal mecanismo tiene un valor obvio para la

sobrevivencia del parásito en contacto con el sistema inmune del huésped, puesto que la superficie estaría expuesta solo durante periodos muy cortos. Incluso se ha propuesto que la superficie parasitaria podría actuar como una estructura consumidora de anticuerpos (121). Recientemente, se ha demostrado que los metacéstodos de la *T. solium* y *T. crassiceps* son capaces de internalizar y degradar inmunoglobulinas de diferentes especies de mamíferos (122). Se ha sugerido que este mecanismo de internalización y degradación de IgGs pudiera no solo cumplir funciones de evasión de respuesta inmune sino también de alimentación para el parásito.

Estudios recientes sugieren que los cambios morfológicos que ocurren en la superficie de los ténidos durante el desarrollo temprano de las oncosferas, son importantes para el establecimiento del cisticerco en los tejidos de su huésped (123, 124, 125,). Por ejemplo la oncosfera de la *T. taeniaeformis*, la cual es una masa multicelular del tamaño de un hepatocito, durante los primeros dos días, después de su llegada al hígado, incrementa su área de membrana desarrollando una gran cantidad de microvellosidades en su superficie (123). Estas microvellosidades son substituidas abruptamente por largas microtrícas al octavo día, que posteriormente disminuyen de tamaño por el día 18 (124). A su vez, el huésped desarrolla una gran actividad fibroblástica por el día 22, que resulta en la formación de una cápsula fibrosa alrededor del cisticerco y en la que persiste un abundante

infiltrado celular. Aunque varios tipos de células fagocíticas del huésped se observan en contacto con la superficie de los cisticercos desde el primer día, éstas no causan daño al parásito, por el contrario, existe una moderada destrucción de células del huésped en la vecindad del parásito. Los eventos anteriores llevan a la formación de un granuloma crónico que permite el mantenimiento de la relación huésped-cisticerco durante periodos prolongados (124).

Ambos organismos alcanzan un equilibrio dinámico que seguramente depende de eventos que ocurren en la interfase huésped-parásito. Por ejemplo, se ha sugerido que los cambios morfológicos descritos anteriormente, podrían estar relacionados con cambios en los determinantes de superficie de cada estadio (123, 124). Esta y otras preguntas solo podrán ser respondidas con base en un mejor conocimiento de los componentes que por parte del huésped y del parásito participan en el mantenimiento de la relación. En consecuencia, el objetivo del presente trabajo fue el de aportar información sobre la composición de glicoproteínas de la superficie tegumental del cisticerco de la *T. solium*.

II. MATERIALES Y METODOS

A. MATERIALES

1. Metacéstodos:

Los cisticercos o metacéstodos de la T. solium, fueron obtenidos por disección de músculo esquelético de cerdos altamente infectados provenientes de varios rastros oficiales en la ciudad de México. El fluido vesicular (FV) fue colectado por punción de la vesícula de los cisticercos y ambos materiales (fluido y tejido) se almacenaron a -70°C hasta su uso. Los cisticercos de T. crassiceps, fueron obtenidos por disección de ratones Balb/c infectados con la cepa Orf; los cisticercos de la Taenia pisiformis fueron obtenidos de conejos Nueva Zelanda y los cisticercos de Taenia saginata por disección de corazones de bovinos.

Para los experimentos de inmunocitoquímica, se disecaron cisticercos de las especies antes mencionadas, cuidando que todos ellos conservaran intacta su pared vesicular y se lavaron cuatro veces en una solución de cloruro de sodio 0.15 M, fosfatos 0.015 M, pH 7.2 (PBS), antes de usarse. Algunos cisticercos fueron usados sin lavar. Todos los cisticercos (lavados y no lavados) fueron fijados en solución de Karnovsky (2 % de paraformaldehído, 0.25 % de glutaraldehído en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.2°C) durante 1 h a 4°C (126).

2. Reactivos biológicos y químicos:

Los sueros de pacientes con neurocisticercosis comprobada, así como sueros de individuos con otras parasitosis fueron amablemente aportados por la Dra. Ana Flisser del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Los antisueros anti-IgG fluoresceinados y los acoplados a peroxidasa fueron obtenidos de Zymed Laboratories.

La albúmina sérica bovina (BSA), la agarosa tipo III, el ácido etilén diamino tetracético (EDTA), el alfa metil manósido (alfa-mm), la Concanavalina A (Con A), sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno y el sephadex G-75 fueron obtenidos de Sigma Chemical Company. Todos los reactivos para la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS), así como los reactivos para el isoelectroenfoque fueron obtenidos de Bio-Rad Laboratories. La dietilaminoetil celulosa (DE-52) de Whatman. El papel de nitrocelulosa de 0.45 um de diámetro de poro, fue obtenido de Schleicher and Schull. El Extracti-Gel D fue obtenido de Pierce Chemical Co. Los adyuvantes completo (ACF) e incompleto (AIF) de Freund se obtuvieron de Difco Laboratories.

Todos los demás reactivos usados fueron de grado analítico, así como los demás materiales fueron de la mejor calidad disponible comercialmente.

B. METODOS

1. Bioquímicos:

a. Obtención de extractos crudos (EC):

Los extractos de cisticercos de T. solium (ECI) a partir de los cuales se purificaron las glicoproteínas, se obtuvieron homogenizando los cisticercos recién descongelados utilizando una relación de 5 ml de la solución de extracción por cada gramo de tejido húmedo. La solución de extracción contenía 0.45 M de NaCl, 1.5 mM de EDTA, 0.04 % (p/v) de p-hidroximercuribenzoato (PHMB), 0.006 % (p/v) de fenil-dimetil-sulfonil fluoruro (PMSF), 0.02 M de 2-mercaptoetanol (2-merpoh) y 0.015 M de fosfatos, pH 7.4. La homogeneización se llevó a cabo utilizando un Polytron (Brinkman Instruments) a máxima velocidad durante 1-2 min a 4 C. El homogenado fue centrifugado a 100,000 X g durante 35 min a 4 C y los lípidos fueron removidos por succión a esta misma temperatura. El sobrenadante fue dializado exhaustivamente contra PBS a 4 C y centrifugado a 100,000 X g durante 35 min a 4 C, para obtener un sobrenadante claro.

Para algunos ensayos de inmunoelectrotransferencia, los cisticercos fueron homogenizados directamente en la solución de electroforesis que contenía: 1 % (p/v) de dodecil sulfato de sodio (SDS); 1 % (v/v) de 2-merpoh ; 0.075 % (p/v) de EDTA; 10 %

de glicerol y trazas de azul de bromofenol en 0.05 M de Tris-HCl, pH 6.8.

-Obtención del fluido vesicular (FV): El FV fue descongelado y centrifugado a 100,000 X g por 35 min a 4 C, posteriormente dializado contra PBS y centrifugado nuevamente de igual forma.

b. Purificación de las glicoproteínas:

El primer paso para la purificación de las glicoproteínas consistió en realizar una cromatografía de afinidad utilizando una columna de sepharosa 4B-Con A. La columna consistió de una jeringa de plástico de 20 ml conteniendo 17.5 ml de sepharosa 4B con 80 mg de Con A acoplada y equilibrada en PBS. Generalmente se aplicaban 40 ml de ECI conteniendo entre 3-4 mg/ml de proteínas, y 7 ml de FV conteniendo de 6-7 mg/ml en PBS. La cromatografía se llevó a cabo a temperatura ambiente, manteniendo una velocidad de flujo de 30 ml/h utilizando una bomba peristáltica (1200 Vario-perpex, LKB). Para eluir el material que no se unía a la columna, se pasaban 40-60 ml de PBS. El material unido con baja afinidad fue eluido aplicando 45 ml de 0.5 M de NaCl en PBS. El material unido con alta afinidad fue eluido con 0.1 M de alfa-metil manósido (alfa-mm). Se colectaron fracciones de 3 ml a las cuales se les determinó su absorbencia a 280 nm. Los picos obtenidos eran dializados contra PBS y concentrados hasta 6-7 mg/ml de proteína.

Las fracciones eluidas con 0.1 M de alfa-mm a partir de ECI y FV se denominaron Emm y Fmm respectivamente.

c. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS):

La composición polipeptídica de las fracciones obtenidas se realizó en geles de placa al 10 % de acrilamida, de acuerdo al método descrito por Payne (127). Los geles se tineron alternativamente con azul brillante de Coomassie para proteínas y siguiendo la técnica del ácido periódico Schiff (PAS) para glicoproteínas. Para la determinación de los pesos moleculares se utilizaron proteínas globulares de pesos moleculares conocidos como estándares.

d. Electroelución de las glicoproteínas:

Las glicoproteínas de la fracción Emm fueron separadas por PAGE-SDS, utilizando geles de 3 mm de espesor al 10 % de acrilamida. Se aplicaron de 10-12 mg de proteína. Al final de la electroforesis, el gel fué teñido en una solución de azul brillante de Coomassie al 1 % en agua destilada y desteñido en agua destilada hasta que las bandas de interés fueron observadas con claridad.

Las bandas seleccionadas fueron recortadas y colocadas en cámaras de electroforesis sobre un gel de acrilamida al 6 % con una altura de 5 cm. Un tercer gel al 3 % de acrilamida de 3 cm de altura fue adicionado. La electroforesis se llevaba a cabo invirtiendo la polaridad del potencial (electrodo positivo arriba) y aplicando una corriente de 20-40 mA. En esas condiciones las proteínas se concentraban en el gel al 3 % y su migración podía

seguirse visualmente a lo largo del gel por la refracción que produce la proteína. Antes de que la proteína abandonara el gel al 3 % se adicionó una capa de 2-3 ml de glicerol al 30 % en 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8. La electroforesis era continuada hasta que la proteína era eluida a la capa de glicerol. La solución de glicerol se dializó contra agua destilada, se liofilizó y se almacenó a ^o-20 C hasta su uso. (128).

e. Isoelectroenfoque:

El punto isoelectrico de las glicoproteínas de la fracción Emm se determinó en geles cilindricos (70 X 6 mm) de poliacrilamida al 5 % (p/v) que contenian 2 % de anfolitos (p/v), con un rango de pH 3-10. El gradiente de pH al final de la corrida fue determinado recortando discos de 5 mm a lo largo del gel, cada disco fue suspendido en 1 ml de agua destilada durante 2 h y el pH medido por un electrodo (129, 130). La tinción de los geles se llevó a cabo con azul de Coomassie, como ya se describió anteriormente.

f. Varios:

1) Determinación de proteínas.- La concentración de proteínas en todas las fracciones fué determinada por el método de Lowry modificado por Hartree, usando BSA como estándar (131). La concentración de proteínas conteniendo sustancias (detergentes, lípidos, etc.) que interfieren con el método de Lowry, fué determinada con el método de Peterson; usando BSA como estándar (132).

2) Determinación de carbohidratos.- La concentración de carbohidratos en todas las fracciones fué determinada por el método de Fenol-sulfúrico, usando dextrosa como estándar (133).

2. Inmunológicos:

a. Preparación de sueros hiperinmunes:

Los sueros hiperinmunes en contra de algunas glicoproteínas (Gp1, Gp2-3, Gp5 y Gp6) se obtuvieron por inmunización subcutánea de conejos Nueva Zelanda de acuerdo al siguiente protocolo. Una primera dosis de 500 ug de cada glicoproteína pura, disuelta en 1 ml de PBS y homogenizada con 1 ml de ACF al día cero, seguida de 3 dosis de 300 ug de cada glicoproteína con AIF en los días 15, 30 y 45. Los conejos fueron sangrados a blanco 7 días después de la última inmunización. Los sueros fueron obtenidos por centrifugación de la sangre coagulada a 2,000 rpm y almacenados a ^o20 C hasta su uso.

b. Purificación de anticuerpos a partir de los sueros hiperinmunes:

La fracción IgG de los sueros anti-glicoproteínas se obtuvo por precipitación de cada uno de los sueros con sulfato de amonio, seguido por una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa (134).

c. Doble inmunodifusión (DID), inmunoelectroforesis (IEF):

Las DIDs y la IEFs se llevaron a cabo en geles de agarosa al 0.8 % (p/v) en amortiguador de barbital 0.05 M, pH 8.6. La DID se

llevó a cabo de acuerdo al método de Ouchterlony (135). Para la IEF, se aplicaban 25 ul de muestra en los pozos del gel y la electroforesis se desarrollaba durante 90 min a 3 mA por placa; posteriormente, se aplicaban 150 ul de anticuerpo al canal del gel y se dejaban difundir por 48 h en una cámara húmeda. Las placas se lavaron 3 veces en una solución de 0.5 M de NaCl y 3 veces en agua destilada. Finalmente, las placas fueron teñidas con 1% de negro de amido en 10% de ácido acético y desteñidas en una solución al 10 % de ácido acético (135).

d. Ensayo inmunoenzimático (ELISA):

Los ELISA se llevaron a cabo utilizando una solución conteniendo 1 ug/ml de proteína de cada fracción antigénica (ECI, AgB y Emm) en una solución 0.01 M de carbonatos, pH 9.6. Las proteínas fueron adsorbidas a microplacas de inmulsión. Las placas fueron lavadas con PBS conteniendo 0.05 % de tween (PBS-t) e incubadas con albúmina sérica humana (HSA) en PBS-t por dos horas. Las placas fueron incubadas por dos horas con suero diluido (1:2000) ó líquido cefalorraquídeo diluido (1:10) y lavadas tres veces con PBS-t. Posteriormente, las placas fueron incubadas por dos horas con IgG de conejo anti-IgG humana, conjugada a fosfatasa alcalina en Tris-base, pH 8.8. Finalmente las placas fueron lavadas con PBS-t y reveladas con una solución conteniendo 1 mg/ml de p-nitrofenol fosfato disuelto en dietanilamina, pH 9.8. La reacción fué detenida a los treinta minutos con la adición de 50 ul de 3 M de NaOH y las placas fueron leídas a 405 nm en un espectrofotómetro (S2).

e. Inmunolectrotransferencia (EIT):

Inicialmente, se realiza una PAGE-SDS de las fracciones por transferir (ECI, Emm, etc). La cantidad de proteína aplicada en cada carril del gel fué de 100 ug de proteína para las fracciones de ECI y de Emm. Al finalizar la electroforesis, el gel se ponía en contacto con una hoja de papel de nitrocelulosa (NC) con un tamaño de poro de 0.45 um. La electrotransferencia se llevó a cabo en una cámara de transferencia (Hoeffer Instruments), aplicando 250 mA durante 2 h, ó 1 A durante 1 h a 4 °C. Una vez terminada la transferencia se recortaba uno de los carriles en el papel de nitrocelulosa y se tenía con 0.1 % (p/v) de negro amido en 45 % de metanol, 10 % de ácido acético y 45 % de agua destilada durante 5 min, para evaluar la eficiencia de la transferencia. El exceso de colorante era removido con una solución de 90 % de metanol, 2 % de ácido acético y 8 % de agua destilada.

La hoja de NC se incubó en una solución al 3 % (p/v) de BSA en PBS durante 2 h o toda la noche a 4 °C, para disminuir el pegado inespecifico al papel y se lavó en PBS durante 20 min a temperatura ambiente con agitación suave. A continuación, se recortaron los carriles de acuerdo al esquema de ensayos por realizar y las tiras recortadas se incubaron con un primer anticuerpo (anti-Gp1, anti-Gp2-3, anti-Gp5 y anti-Gp6) diluido 1:500-1:1000 en una solución de PBS-BSA, durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación suave. Las tiras se lavaron 2 veces con PBS-BSA con 0.3 % de Tween 20 y una sola vez con PBS. Después

de este lavado, las tiras de papel se incubaron con un segundo anticuerpo caprino anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa, diluido 1:1000-1:2000 en PBS-BSA, por 1 hora a temperatura ambiente. Las tiras de papel se lavaron 2 veces con PBS-Tween 20 y una sola vez con PBS. Finalmente se revelaron en una solución que contenía 100 mg de 3,3 diaminobencidina ó 60 mg de 4-cloro naftol, 100 ul de H_2O_2 al 3 % en 100 ml de PBS durante un tiempo de 3-10 min a temperatura ambiente. La reacción enzimática se detuvo lavando las tiras repetidas veces con agua destilada (136).

f. Inmunofluorescencia indirecta (IFI):

Los estudios para la localización histológica de las glicoproteínas se realizaron incubando cortes de cisticercos en parafina, con anticuerpos de la fracción IgG anti-glicoproteínas, utilizando una concentración de 0.1-0.5 mg/ml durante 1 h a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Posteriormente fueron lavados 4 veces con PBS en agitación continua durante 1 h. Un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo fluoresceinado comercial diluido 1:20 en PBS en idénticas condiciones al primer anticuerpo fue adicionado. Los cortes se montaron con una gota de glicerol:PBS (9:1), y se observaron y fotografiaron en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss). Para los controles se utilizó una fracción de IgG de conejos normales (no inmunes) (137, 138).

g. Inmunoperoxidasa indirecta (IPI):

Para la localización ultraestructural de las glicoproteínas se utilizaron fragmentos de pared vesicular de cisticercos previamente fijados en solución de Karnovsky (ver II.A.1.) e incubados 1 h con anticuerpos anti-glicoproteínas a una concentración de 0.1-0.5 mg/ml en PBS. Posteriormente, los fragmentos fueron lavados 30 min con PBS, cambiando la solución cada 15 min y manteniendo una agitación suave. Se incubaron por 1 h con un segundo anticuerpo (IgG de chivo anti-IgG de conejo) acoplado a peroxidasa y diluido 1:20 en PBS. Los fragmentos fueron lavados 30 min con PBS e incubados durante 10 min en una solución conteniendo 25 mg de 3, 3 diaminobencidina y 50 μ l de H_2O_2 al 3 % en 50 ml de 0.5 M de Tris-HCl, pH 6.8; con agitación suave y en completa oscuridad.

Finalmente, los fragmentos fueron post-fijados en tetróxido de osmio, en amortiguador 0.1 M de cacodilato de sodio (138) y procesados para microscopía electrónica. Los cortes finos fueron observados y fotografiados en un microscopio electrónico Jeol, modelo 100-B.

III. RESULTADOS

A. OBTENCION DE LAS FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN GLICOPROTEINAS.

La figura 9 muestra los patrones de PAGE-SDS de las fracciones ECI, y FV. En los geles teñidos con azul brillante de Coomassie se observa que las dos fracciones están formadas por más de 30 proteínas diferentes con pesos moleculares de entre 10,000 y 200,000. En contraste, las fracciones ECI, y FV solo mostraron dos zonas de tinción moderada con PAS en la parte superior y media del gel respectivamente (Fig. 11). Las glicoproteínas fueron visualizadas por tinción de los residuos carbohidrato con ácido periódico de Schiff, así como por una lectinoelectroforesis (139) en la que se enfrentó Con A con las anteriores fracciones (no mostrada).

En la figura 10, se ilustra un perfil representativo de la elución de las fracciones ECI, y FV a través de columnas de sepharosa 4B-Con A. Las columnas se cargaron por separado con cada una de estas fracciones; el material unido con baja afinidad se eluyó con 0.5 M de NaCl. Este material en general mostró patrones difusos de bandeó en PAGE-SDS haciendo difícil la identificación de las proteínas individuales. El material unido con alta afinidad se eluyó mediante la aplicación de 0.1 M de alfa-mm.

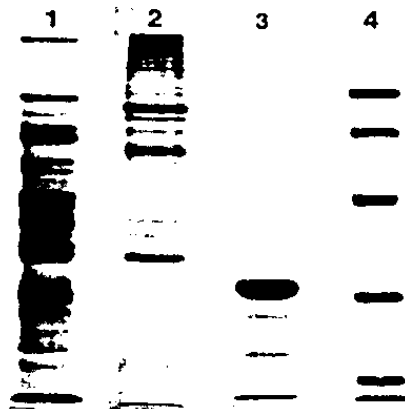


Figura 9. Gel de poliacrilamida con SDS de los extractos de ECI (carril 1), FV (carril 2), Con A 27,000 dal (carril 3) y estándares de proteínas de pesos moleculares conocidos: 1) Fosforilasa B (92,500), 2) BSA (66,200), 3) Ovoalbúmina (45,000), 4) Anhidrasa carbónica (31,000), 5) Inhibidor de tripsina de soya (21,500), 6) Lisozima (14,400). El gel fue teñido con azul brillante de Coomassie.

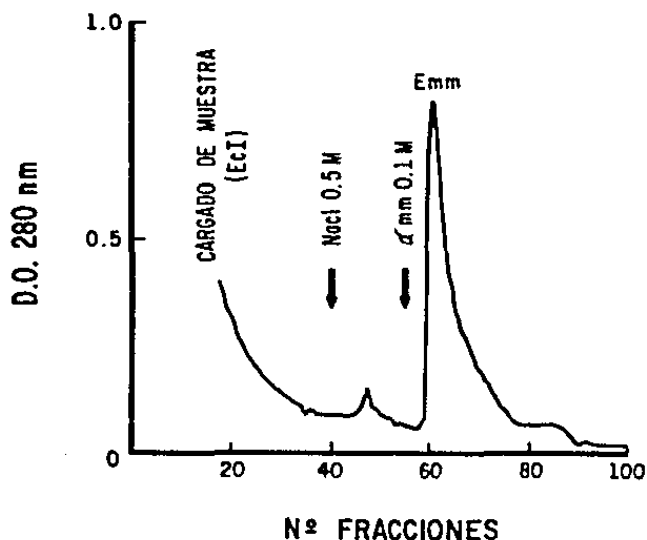


Figura 10. Perfil de elución característico de las fracciones de ECI y Fv pasados a través de la columna de sefarosa 4B- Con A. Las columnas fueron eluidas con NaCl 0.45 M (para eluir el material unido con baja afinidad) seguida de alfa-mm 0.1 M (para eluir el material unido con alta afinidad), ambos en PBS, pH 7.2. Estos últimos picos fueron denominados como Emm y Fmm.

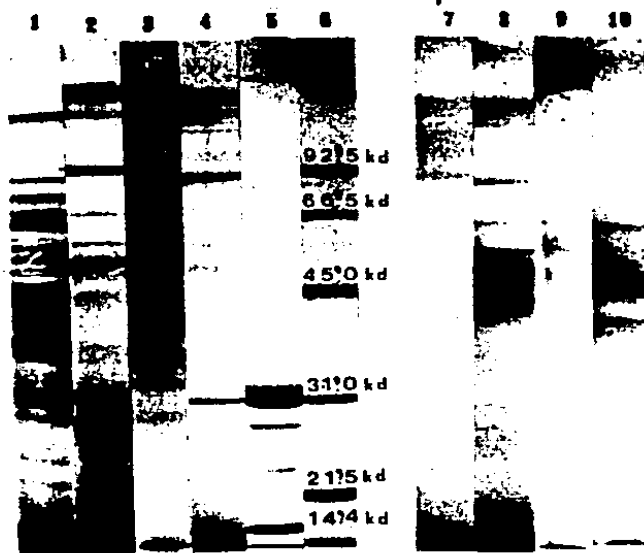


Figura 11. Tinción de Coomassie (carriles 1-6) y tinción de PAS (carriles 7-10) de: ECI (carriles 1 y 7), Emm (carriles 2 y 8), FV (carriles 3 y 9), Fmm (carriles 4 y 10), Con A (carril 5) y estándares globulares de pesos moleculares conocidos (carril 6) (ver leyenda de la figura 9).

obteniéndose en los dos casos, un pico asimétrico. La fracción obtenida en este pico se dializó para eliminar el exceso de alfa-mm y se concentró hasta 6-7 mg/ml de proteína. Las fracciones obtenidas de esta manera a partir de ECI y FV, fueron denominadas como Emm, y Fmm respectivamente. La figura 11 muestra los patrones en PAGE-SDS de las fracciones antes mencionadas teñidos con azul brillante de Coomassie y PAS.

En la tabla II, se presenta un resumen de los resultados de las fracciones de Emm, y Fmm en PAGE-SDS, estas fracciones contenían respectivamente 19 y 13 proteínas visibles mediante tinción con azul brillante de Coomassie, con pesos moleculares entre 10,000 a 200,000. A su vez la tinción para glicoproteínas usando PAS, mostró la presencia de 8 y 3 bandas respectivamente en cada fracción; con pesos moleculares entre 50,000 a 200,000. En la figura 11 también se observan dos proteínas abundantes con pesos moleculares de 27,000 y 18,000, que se tiñen con azul brillante de Coomassie pero no con PAS. Algunos resultados provenientes de ensayos utilizando proteínas radiocodadas han demostrado que ambas bandas corresponden a Con A que se desprende de la columna (139).

En las fracciones de Emm teñidas con PAS, se observa una banda difusa de alto peso molecular formada posiblemente por un conjunto de glicoproteínas con pesos moleculares entre 150,000 y 200,000. Otras bandas bien definidas por tinción con PAS, mostraron pesos moleculares de 103,000, 96,000, 68,000, 55,000, 45,000

y 21,000. En cambio, la fracción de Fmm solo presentó tres glicoproteínas con pesos moleculares de 68,000, 55,000 y 38,000.

Los puntos isoelectríficos de todas las proteínas en la fracción Emm, determinados por isoelectroenfoque, resultaron ser todos aniónicos, estando incluidos en un rango desde 6.45 hasta 3.0 (Fig. 12).

Tabla II. Número de bandas teñidas con azul de Coomassie y PAS de las fracciones ECI, FV, Emm y Fmm en PAGE-SDS.

Banda	tinción de Coomassie		tinción de Schiff		Peso Molecular
	ECI	FV	Emm	Fmm	
1	+	+			195,000
2	+	+	+		182,000
3	+	+			170,000
4	+	+			154,000
5	+	+			125,000
6	+	+			110,000
7	+	+	+		103,000
8	+	+	+		96,000
9	+	+			81,000
10	+				75,000
11	+		+	+	68,000
12	+	+	+		60,000
13	+	+	+	+	55,000
14	+	+			50,000
15	+	+	+		45,000
16	+	+		+	35,000
17	+	+			(*) 27,000
18	+	+			25,000
19	+	+			21,000
20	+				(*) 18,000
21	+				14,000
22	+	+	+	+	frente del gel.

(*) Bandas que corresponde a la Con A.

B. ANALISIS DE LOS ANTIGENOS DE LAS FRACCIONES Emm Y Fmm.

La determinación de antígenos reconocidos por sueros de pacientes con neurocisticercosis en las fracciones Emm y Fmm, se analizó por IEF usando siete sueros de pacientes con neurocisticercosis confirmada quirúrgicamente. Se encontró que los sueros reconocieron ocho antígenos diferentes en ambas fracciones Emm, Fmm (Fig. 13). Sin embargo, el número promedio de antígenos reconocidos por cada suero en la fracción Fmm fue menor que en la fracción Emm (Tabla III). Debido a problemas de variabilidad en la posición en que aparecían las bandas de precipitación, no fue posible clasificar los antígenos reconocidos de acuerdo al esquema propuesto por Flisser y col (56); por lo tanto, las comparaciones entre los sueros se llevaron a cabo tomando en cuenta solamente el número de antígenos reconocidos en cada fracción. Como se observa en la tabla III, el número promedio de antígenos (arcos de precipitación) reconocidos por los siete sueros en Emm fue de 5.5. Este valor representa casi el doble del obtenido para ECI el cual fue de 3.1 bandas por suero y en el caso de Fmm fue de 4.5. Lo anterior indicó que había una correlación entre el aumento en el contenido de glicoproteínas y el aumento en la antigenicidad de las fracciones eluidas con alfa-mm. La figura 13 muestra dos imágenes típicas de los patrones de IEF obtenidos.

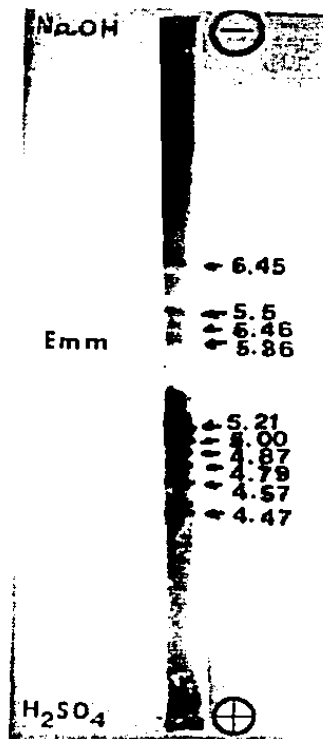


Figura 12. Isoelectroenfoque de la fracción Emm, mostrando los diferentes puntos isoelectricos de sus componentes (PI= 3-6.5). El isoelectroenfoque se realizo con un gradiente de pH de 3-10.

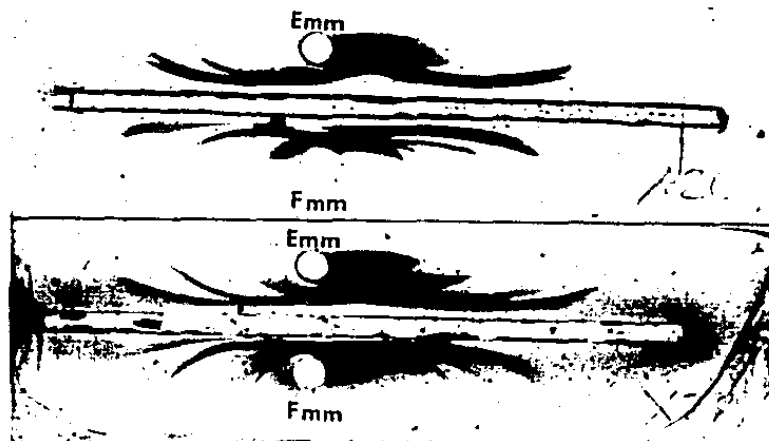


Figura 13. Inmunolectroforesis de 2 sueros de pacientes neurocisticercosos en contra de las fracciones Emm (pozos superiores) y Fmm (pozos inferiores).

Tabla III. Número de antígenos reconocidos por sueros de pacientes neurocisticercosos cuando se enfrentan en IEF con las fracciones Emm, Fmm y ECI.

Muestra	sueros							Bandas/suero
	1771	1158	1411	2221	2066	2955	2947	
Emm	4	9	8	2	3	7	5	5.5
Fmm	5	7	7	2	5	3	3	4.5
ECI (*)	7	4	3	4	2	1	1	3.1

(*) ECI fué utilizado a una concentración de 15 mg/ml mientras que la concentración de Emm y Fmm fué de 6-7 mg/ml. Los datos que aparecen en este renglón fueron amablemente aportados por A. Plancarte.

C. PURIFICACION DE LAS GLICOPROTEINAS A PARTIR DE LA FRACCION

Emm.

Los anteriores resultados motivaron la decisión de intentar la purificación de algunas glicoproteínas. Para esto se eligió la fracción Emm y no Fmm, debido a que en la fracción Emm era más probable encontrar proteínas de superficie. Para purificar las glicoproteínas a partir de Emm, inicialmente se llevaron a cabo varios intentos que resultaron infructuosos, la razón principal fue la presencia de agregados proteicos en la fracción. En consecuencia se utilizó un método que por sus características rompiera las interacciones que mantenían a los agregados. El método elegido fue la electroelución de las bandas glicoproteicas a partir de

geles preparativos PAGE-SDS. lo que permitió la purificación de las glicoproteínas con rendimientos del orden de mg (128).

Puesto que el método de electroelución es laborioso y prolongado se optó por purificar seis de las ocho glicoproteínas descritas anteriormente.

Las proteínas seleccionadas fueron aquellas que presentaron mejores propiedades tintoriales, lo cual está en función de su abundancia relativa en la fracción Emm. Las glicoproteínas de 96,000 y 103,000 dal fueron eluidas conjuntamente por la dificultad para recortar del gel las bandas en forma individual. La designación de las glicoproteínas que se electroeluyeron fue como sigue: Gp1, PM=180,000; Gp2-3, PM=103,000 y 96,000; Gp4, PM=68,000; Gp5, PM=55,000 y Gp6, PM=45,000. Después de la electroelución, las proteínas se dializaron exhaustivamente con PBS o bien fueron tratadas con Extracti-Gel D (Perlas de amberlita) para reducir al mínimo la cantidad de SDS asociado, se liofilizaron y almacenaron a -75°C . Muestras de las glicoproteínas liofilizadas fueron sometidas a PAGE-SDS. Los resultados se presentan en la figura 14, en la que se observa que el patrón de bandeado de cada glicoproteína corresponde precisamente a los patrones observados en la fracción original de Emm. En ningún caso las proteínas electroeluidas de geles preparativos que correspondían a un peso molecular, dieron lugar a bandas de peso molecular distinto, indicando que el procedimiento de purificación no produjo modificación en el peso molecular de las proteínas.

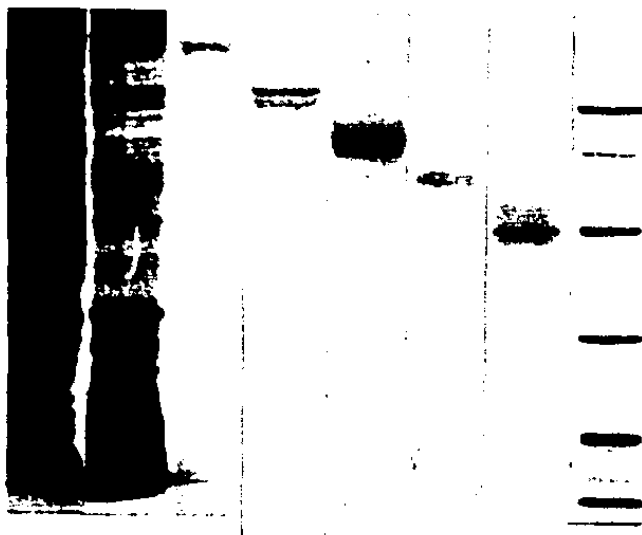


Figura 14. Patrones electroforéticos de las glicoproteínas purificadas por electroelución a partir de la fracción Emm teñidas con azul brillante de Coomassie (parte superior) y con tinción de PAS (parte inferior). A) Parte superior: Carriles 1) ECI, 2) Fracción Emm, 3) Gp1, 4) Gp2-3, 5) Gp4, 6) Gp5, 7) Gp6, 8) Estándares globulares de bajo peso molecular (ver leyenda de la figura 7). B) Parte inferior: Carriles 1) ECI, 2) Fracción Emm, 3) Gp1, 4) Gp2-3, 5) Gp4, 6) Gp5, 7) Gp6.



D. CARACTERIZACION INMUNOLOGICA DE LAS GLICOPROTEINAS PURIFICADAS.

Las glicoproteinas purificadas fueron utilizadas en la producción de sueros hiperinmunes en conejos. La fracción de IgG de cada uno de los antisueros (anti-Gp1, anti-Gp2-3, anti-Gp5 y anti-Gp6), se enfrentó contra un extracto crudo de cisticercos (ECI) por el método de IEF. Los patrones de inmunoprecipitación en las IEFs se ilustran en la figura 15. Anti-Gp1, anti-Gp2-3 y anti-Gp6 formaron arcos de precipitación catiónicas diferentes entre si por su forma, longitud y migración relativa; también la fracción anti-Gp2-3 formo un arco de precipitación aniónico. En cambio la fracción de IgG anti-Gp5 formó un arco de precipitación isoeléctrico.

La posibilidad de que las glicoproteinas fueran precursores o fragmentos del antígeno B, único antígeno bien caracterizado de la T. solium, no se podía excluir. Para descartar esta posibilidad se realizaron IEFs en las que se enfrentó una muestra de antígeno B puro en contra de cada uno de los anticuerpos anti-glicoproteinas (Fig. 16 A). Asimismo, por DID se probó un suero hiperinmune anti-B en contra de la fracción Emm y ECI como control. Como se muestra en la figura 16 B, los diferentes sueros hiperinmunes anti-glicoproteinas, no formaron bandas de precipi-

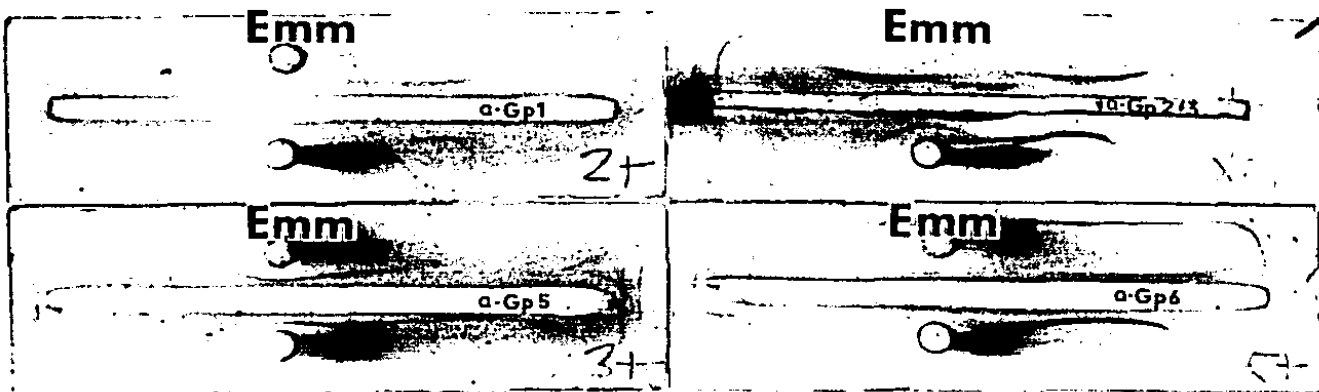


Figura 15. Inmunolectroforesis de la fracción de Emm enfrentada con los anticuerpos: 1) anti-Gp1, 2) anti-Gp2-3, 3) anti-Gp5, y 4) anti-Gp6.

(A)



Figura 16. A) Doble inmunodifusión de 1) ECI, 2) antígeno B y 3) Emm frente a un suero hiperinmune anti-B de conejo en el pozo central

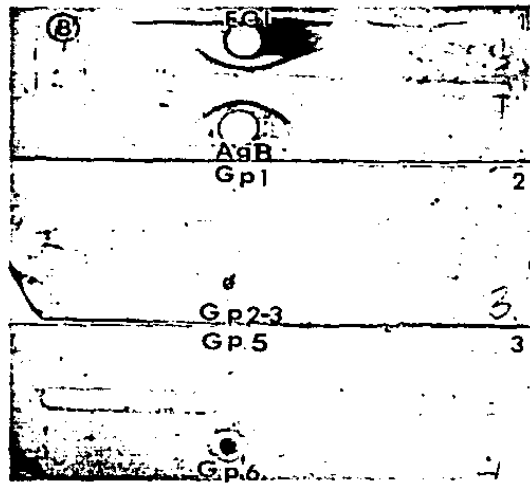


Figura 16. B) Inmunolectroforesis de: Laminilla 1; ECI (pozo superior) y antígeno B (pozo inferior), laminilla 2; Gp1 (pozo superior) y Gp2-3 (pozo inferior), laminilla 3; Gp5 (pozo superior) y Gp6 (pozo inferior). Todas las fracciones fueron enfrentadas con un suero hiperinmune anti-B (canal central).

tación frente al antígeno B puro. En cambio el suero hiperinmune anti-B, formó la típica banda isoeléctrica de precipitación frente a los pozos llenados con el antígeno B puro y con la fracción ECI, indicando que no existe ninguna relación inmunológica entre las glicoproteínas y el antígeno B.

E. UTILIDAD DE LA FRACCION Emm EN EL INMUNODIAGNOSTICO DE LA CISTICERCOSIS HUMANA POR LA TECNICA DE ELISA.

Se realizaron ELISAS utilizando ECI, Emm y antígeno B como antígenos para la detección de anticuerpos en sueros y líquidos cefalorraquídeos (LCR) de pacientes neurocisticercosos. Las sensibilidades obtenidas para muestras de sueros fueron de 85 % para ECI y de 80 % para AgB y la fracción de glicoproteínas. En cambio, utilizando muestras de LCR, la sensibilidad fue de 90 % para las tres fracciones. La especificidad fue de 90 % para ECI y de 98 % para AgB y la fracción Emm, en las muestras de suero y LCR, respectivamente. En este estudio se utilizó la técnica de ELISA en sueros y líquidos cefalorraquídeos de pacientes neurocisticercosos y de sujetos sanos como testigos negativos.

Para determinar si la fracción de Emm pudiera tener utilidad como fuente de antígenos en estudios seroepidemiológicos, se realizaron ensayos de ELISA utilizando muestras de suero de individuos con otras parasitosis: 25 muestras de suero fueron

probadas con el ECI, Emm y con AgB. En todos los casos ocurrieron reacciones cruzadas. Sin embargo, cuando se utilizaron cualquiera de las fracciones semipurificadas tales como AgB y Emm, las reacciones cruzadas se redujeron en un 57 % y 71.4 % respectivamente. Cabe hacer notar que la mayoría de las reacciones cruzadas ocurrieron cuando se ensayaron algunos sueros de pacientes con enfermedad hidatídica (Tabla IV). Una ventaja que presentó el uso de la fracción de glicoproteínas con respecto a las otras fracciones utilizadas en el ELISA, fue la de disminuir el fondo de la reacción, pudiéndose detectar claramente la diferencia entre un suero positivo y un suero testigo negativo.

Tabla IV. Reacción cruzada de sueros de pacientes con diferentes parasitosis y antígenos obtenidos del cisticerco de T. solium, mediante ELISA.

Número muestra	Parasitosis	Positivos ECI	Positivos AgB	Positivos Emm
5	Hidatidosis	4	3	2
5	Stroingiloidosis	5	0	0
5	Triquinelosis	4	0	0
5	Filariasis	1	0	0
5	Larva migrans	0	0	0

F. LOCALIZACION DE LAS GLICOPROTEINAS EN EL TEJIDO DEL CISTICERCO.

Se realizaron ensayos de inmunoperoxidasa indirecta en fragmentos de pared vesicular de cisticercos, para determinar la localización de las glicoproteínas. Los resultados mostraron que todas ellas se encuentran en la superficie tegumental (Fig. 17). La intensidad y tamaño del producto enzimático puede estar relacionada con la concentración y/o la exposición de cada una de las glicoproteínas en la membrana. Aceptando lo anterior, la abundancia relativa de las glicoproteínas en la superficie es la siguiente: Gp1 > Gp5 > Gp6 > Gp2-3. Las imágenes presentadas fueron obtenidas de cisticercos recién extirpados y lavados con PBS, pH 7.4 antes de ser fijados en glutaraldehído, lo que sugiere que las glicoproteínas se encuentran firmemente unidas a la superficie tegumental del parásito.

Estudios similares de localización se llevaron a cabo por inmunofluorescencia indirecta con la fracción de IgG anti-Gp1 y anti-Gp6. Se observó que la glicoproteína Gp1 se encuentra presente en la superficie tegumental, así como en células subtegumentales y depósitos de glucógeno (Fig. 18A). Lo anterior sugiere que las células subtegumentales sean las encargadas de sintetizar

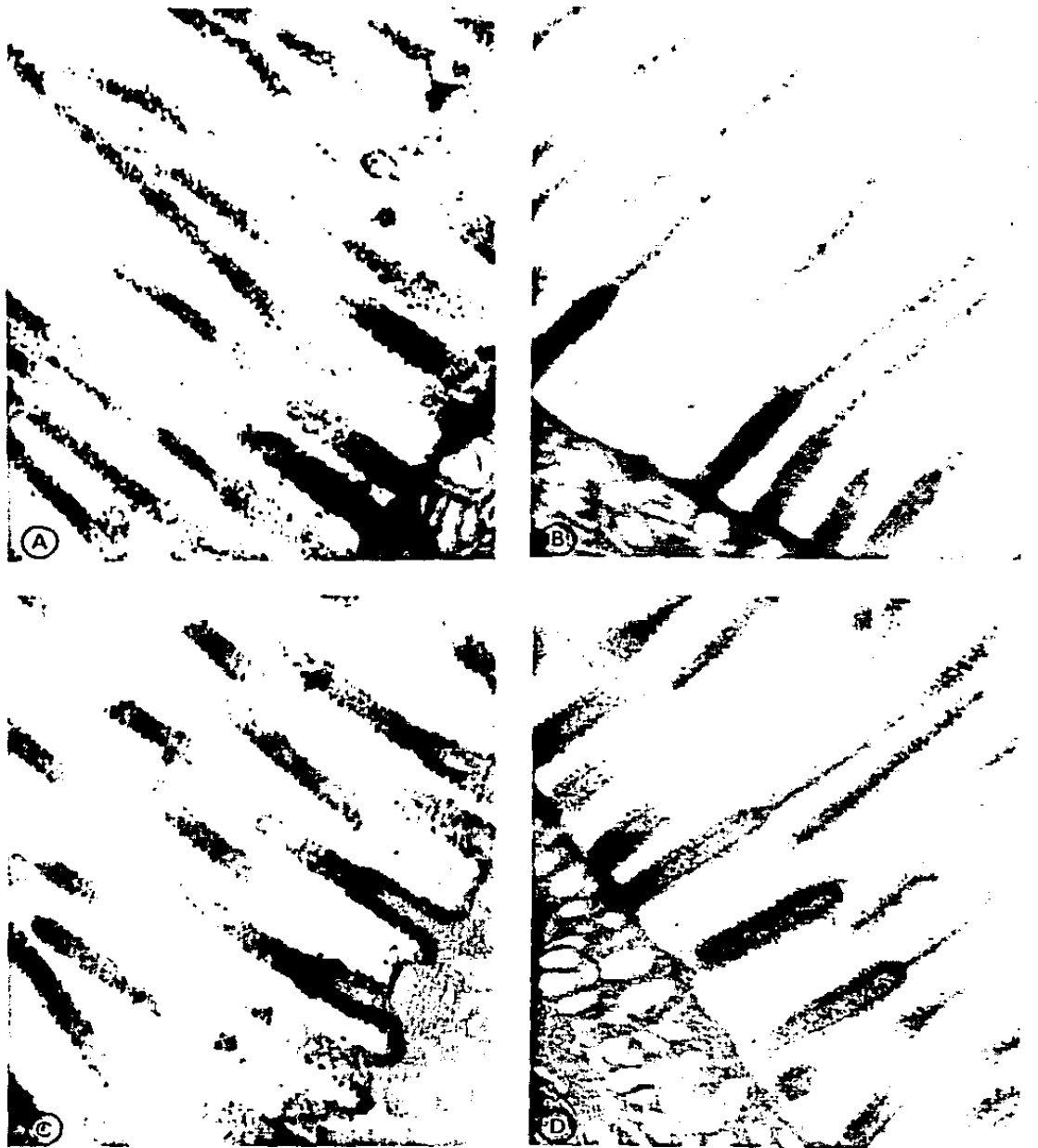


Figura 17. Micrografías electrónicas de cortes de paredes vesiculares del metacéstodo de *T. axei* tratadas con la técnica de inmunoperoxidasa indirecta. Los fragmentos de pared vesicular fueron incubados con anticuerpos A) anti-Gp1, B) anti-Gp2-3, C) anti-Gp5 y D) anti-Gp6. Los fragmentos incubados con inmunoglobulinas normales mostraron resultados análogos a los presentados en la fig. 20 D.

a la Gp1. La Gp6 solo se encontró en la superficie tegumental (Fig. 18C).

Ensayos de inmunofluorescencia indirecta como los antes mencionados, pero utilizando cortes del estadio adulto de la T. solium; mostraron que la Gp1 también se encuentra en la superficie tegumental y en células subtegumentales (Fig. 18B).

En cambio, la Gp6 se encuentra solamente en la superficie tegumental del gusano adulto (Fig. 18D). Los cortes control de pared vesicular y de proglótidos en los cuales se usó una fracción de IgG de conejo normal, presentaron una fluorescencia significativamente menor (Fig. 18E y F).

G. LOCALIZACION DE LAS GLICOPROTEINAS EN METACESTODOS DE OTRAS ESPECIES.

Estos ensayos se realizaron utilizando también las fracciones IgG de los sueros anti-glicoproteínas por la técnica de inmunoperoxidasa indirecta. Como se observa en la figura 19, la glicoproteína Gp1 se encuentra presente en la superficie tegumental de los cisticercos de T. saginata, T. crassiceps y T. pisiformis; manteniendo un patrón similar al obtenido en el cisticerco de la T. solium. En cambio la glicoproteína Gp6 solamente se encontró en la superficie del cisticerco de T. pisiformis, con una peculiar localización en la punta de las

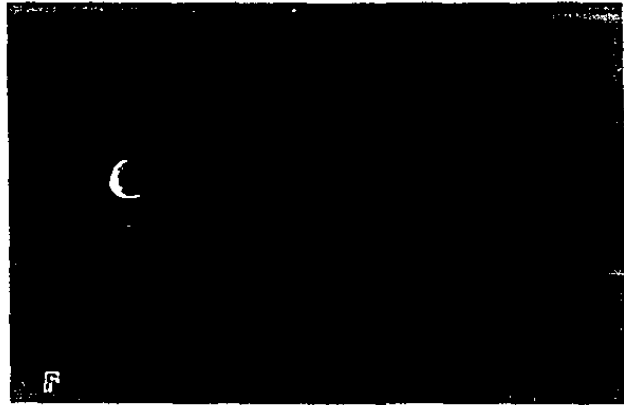
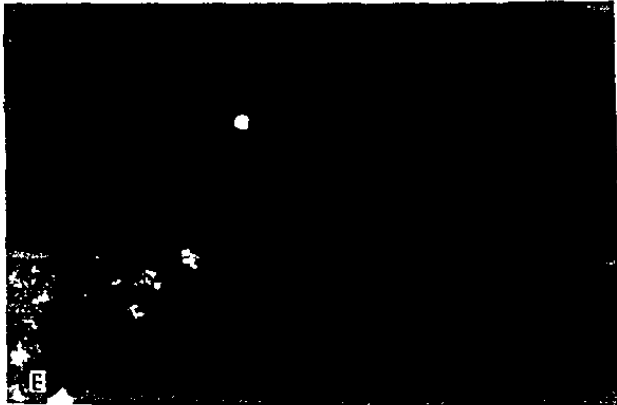
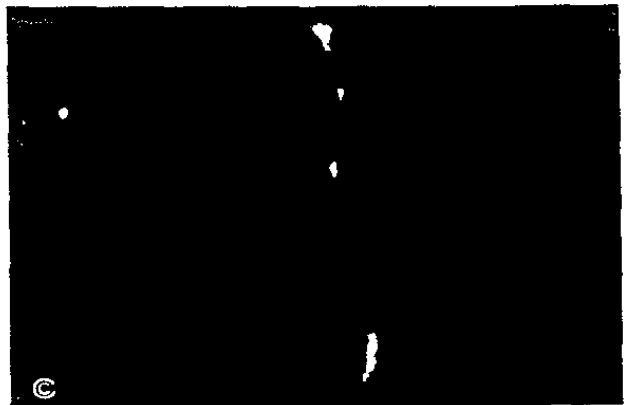
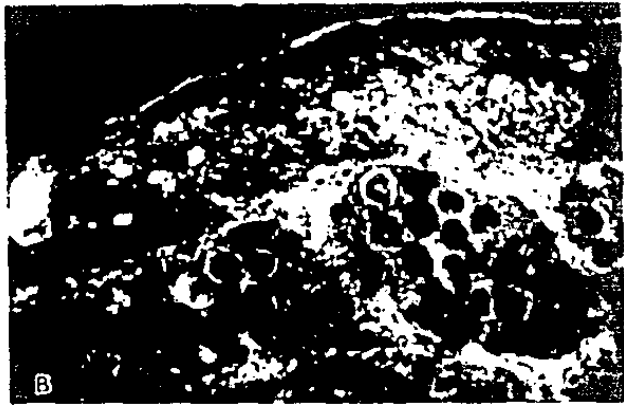
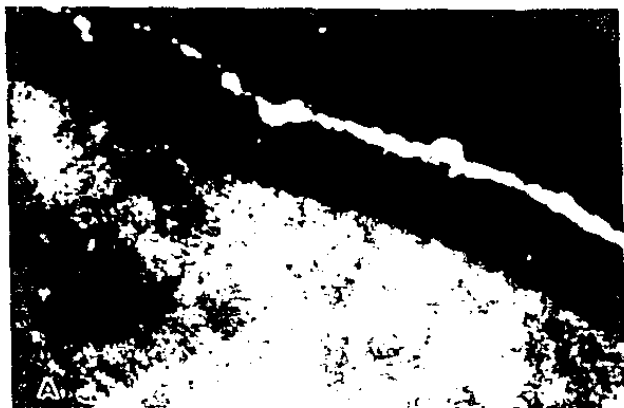


Figure 1. Immunofluorescence micrographs of the same area of the same specimen. The bright structure in panel A is the same structure as in panel B. The bright structure in panel C is the same structure as in panel D. The bright structure in panel E is the same structure as in panel F. The bright structure in panel F is the same structure as in panel D.

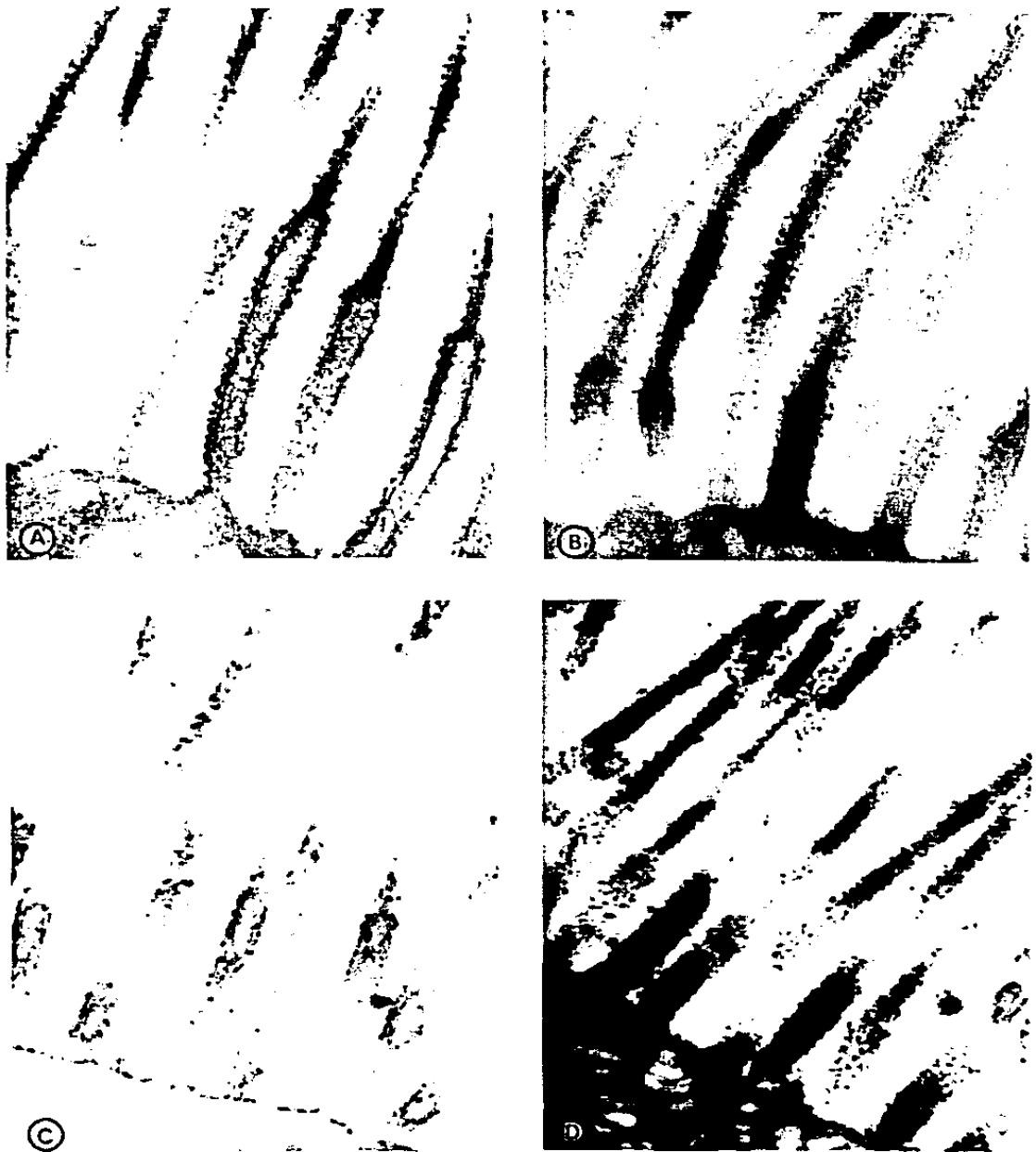


Figura 19. Micrografías electrónicas de transmisión de las superficies tegumentales de diferentes especies de metacéstodos. Las superficies tegumentales fueron incubadas con la fracción IgG anti-Gpi: A) *T. pisiformis*, B) *T. saginata*, C) *T. brassicensis*, D) *T. solium*. Las inmunoglobulinas normales usadas como control mostraron resultados análogos a los presentados en la figura 20 D.

microtricas. Ni Gp5, ni Gp2-3 se encontraron presentes en los cisticercos antes mencionados. Al igual que en el caso de los experimentos con T. solium, los cisticercos fueron lavados en PBS antes de ser fijados en glutaraldehído.

H. IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA GLICOPROTEINA GP5.

Como se mencionó anteriormente (ver I.G.2. y 3.), la superficie de diferentes especies de cisticercos tienen la propiedad de adsorber y absorber proteínas del huésped, en especial IgG y albúmina.

Se realizaron ensayos de inmunoperoxidasa indirecta con fragmentos de pared vesicular de cisticercos de T. solium, T. pisiformis, T. crassiceps, los cuales fueron exhaustivamente lavados en PBS antes de ser fijados en solución de Karnovsky con el objeto de desprender proteínas unidas debilmente a la superficie. Los fragmentos de pared fueron incubados con anticuerpos anti-IgG según la especie (ratón, conejo o cerdo) y usando una fracción de IgG de ratón, conejo o cerdo normal como controles. En la figura 20, se observa que en todas las especies de cisticercos se detectó la IgG del huésped respectivo, firmemente adsorbida a la membrana tegumental.

Para determinar si alguna de las glicoproteínas purificadas era una proteína sérica del huésped, se realizaron ensayos de IET

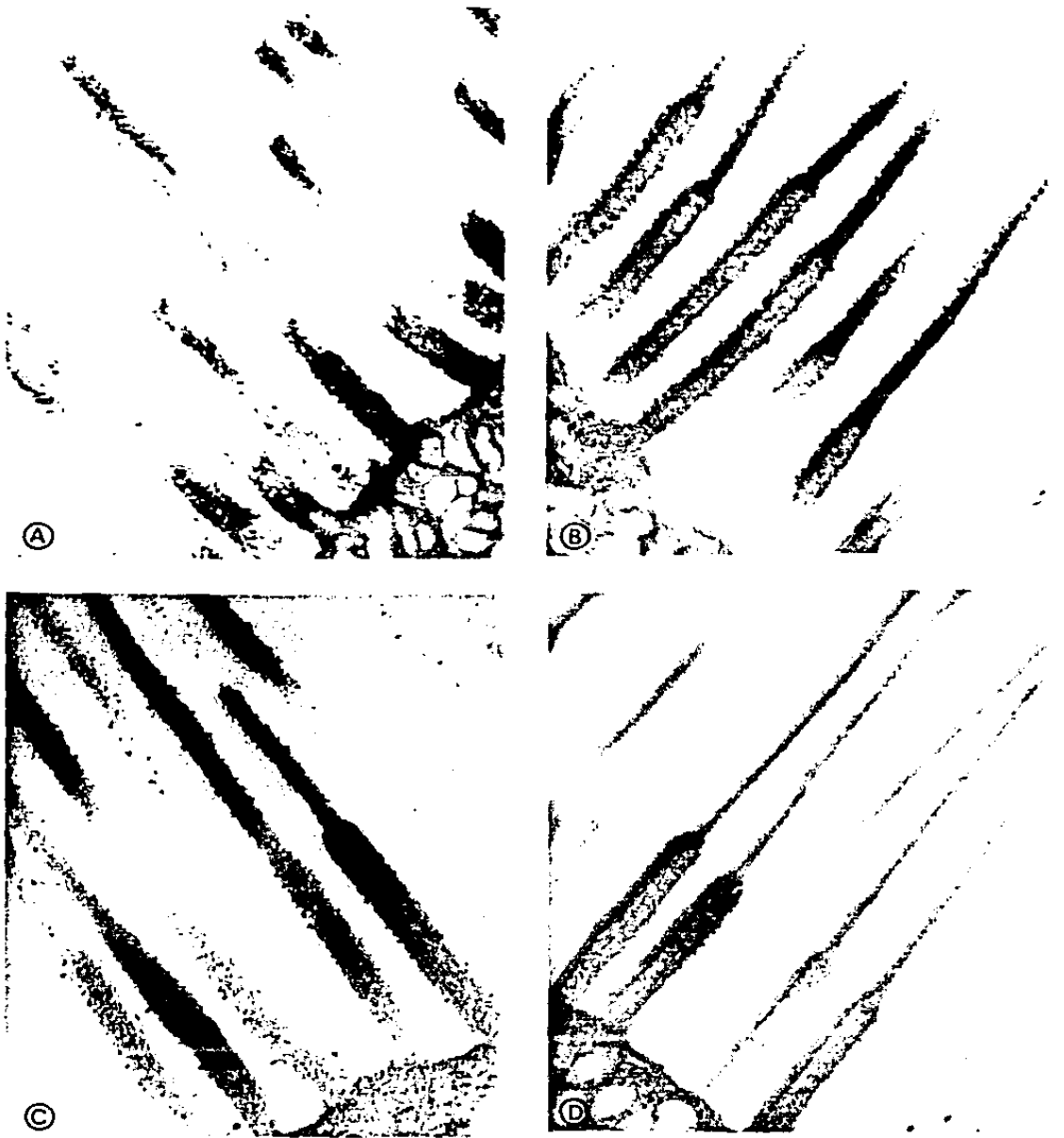


Figura 10. Micrografías electrónicas de IgGs del huésped adsorbidas a la superficie tegumental de diferentes especies de metacástor, utilizando la técnica de IFI. Las superficies tegumentales fueron incubadas con A) anti-IgG porcino (*T. galium*), B) anti-IgG conejo (*T. pisiformis*) y C) anti-IgG ratón (*T. brassicae*), D) inmunoglobulinas normales de cerdo como control.

en los que un suero normal de cerdo fue sometido a PAGE-SDS y las proteínas separadas en el gel fueron transferidas a papel de nitrocelulosa. Las proteínas transferidas fueron posteriormente incubadas con la fracción IgG de los diferentes sueros anti-glicoproteínas (anti-Gp1, anti-Gp2-3, anti-Gp5 y anti-Gp6) (Fig. 21). Los resultados mostraron que los anticuerpos anti-Gp5, reconocían un componente sérico del cerdo. La migración relativa y la forma de la banda reconocida por anti-Gp5 coincide con la banda de la cadena pesada de IgG porcina reconocida por los anticuerpos anti-IgG porcina usados como control. Los restantes anticuerpos no reconocieron ninguna proteína sérica del cerdo.

I. CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS ANTI-GLICOPROTEINAS POR EIT.

Además de los ensayos descritos en el capítulo III.D., se caracterizó la especificidad de los anticuerpos anti-glicoproteínas, por el método de EIT. Para ello, se realizaron ensayos como los descritos anteriormente; un extracto crudo de cisticercos (ECI) se enfrentó con cada uno de los anticuerpos anti-glicoproteínas (Fig. 22). Los anticuerpos reconocieron a una gran cantidad de proteínas del ECI, algunas de las cuales eran reconocidas por uno o más antisueros; con la excepción para Gp5. En este caso la proteína reconocida mostró una migración relativa coincidente con la de las cadenas pesadas de IgG porcina.

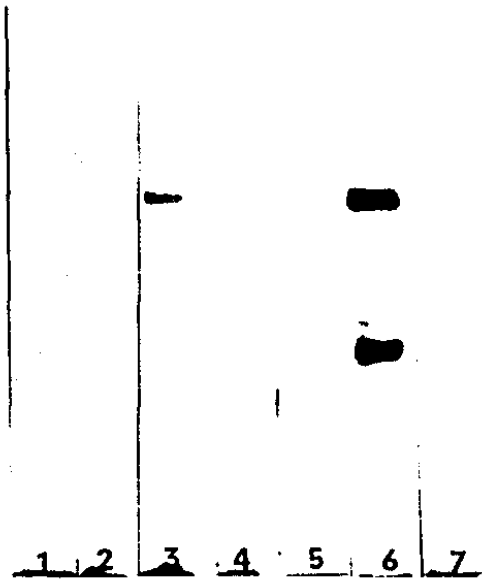


Figura 21. Inmunolectrotransferencia de un suero normal de cerdo, enfrentado con las fracciones de IgG de los sueros anti-glicoproteínas. Carriles: 1) anti-Gp1, 2) anti-Gp2-3, 3) anti-Gp5, 4) anti-Gp6, 5) fracción IgG del suero de un conejo normal, 6) Fracción IgG de un suero anti-IgG porcina y 7) segundo anticuerpo IgG de chivo anti-conejo acoplado a peroxidasa (control). * Como se menciona en el pie de la figura 22.

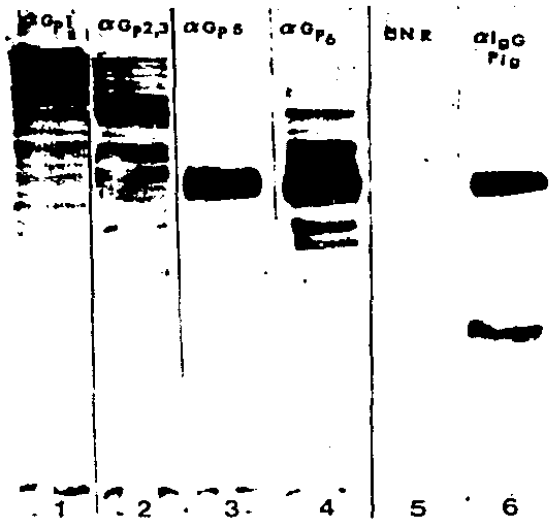


Figura 22. Inmunolectrotransferencia de un extracto crudo de cisticercos, enfrentado con las fracciones IgG de los sueros anti-glicoproteínas. Carriles: 1) anti-Gp1, 2) anti-Gp2-3, 3) anti-Gp5, 4) anti-Gp6, 5) fracción IgG de un suero anti-IgG porcina y 6) fracción de IgG del suero de un conejo normal. * Todos los carriles se incubaron con un segundo anticuerpo (fracción de IgG de chivo, anti-IgG de conejo, acoplada a peroxidasa).

DISCUSION

Los resultados de los PAGE-SDS de las fracciones iniciales (ECI y FV) mostraron que se trataba de mezclas bastante complejas de proteínas. Entre ellas, las glicoproteínas representaban un porcentaje relativamente pequeño, a juzgar por sus patrones de tinción obtenidos con PAS (Fig. 11). En contraste, las fracciones obtenidas de la cromatografía a través de la columna de sefarosa 4B-Con A, resultaron ser mucho más simples, además de contener una mayor proporción de glicoproteínas. Por ejemplo, la fracción Emm contenía 19 proteínas que se teñían con azul de Coomassie, de las cuales 8 también se teñían con PAS (Tabla II). A su vez, la fracción Fmm contenía 15 proteínas que se teñían con azul de Coomassie y solamente 3 con la técnica de PAS (Tabla II).

Cabe hacer notar que no todas las proteínas retenidas por la columna contenían carbohidratos detectables por la tinción con PAS; sugiriendo que estas proteínas fueron retenidas indirectamente debido a la formación de agregados proteicos mantenidos por interacciones inespecíficas (electrostáticas, hidrofóbicas, etc.) o bien, como se verá más adelante, por interacciones específicas del tipo de los complejos antígeno-anticuerpo. Las bandas de 27,000 y 18,000 dal que no se teñieron para carbohidratos corres-

penden a Con A desprendida de la columna durante la cromatografía (139).

Las fracciones enriquecidas en glicoproteínas que se obtuvieron de la anterior columna, presentaron un enriquecimiento paralelo en antígenos del cisticerco. Esto se demostró en ensayos de IEF, al comparar el número de antígenos que cada suero de pacientes con neurocisticercosis reconocían cuando eran enfrentados en contra de ECI (3.1), Emm (5.5) y Fmm (4.5) (ver tabla III).

El punto isoelectrico de las proteínas en la fracción Emm resultó ser notablemente ácido (ver III.A.), en coincidencia con resultados de otros estudios en otras especies de cestodos (63). Se ha demostrado la presencia de una alta densidad de cargas negativa en la superficie tegumental de los cestodos (64, 69, 71). Incluso, se ha sugerido que esta característica pudiera determinar que tipo de compuestos son absorbidos por el parásito.

En esta etapa del proyecto se decidió intentar solamente la purificación de glicoproteínas a partir de la fracción ECI por las siguientes razones: 1) la fracción Fmm presentaba un menor contenido de glicoproteínas y antígenos (Tablas II y III) y 2) la fracción Emm (obtenida por homogenización del tejido parasitario) presumiblemente contenía antígenos de la superficie parasitaria, los cuales son los primeros en tener contacto con las células del sistema inmune del huésped.

Al utilizar la fracción Emm en el inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana por la técnica de ELISA, se obtuvo una sensibilidad equivalente a la obtenida con ECI (suero = 85%, LCR = 90 %) y con una preparación pura del antígeno B (suero = 80 % y LCR = 90 %). La especificidad resultó ser de 90 % en suero y LCR cuando se utilizó la fracción ECI como antígeno, y de 96 y 98 % al utilizar al AgB con muestras de suero y LCR, respectivamente (52). La fracción Emm presentó dos ventajas en comparación con los anteriores antígenos: 1) una disminución de hasta 71.4 % en las reacciones cruzadas con sueros de pacientes con otras parasitosis. Cuando se utilizó la fracción Emm sólo se encontraron reacciones cruzadas con algunos casos de pacientes infectados con quiste hidatídico. En otras palabras, el uso de la fracción Emm no permite distinguir con certeza entre el suero de un paciente cisticercoso y el de un hidatidoso. Sin embargo, esta fracción podría ser utilizada para el diagnóstico de la cisticercosis en México, en donde no existen reportes que confirmen la ocurrencia de hidatidosis humana, y 2) la utilización de la fracción Emm en ELISA, disminuye el fondo de la reacción en el método, marcando claramente las diferencias entre los sueros positivos y negativos.

La riqueza de antígenos en Emm hizo de ésta una fracción interesante para tratar de purificar glicoproteínas antigénicas. Se realizaron diversos intentos para aislar algunos antígenos utilizando métodos bioquímicos convencionales con muy poco éxi-

to. La razón de esta gran dificultad posiblemente estriba en los fenómenos de agregación proteica en las fracciones crudas, mencionados anteriormente, por lo que se decidió utilizar un método que rompiera los agregados. El método seleccionado resultó ser la electroelución de las glicoproteínas a partir de geles de PAGE-SDS descrito por Mendel-Hartvig (128). Este método presenta muchas ventajas sobre otros métodos de electroelución usados anteriormente (140-143). Por ejemplo, se puede mencionar la mejor eficiencia en la recuperación de la proteína del gel, así como la posibilidad de electroeluir cantidades en el orden de los miligramos de un sólo gel de placa. El SDS asociado a las proteínas electroeluidas puede ser removido por medio de una diálisis subsecuente o utilizando perlas de amberlita. Entre las limitaciones de éste método, y de otros, se puede mencionar la imposibilidad de electroeluir separadamente proteínas con migraciones relativas muy parecidas. En el presente proyecto, éste fué el caso de las glicoproteínas Gp2-3 que presentan una muy parecida movilidad relativa en el PAGE-SDS.

La disponibilidad de las glicoproteínas puras (Gp1, Gp2-3, Gp5, Gp6) permitió la obtención de anticuerpos contra cada una de ellas, por inmunización de conejos. Al ensayar los anticuerpos por medio de IEF, cada uno formó un arco de precipitación distinto frente a ECI y frente a Emm (Fig. 15), sugiriendo que se trataba de entidades moleculares diferentes entre si y con respecto al antígeno B (ver III.D.).

Los resultados de los ensayos de inmunoperoxidasa indirecta de cada uno de los anticuerpos anti-glicoproteínas, mostraron que todas las glicoproteínas se encuentran en la superficie tegumental del cisticerco de la T. solium. Este es un hallazgo relativamente esperado, puesto que se trata de glicoproteínas asociadas al tejido. Las diferencias en la cantidad de inmunoprecipitado observado en la superficie tegumental para cada una de las glicoproteínas, permiten sugerir diferencias en su abundancia relativa (Gp1 > Gp5 > Gp6 > Gp2-3). Estudios similares, utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta, mostraron que Gp1 y GP6 también se encuentran presentes en la superficie tegumental, así como en los citones tegumentales (células responsables de sintetizar los componentes del tegumento) del cisticerco y de la T. solium adulta (76, 79). La glicoproteína GP1 fué además demostrada en la superficie tegumental de los metacéstodos de T. saginata, T. crassiceps y T. pisiformis. Desafortunadamente, los esfuerzos para localizar estas glicoproteínas en el estadio de oncosferal de T. solium resultaron infructuosos, debido a la gran fluorescencia endógena que éstas presentan. Todo lo anterior indica la existencia de componentes de superficie comunes en varias especies de ténidos, lo cual está de acuerdo con la propuesta de Mills et al. (144), en el sentido de que existen homologías fundamentales en la composición del tegumento de los céstodos.

Sobre la misma línea de razonamiento, los resultados de los ELISAs utilizando la fracción rica en glicoproteínas (Emm), confirmaron que existe reactividad cruzada entre los metacéstodos de la *T. solium* y *E. granulosus*; fenómeno ya reportado por otros autores (145). El *E. granulosus* al igual que la *T. solium* es un céstodo ciclofilido de la familia Taeniidae (146). Los resultados de la presencia de Gp1 en la superficie tegumental de los metacéstodos tenidos antes mencionados hacen de la glicoproteína Gp1 un candidato interesante para realizar estudios de filogenia, utilizando los anticuerpos (anti-Gp1) para determinar si esta glicoproteína se encuentra presente en representantes de los diferentes órdenes y clases del phylum Platyhelminthes; lo que pudiera ser de utilidad para establecer mejores criterios de clasificación taxonómica.

En la superficie de algunos parásitos no sólo se encuentran proteínas del propio organismo, al respecto, se ha demostrado la presencia de proteínas del huésped unidas con alta afinidad. Es posible que las proteínas del huésped se unan a la superficie parasitaria por medio de interacciones electrostáticas gracias a su gran densidad de carga negativa, conferida por los polisacáridos sulfatados de las glicoproteínas de superficie (63). Además, se han propuesto otro tipo de interacciones: hidrofóbicas, receptores de membrana como los receptores para Fc y C3 (147), o bien, la unión de los anticuerpos a los antígenos de superficie. Por lo anterior, era necesario descartar la posibili-

dad de que alguna de las glicoproteínas purificadas fuera una proteína del huésped.

Se realizaron ensayos de EIT enfrentando los anticuerpos anti-glicoproteínas (anti-Gp1, anti-Gp2-3, anti-Gp5 y anti-Gp6) con suero de cerdos normales. Los resultados mostraron que los anticuerpos anti-Gp5 reconocen a un componente del suero porcino, lo cual permitió definir que esta glicoproteína (Gp5) corresponde a la cadena pesada de la IgG porcina, confirmando la observación de otros autores acerca de la gran capacidad de adsorción que tienen las membranas tegumentales de los parásitos céstodos (106-111).

Asimismo, experimentos de EIT de ECI mostraron que cada uno de los anticuerpos anti-glicoproteínas (a excepción de anti-Gp5) reconocen a un gran número de componentes parasitarios del extracto crudo, a pesar de que fueron obtenidos inmunizando conejos con las glicoproteínas purificadas. Esta observación, además de llamar la atención hacia la gran diferencia en sensibilidad entre las técnicas de IEF (ver III.D.) y de EIT (ver III.I.), puede tener varias explicaciones no excluyentes entre sí. La primera consiste en pensar que las glicoproteínas parasitarias purificadas (Gp1, Gp2-3 y Gp6) son fragmentos proteolíticos provenientes de glicoproteínas de mayor peso molecular. Lo anterior podría explicar por qué los anticuerpos anti-Gp2-3 y anti-Gp6, reconocieron bandas de mayor peso molecular que las utilizadas en su producción. Otra posibilidad es que las glicoproteínas puri-

ficadas tienen su peso molecular nativo, pero que una parte de ellas sufre proteólisis durante la obtención del extracto crudo. Ello explicaría por qué los anticuerpos reconocen bandas de pesos moleculares inferiores al de la glicoproteína con que fueron obtenidos. La tercer explicación podría ser que la inmunización de los conejos indujo la producción de anticuerpos dirigidos en contra de residuos carbohidratos comunes en muchas proteínas del cisticerco. Cabe hacer notar que la homogeneización de los cisticercos se llevó a cabo en presencia de varios inhibidores de actividad proteolítica. Además, para los EITs se utilizó un extracto crudo obtenido por homogeneización directa de los cisticercos en la solución de electroforesis (ver II.B.1.a.), que es muy desnaturalizante.

La posibilidad de que los anticuerpos anti-glicoproteínas reconocen a los residuos carbohidratos comunes parece recibir apoyo proveniente de otro tipo de estudios. Con A se une muy homogéneamente a la superficie de varias especies de cisticercos. Esto sugiere que la superficie que los metacéstodos presentan a sus huéspedes es relativamente homogénea con respecto a su composición de carbohidratos (alfa-metil manósido o alfa-metil glucósido). Lo anterior puede tener dos aspectos interesantes, por un lado, algunos autores han postulado que un número grande de sitios antigénicos idénticos o similares pueden producir la síntesis de anticuerpos de baja afinidad (70). Sin embargo, es sabido que la respuesta inmune a polisacáridos repetitivos

muestra considerable variación de especie. Por ejemplo, algunos antígenos polisacáridos repetitivos de bacterias, que son inmunosupresores en el ratón, son protectores en el hombre. Estos anticuerpos protectores pueden persistir hasta por ocho años (148). También se ha reportado que los oligosacáridos de algunos glicoconjugados (glicolípidos y glicoproteínas) son importantes para activar la respuesta de las células T, además de ser responsables en parte, de la formación de granulomas (149). Es en este sentido que las glicoproteínas de la fracción Emm y en especial la glicoproteína GPI, podrían ser utilizadas en ensayos para determinar el papel que juegan en la relación Huésped parásito. En el futuro se realizarán ensayos "in vitro" con células y factores del suero para determinar si estos anticuerpos dirigidos en contra de glicoproteínas de superficie son capaces de mediar una respuesta efectora en contra de los diferentes estadios del parásito y en especial, de los estadios oncosferales.

Se ha propuesto que algunos componentes de la superficie de los céstodos son tóxicos para las células del aparato inmune, o bien, que alteran la respuesta inmune del huésped a nivel local y sistémico (ver I.G.1.). La disponibilidad de las glicoproteínas purificadas y de sus respectivos anticuerpos, nos permitirá conocer el papel que cada uno de los componentes de la superficie juega en la relación huésped parásito. A este respecto, experimentos preliminares de transformación blastoide han mostrado que la fracción Emm disminuye la respuesta "in vitro" a mitógenos

tales como Con A y LPS, cuando las células de bazo son preincubadas con la fracción. Esto sugiere que alguna(s) glicoproteína(s) tiene un efecto supresor sobre la población de linfocitos (T y B) del ratón. Asimismo, ensayos "in vitro" con macrófagos murinos de la línea celular J774, incubados con las fracciones ricas en glicoproteínas, mostraron un incremento en el metabolismo y en la muerte celular, sugiriendo que alguna glicoproteína, o todas ellas, podrían tener un efecto dañino sobre los macrófagos. Cabe recordar que los macrófagos, además de representar una parte de la primera línea de defensa del organismo, son también las células presentadoras de los antígenos, además de producir la interleucina Il-1, que a su vez se requiere para la producción de Il-2, necesarias para desarrollar una respuesta inmune efectiva. Estos resultados sugieren, que dentro de la fracción de glicoproteínas existe algún(os) factor(es) que altera la respuesta inmune del huésped, ayudando al establecimiento del parásito (ver I.G.1).

El disponer de una fracción enriquecida en proteínas de superficie del cisticerco, hace surgir la posibilidad de utilizarla en experimentos de protección. Sin embargo, la presencia de una actividad aparentemente inmunosupresora, ha impedido la realización de estos ensayos. Se requiere identificar cuál o cuáles glicoproteínas son las que afectan la respuesta inmune, así como caracterizar su mecanismo de acción, antes de estar en posibilidad de explorar su posible uso inmunoprolifáctico.

En conclusión, el proyecto aquí descrito constituye un esfuerzo inicial para caracterizar globalmente la composición del tegumento del cisticerco de la T. solium. Se logró purificar y caracterizar parcialmente cuatro glicoproteínas parasitarias. Se trata de uno de los primeros trabajos en utilizar a las lectinas como herramienta para la purificación de componentes de superficie del cisticerco. Finalmente, se describe la obtención de algunas herramientas moleculares (anticuerpos) que permitirán continuar los estudios que aclaren el papel que estas glicoproteínas juegan en el mantenimiento de la relación huésped-parásito.

BIBLIOGRAFIA

1. Zaman, Vigar. II Helminths (Cestodes). En: Atlas of parasitology. Adis Pres Australia, pag. 131, 1979.
2. Asada, J. Otagaki, H., Kaji, F., Aokage, K. y Ochi, G. On the longevity and development of the pork and beef tapeworms in human host. Tokyo Iji Shinshi, 73: 153, 1956.
3. Verster, A. A taxonomic revision of the genus Taenia L., 1758. Onderstepoort. J. Vet. Res. 36: 3, 1969.
4. Makaruk, Z., Leszewska-Potocka, J. y Sporny, S. Surgical complications of taeniasis of the bile track (case reports). Plsky Tygodnik Lekaraski. 34: 1933, 1929.
5. Laclette, J. P., Ornelas, Y., Merchant, M. y Willms, K. Ultrastructure of the surrounding envelopes of Taenia solium eggs. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A., Willms, K. Laclette, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltran, F. Eds. Academic Press, New York. 375, 1982.

6. Gemmel, M. The effect of weather on tapeworm eggs and its epidemiological implications. En: Weather and parasite animal disease, Gibson, T. Ed. World Meteorological Organization. Technical report, 159: 83, 1978.
7. Silverman, P. Studies on the biology on some tapeworms of the genus *Taenia*. II The morphology and development of the taeniid hexacanth embryo and its enclosing membranes, with some notes on the state of development and propagation of gravid segments. *Ann. Trop. Med. and Parasitol.* 48: 356, 1954.
8. Hird, W. y Pullen, M. Tapeworms, meat and man: A brief review and update of cysticercosis caused by *Taenia saginata* and *Taenia solium*. *J. Food Protection*, 42: 58, 1979.
9. Cañedo, L., Laclette, J. P. y Morales, E. Evagination of the metacestode of *Taenia solium*. En: *Cysticercosis: Present state of knowlwdge and perspectives*. Flisser, A., Willms, K., Laclette, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltran, F. Eds. Academic Press, New York. 375, 1982.
10. Flores-Berroeta, L. y Bifano, A. Cisticercosis en los perros *Canis familiaris* de la Cd. de México. *Acta Médica de México*. 1: 27, 1965.

11. Freitas, M. y Lamas de Silva, J. Ocurrencia de *Cysticercus* en caes em Minas Gerais. Arquivos de Escola Superiore de Veterinaria, Universidad Rural do Estado Minas Grerais. 11: 371, 1958.
12. Mazotti, L., Dávalos, A. y Martínez marañon, R. Infecciones naturales y experimentales por *Cysticercus cellulosae* en diferentes especies de mamiferos. Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (Mexico). 25: 151, 1965.
13. Afshar, A. Cysticercosis in Iran, Ann. Trop. Med. Parasitol. 61: 101. 1967.
14. Matheu, L.T. La cisticercosis en el país: Valor de una reacción de precipitación para el diagnóstico de la cisticercosis cerebral. Arch. Col. Med., El Salvador. 14:101, 1961.
15. Schenone, H., Ramirez, R. y Rojas, A. Aspectos epidemiológicos de la neurocisticercosis en América Latina. Bol. Chileno Parasitol. 28: 61, 1973.
16. Desowitz, R. S., Margono, S., Surtjahyo, S. and Simanjuniak, G. Observations and aplicacion of counterimmuno-electrophoresis for the seroepidemiology of human cysticercosis. Southeast Asian. J. Trop. Med. Pub. Hlth. 8: 303, 1977.

17. Hausman, R., Yoe, T. L. and Fossen, A. A case of cysticercosis with some notes on taeniasis in Indonesia. Docum. Nederl. Indon. Morb. Trop. 21: 59, 1950.
18. Ugalde, A. Cisticercosis cerebral generalizada. Rev. Med. Hosp. Gen., México. 1: 5, 1938.
19. Macias, S. R. y Ordoñez, S. Cisticercosis cerebral. Diagnóstico clínico, radiológico y de Laboratorio. Pronóstico. Análisis de 186 casos. Prensa Med. Mex. 35: 6, 1970.
20. Lombardo, L., Mateos, J. H. y Estañol, B. Rev. Med. Hosp. Gen. México. 118: 1, 1982.
21. Macias, V. y Maqueo, M. Cisticercosis cerebral. Rev. Inv. Cli. 10: 443, 1958.
22. Albores, J. y Altamirano, M. Algunas consideraciones sobre 9,412 autopsias realizadas en el Hospital General de México. Rev. Invest. Salud Pública. 31: 1, 1971.
23. Martínez-Romero, H., Martínez-Murray, R. Boisselier, E. y Martínez-Duhart, E. Cisticercosis cerebral humana. Cirugía y cirujanos. 43: 507, 1975.
24. Flores Berroeta, F., Aguirre, J. Fernandez, J., Jurado, J. y Velasco, F. La utilidad de los estudios post-mortem. Patología. 13: 17, 1975.

25. Macías, R., Rodríguez, F. y Ordoñez, S. Cisticercosis cerebral: Anatomía Patológica y correlación Anatómo-clínica. Neurol. Neurocir. Psiquiatr. 11: 271, 1970.
26. Salas-Martínez, M. Procesos patológicos más frecuentes considerados como factores importantes en la causa de muerte en los niños, juzgados a través de la revisión de 2,900 estudios post-mortem realizados en el departamento de Patología del Hospital Infantil de México 1943-1968. Gac. Med. Mex. 102: 216, 1971.
27. López, A. y Cedillo, J. Cisticercosis intracraneal en los niños. Análisis de 48 casos. Rev. Mex. Pediatr. 45: 277, 1976.
28. Pérez-Tamayo, R. y Flores, F. Datos generales de 2202 autopsias. Prensa Med. Mex. 24: 117, 1959.
29. Briceño, C. Biagi, F. y Martínez, B. Cisticercosis. Observaciones sobre 97 casos de autopsia. Prensa Med. Mex. 26: 193, 1961.
30. Marquez-Monter, H. y Austria, B. Cisticercosis en el Hospital General de México, estudio Anatomopatológico de 155 casos. Rev. Lat. Am. Patol. 8: 79, 1969.

31. Ridaura, C., López-Corella, E. Análisis de la mortalidad general en el Hospital General de México. S.S.A. Observaciones de 11 años. Rev. Med. Hosp. Gen. México. 51: 259, 1968.
32. Goldsmith, R. S., Kagan, I. G., Reyes-González, M.A. y Ferreira, J. Estudios seroepidemiológicos realizados en Oaxaca, México. I Encuesta de anticuerpos parasitarios mediante la prueba de hemaglutinación indirecta. Bol. of Sanit. Panamer. 69: 500, 1971.
33. Flisser, A., Bulnes, I., Díaz, M. L., Luna, R., Woodhouse, E., Beltran, F. Martínez, I. y Larralde, C. Estudio seroepidemiológico de la cisticercosis humana en poblaciones predominantemente indígenas y rurales del estado de Chiapas. Arch. Invest. Med. 7: 107, 1976.
34. Arias, L. Búsqueda de parásitos intestinales y de anticuerpos en contra de C. cellulosa en Jesús María, Jalisco. Tesis Profesional. Fac. Quim., Guadalajara. Jal. México. 1980.
35. Biagi, F. Epidemiología en México. Gaceta Med. Mex. 103: 227, 1972.
36. Woodhouse, E., Flisser, A. y Larralde, C. Seroepidemiology of human Cysticercosis in Mexico. En: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A. Willms, K. Laclette, J. P., Larralde, C. Ridaura, C. y Beltrán, F. Eds. Academic Press, New York. 11, 1982.

37. Velasco-Suárez, M., Bravo-Becherelle, N. y Quirasco, F. Human Cysticercosis: Medical implications and economic impact. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J. P., Larralde, C. Ridaura, C. y Beltrán, F. Eds. Academic Press, New York. 63, 1982.
38. Martínez, R. G. Contribución al estudio de la incidencia de la cisticercosis en cerdos sacrificados en el rastro municipal de Celaya, Guanajuato del mes de junio de 1972 al mes de abril de 1973. Su importancia económica en la industria de la porcicultura y bases para su control. Tesis profesional, F.M.V.Z., UNAM., México, 1974.
39. Aluja, A. S. Frequency of porcine cysticercosis in Mexico. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J. P., Larralde, C. Ridaura, C. y Beltrán, F. Academic Press, N. Y., 1982.
40. Peña, F. O. Incidencia de Cysticercus cellulosae en cerdos de engorda en la Piedad, Michoacán. Tesis profesional, F.M.V.Z., UNAM, México, 1976.
41. Garcés, C. F. La cisticercosis porcina como problema de salud pública en el municipio de Jojutla, Morelos y zonas aledañas. Tesis profesional, F.M.V.Z., UNAM., México, 1977.

42. Luna, V. S. La cisticercosis porcina como principal causa de decomiso en 9 rastros del Estado de México. Tesis profesional, F.M.V.Z., UNAM., México, 1976.
43. Mazzotti, L. Incidencia de Cysticercus cellulosae en cerdos de diferentes localidades de la República Mexicana. Rev. Inst. Salub. Enferm. Trop. 14: 53, 1954.
44. Hernández, C., Ramos, M. C. y Tellez, G. Investigación de la cisticercosis porcina en San Luis Potosí, México. Bol. Ofic. Panamer. 61: 430, 1966.
45. Flisser, A. Inmunología en la cisticercosis porcina. Curso de actualización en inmunoparasitología veterinaria. Memorias. F.M.V.Z., UNAM., México, D. F., 1980.
46. Guidelines for surveillance prevention and control of taeniasis-cysticercosis. Gemmel, M., Matyas, Z., Pawlowski, Z y Soulsby, E. Eds. WHO, Geneve, 46, 1984.
47. Carrasco, J. La cisticercosis porcina en el estado de Sonora. Sal. Pub. Mex. 19: 255, 1977.
48. Acevedo-Hernández, A. Economic impact of porcine cysticercosis. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A, Willms, K. Lacllette, J. P., Carlos, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. Academic Press, N. Y. 47, 1982.

49. Rodriguez-Carbajal, J., Boleaga-Durán, B. Neuroradiology of human Cysticercosis. En: Cysticercosis: Present state of Knowledge and Perspectives. Eds. Flisser, A., Willms, K., Laclette, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. Academic Press New York. 139, 1982.
50. Flisser, A., Pérez-Montfort, R. and Larralde, C. The immunology of human and animal cysticercosis a review. Bull. WHO. 57:839, 1979.
51. Nieto, D. Cysticercosis of the nervous system. Diagnosis by means of the spinal fluid complement fixation test. Neurology, Minneap. 6: 725, 1956.
52. Espinoza, B., Ruiz-Palacios, G., Tovar, A., Sandoval, M., Plancarte, A. y Flisser, A. Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. J. Clin. Microb. 24: 536, 1986.
53. Brown H. Larvas de Céstodos extraintestinales del hombre. En: Parasitología clínica. Ed. Interamericana. 175, 1977.
54. López-Cruz, O. Larvas de céstodos extraintestinales del hombre. En Parasitología. Ed. Francisco Mendez Otero, México. 261, 1980.

55. Schmidt, G D. and Roberts, S. L. Tapeworms of particular importance to humans. En: Foundations Parasitology. The C. V. Mosby Company. 354, 1977.
56. Flisser, A., Plancarte, A., Espinoza, B., Woodhouse, E., Rivera, L., Truebat., Yakoleff Greenhouse, V., Sierra, A., Laclette, J. P., Guerra, G., Canedo, L. and Larralde C. The immune status of patients with cysticercosis. AF. J. Clin. and Exp. Immunol. 3:-, 1983.
57. Sealey, M. y Ortiz-Ortiz, L. Cellular immunity in cysticercosis: a review. En: Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A., Willms, K., Laclette, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. Academic Press, New York. 565, 1982.
58. Siebert, A., Good, A. y Simmons, J. Kinetics of primary and secondary infections with Taenia crassiceps metacestodes. Zeder, 1800: Cestoda: Cyclophyllidea. Int. J. Parasit. 8:39, 1978.
59. Good, A., Siebert, A., Robbins, P. and Zaun, S. Modulation of the host immune response by larvae of Taenia crassiceps. En: Cysticercosis: Present State of knowledge and perspectives. Flisser, A. Willms, K., Laclette, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltran, F. Eds. Academic Press, New York. 107, 1982.

60. Miller, K., Good, A. y Mishell, R. Immunodepression in Taenia crassiceps infection: Restoration of the in vitro response to sheep erythrocytes by activated peritoneal cells. *Infection and Immunity*. 22:365, 1978.
61. Willms, K., Merchant, M. Diaz, S. y Arcos, L. Host-parasite interface in the metacestode of Taenia solium. En: *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Flisser, A. Willms, K, Lacleste, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltrán, F. Eds. Academic Press, New York. 397, 1982.
62. Diaz-Camacho, S. Sintesis de anticuerpos en la reacción inflamatoria al cisticerco de la Taenia solium en el músculo porcino. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, UNAM. México, 1983.
63. Arme, C. y Pappas, P. W. *Biology of the Eucestoda*. Academic Press, New York. 2: 297, 1983.
64. Lumsden, R. Surface ultrastructure and cytochemistry of parasitic helminths. *Exp. Parasitol.* 37: 267, 1975.
65. Mukherjee, T. y Williams, A. A comparative study of the ultrastructure of microvilli in the epithelium of small and large intestine of mice. *J. Cell. Biol.* 34:447, 1967.

66. Sheffield, H. Electron microscope studies on the intestinal epithelium of *Ascaris suum*. J. Parasitol. 50:365, 1964.
67. Sosa, A., Giron, H., Alva, S. y Calzada, L. Presence and nature of a glicocalix-like coat on the external vesicular membrane of *Cysticercus cellulosae*: A high resolution histochemical study. Life Sci. 21: 1021, 1977.
68. Pappas, P. y Read, L. Membrane transport in the helminth parasites. Exp. Parasitol. 37: 469, 1975.
69. Lumsden, R. , Oaks, J. y Alworth, W. Cytological studies on the absorptive surfaces of cestodes. IV Localization and cytochemical properties of membrane-fixed cation binding sites. J. Parasitol. 56: 736, 1970.
70. Sandeman, M. y Williams, J. Lectin binding to cyst stages of Taenia taeniformis. J. Parasit. 70: 661, 1984.
71. Lumsden, R. Cytological studies on the absorptive surfaces of cestodes. VI Cytochemical evaluation of electrostatic charge. J. Parasit. 58: 229, 1972.
72. Lumsden, R. Cytological studies on the absorptive surfaces of cestodes. VII Evidence for the function of the tegument glyco-calix in cation binding by Hymenolepis diminuta. J. Parasit. 59: 1121, 1973.

73. Lumsden, R. y Berger, B Cytological studies on the absorptive surfaces of tapeworms, VIII. Phosphohydrolase activity and cation adsorption by the glycocalix of Hymenolepis diminuta. J. Parasit. 60: 774, 1974.
74. Groggi, M., Estrada, J., MacDonald, G. y Kuhn, R. Antigen-antibody analyses in neurocytotoxicosis. J. Parasit. 71:433, 1985.
75. Thakur, A., Schwale, C. y Koussa, M. Polysaccharide of the Taenia hydatigena cyst membrane. Exp. Parasitol. 30: 94, 1971.
76. Oaks, J. y Lumsden, R. Cytological studies on the absorptive surfaces of the cestodes. V. Incorporation of the carbohydrates containing macromolecules into tegument membranes. J. Parasitol. 57: 1256, 1971.
77. Knowles, W. J. and Oaks, J. A. Isolation and partial biochemical characterization of the brush border plasma membrane from the cestode, Hymenolepis diminuta, J. Parasitol. 65: 715, 1979.
78. Friedman, P. A., Weinstein, P. P., Davidson, L. A. y Mueller, J. F. Polypeptides and glycoproteins from the tegument of the Spirometria mansonioides. En: Program and Abstract, 55th Annual Meeting, The American Society of Parasitologist. 56, 1980.

79. Lumsden, R. Cytological studies on the absorptive surfaces of cestodes II. The synthesis and intracellular transport of protein in the strobilar integument of Hymenolepis diminuta. Z. Parasitenkd. 28:1, 1966.
80. Trimble III, J. y Lumsden, R. Cytochemical Characterization of tegument membrane associated carbohydrates in Taenia crassiceps larvae. J. Parasitol. 61:665, 1975.
81. Bonneville, M. y Weinstock, M. Brush border development in the intestinal absorptive cells of Xenopus during metamorphosis. J. Cell. Biol. 44: 151, 1970.
82. Ito, S. Structure and function of the glycocalix. Fed. Proc. 28: 12, 1969.
83. McCracken, R. and Lumsden, R. Structure and function of parasite surface membranes. II. Concanavalin A adsorption by the cestode Hymenolepis diminuta and its effect on the transport. Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem. 52: 331, 1975.
84. McCracken, R. and Lumsden, R. Structure and function of the surface membranes. I. Mechanism of the phlorizin inhibition of hexose transport by the cestode Hymenolepis diminuta. Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem. 50: 153, 1975.

85. Hammerberg, B., Dangler, C. y Williams, J. Taenia taeniaeformis: Chemical composition of parasite factors affecting coagulation and complement cascades. J. Parasitol. 66: 569, 1980.
86. Hammerberg, B. y Williams, J. Physicochemical characterization of complement-interacting factors from Taenia taeniaeformis. J. Immunol. 120: 1039, 1978.
87. Letonja, T. y Hammerberg, B. Third component of complement immunoglobulin deposition and leucocyte attachment related to surface sulfated on larval Taenia taeniaeformis. J. Parasitol. 69: 637, 1983.
88. Avila, J. L. The influence of the type of sulphate bond and degree of sulphation of glycosaminoglycans on their interaction with lysosomal enzymes. Biochem. J. 171: 489, 1978.
89. Bacbcock, G. F. y McCarthy, R. E. Supression of cell-mediated immune responses by dextran sulphate. Immunol. 33: 925, 1977.
90. Hahn, H. Effects of dextran sulphate 500 on cell-mediated resistance to infection with Listeria monocytogenes in mice. Infect. Immunol. 10: 1105, 1974.

91. Rikihisa, Y., Letonja, T., Pratt, N. y Lin, Y. Taenia taeniaeformis: Characterization of larval metabolic products and growth of host gastric cells "in vitro". Exp. Parasitol. 58: 230, 1984.
92. Burger, C., Rikihisa, Y. y Young, C. Taenia taeniaeformis: Inhibition of mitogen induced proliferation and Interleukin-2 production in rat splenocytes by larval "in vitro" product. Exp. Parasitol. 62: 216, 1986.
93. Rikihisa, Y. y Lin, Y. Taenia taeniaeformis: Increased cell growth and neutral mucus production in the gastric mucosa of the rat infected with the larvae. Exp. Parasitol. 58: 147, 1984.
94. Rikihisa, Y. Lin, Y. Fukaya, T. Taenia taeniaeformis: Inhibition of rat production by excretory-secretory product of the cultured metacestode. Exp. Parasitol. 59:390, 1985.
95. Suquet, C., Green-Edwards, C. y Leid, W. Isolation and partial characterization of Taenia taeniaeformis metacestode proteinase inhibitor. Int. J. Parasitol. 14: 165, 1984.
96. Leid, R., Suquet, C. y Perryman, L. Inhibition of antigen- and lectin-induced proliferation of rat spleen cells by Taenia taeniaeformis proteinase inhibitor. Clin. and Exp. Immunol. 57: 187, 1984.

97. Leid, R., Suquet, C., Bouwer, H. y Hinrichs, D. Interleukin inhibition by a parasite proteinase inhibitor, Taeniaestatin. J. Immunol. 137:2700, 1986.
98. Plancarte, A., Flisser, A. y Larralde, C. Fibronectin-like properties in antigen B from the cysticercus of Taenia solium. Cytobios. 36: 83, 1983.
99. Leid, R. y Suquet, C. A superoxide dismutase of metacestodes of Taenia taeniaeformis. Mol. and Biochem. Parasitol. 18: 301, 1986.
100. Pappas, P. y Read, C. Trypsin inactivation by intact Hymenolepis diminuta. J. Parasitol. 58: 864, 1972.
101. Pappas, P. y Read, C. Inactivation of alfa-Chimotrypsin by intact Hymenolepis diminuta. Biol. Bull. 143: 605, 1972.
102. Ruff, M. y Read, C. Inhibition of pancreatic lipasa by Hymenolepis diminuta. J. Parasitol. 59: 105, 1973.
103. Hammerberg, B., Musoke, A. y Williams J. F. Inactivation of complement by hydatidic cyst fluid of E. granulosus. J. Parasitol. 63: 327, 1977.
104. Hammerberg, B. y Williams, J. F. Interaction between Taenia taeniaeformis and the complement system. J. Immunol. 120: 1033, 1978.

105. Willms, K. y Arcos, L. Taenia solium: Host serum proteins on the cysticercus surface identified by an ultrastructural immunoenzyme technique. Exp. Parasitol. 43: 396, 1977.
106. Kwa, B. y Liew, F. Studies on the mechanism of long term survival of Taenia taeniaeformis in rats. J. Helminthol. 52:1, 1978.
107. Siebert, A., Blitz, R. , Morita, C. y Good, A. Taenia crassiceps: Serum and surface immunoglobulins in metacestode infections of mice. Exp. Parasitol. 51: 418, 1981.
108. Befus, A. Hymenolepis diminuta and H. microstoma: Mouse immunoglobulins binding to the tegumental surface. Exp. Parasitol. 41: 242, 1977.
109. Threadgold, L. y Befus, A. Hymenolepis diminuta: Ultrastructural localization of immunoglobulin-binding sites on the tegument. Exp. Parasitol. 43:169, 1977.
110. Mitchell, G., Marchalonis, J. Smith, P., Nicholas, W. y Warner, N. Studies on immune responses to larval cestodes in mice. Immunoglobulins associated with the larval Mesocostoides corti. Aust. J. Exp. Biol. and Med. Sci. 55:187. 1977.

111. Sogandares-Bernal, F. y Voge, M. Immunoglobulins on the surfaces of tetrahyridia of Mesoscestoides corti. Hoeppli 1925 (Cestoda), from laboratory infections of ICR mice. J. Parasitol. 64: 620, 1078.
112. Good, A. y Miller, K. Depression of the inmune response to sheep erythrocytes in mice infected with Taenia crassiceps larvae. Infection and Immunity. 14: 449, 1976.
113. Siebert, A., Good, A. y Simmons, J. Ultrastructure aspects of early immune damage to Taenia crassiceps metacestodes. Int. J. Parasitol. 8: 29, 1978.
114. Siebert, A. y Good, A. Taenia crassiceps: Effect of normal and immune serum on metacestodes in vivo. Exp. Parasitol. 48: 164, 1979.
115. Siebert, A. y Good, A. Taenia crassiceps: Immunity to metacestodes in BALB/c and BDF1 mice. Exp. Parasitol. 50:437, 1980.
116. Correa, D. Elementos del sistema inmunológico en la superficie de cisticercos extirpados del ser humano. Tesis de Licenciatura. Instituto Invest. Biomédicas, UNAM, 1982.
117. Hustead, S. y Williams, J. F. Permeability studies on Taeniid metacestode: I) Uptake of proteins by larval stages of Taenia taeniaeformis, T. crassiceps and E. granulosus. J. Parasitol. 63: 314:, 1977.

118. Chordí, A. y Kagan, I. Identification and characterization of antigenic components of shsheep hydatid by immunoelectrophoresis. J. Parasitol. 51: 63, 1965.
119. Hopkins, C., Law, L. y Threadgold, L. Schistocephalus solidus: Does pinocytosis occur in the plerocercoid tegument?. Exp. Parasitol. 44: 161, 1978.
120. Threadgold, L. y Hopkins, L. Schistocephalus solidus: Pinocytosis by the tegument. Exp. Parasitol. 51: 444, 1981.
121. Threadgold, L. Parasitic Platyhelminths. En: Biology of the integument. 1.- Invertebrates. Eds. Bereiter-Hahn, J., Matoltsy, A. y Sylvia, K. 132, 1984.
122. Raymond, D. The exploitation of host immune responses by parasite. J. Parasitol. 73: 1, 1987.
123. Engelkirk, P. y Williams, J. Taenia taeniaeformis (Cestoda) in the rat: Ultrastructure of the host-parasite interface on days 1 to 7 postinfection. L. Parasitol. 68:620, 1982.
124. Engelkirk, P. y Williams, J. Taenia taeniaeformis (Cestoda) in the rat. Ultrastructure of the host-parasite interface on days 8 to 22 postinfection. J. Parasitol. 69:828, 1983.

125. Siebert, A. Good, A. y Simmons, J. Ultrastructural aspects of the host cellular immune response to Taenia crassiceps metacestodes. Int. J. Parasitol. 9: 323, 1979.
126. Karnovsky, M. A formaldehyde-glutaraldehyde of high osmolality for use in electron microscopy. J. cell. Biol. 27: 137A. 1965.
127. Payne, J. Electrophoresis of proteins on sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gels. En: Chromatografic and electrophoresis techniques. Vol. II: Zone electrophoresis. Ed. Smith, I. Year Book Medical Publications, Chicago, 321, 1976.
128. Mendel-Hartvig, I. A simple and rapid method for the isolation of peptides from sodium dodecyl sulfate-containing polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 121: 215, 1982.
129. Fairbanks, G., Stack, T. y Wallach, D. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocytes membrane. Biochemistry. : 2606, 1971.
130. Leaback, D. y Rutter, A. Polyacrylamide-isoelectrofocusing: A new technique for the electrophoresis of proteins Biochem. Biophys. Res. Commun. 32: 447, 1968.
131. Hartree, E. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal. Chem. 28: 422, 1979.

132. Peterson, G. A simplification of the protein assay method of Lowry et. al. Which is more generally applicable. Anal. Biochem. 83: 346, 1977.
133. Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. y Smith, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. 28:350, 1956.
134. Sober, H., Gutter, F., Wychoff, M. y Peterson, E. Chromatography of proteins. II. Fractionation of serum proteins on anion exchange cellulosaes. J. Am. Chem. Soc. 78:756, 1956.
135. Ouchterlony, D. Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Ann. Arbor Science Publ. Ann. Arbor. 132, 1968.
136. Tsang, V. Peralta, J. y Simmons, R. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. Methods in Enzimology. 92: 377, 1983.
137. Weller, T. y Coons, A. Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated "in vitro". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86:789, 1954.
138. Thompson, R. Techniques in clinical immunology. Blackwell Scientific Publ. Oxford. 85, 1977.

139. Landa, A. Estudio de las glicoproteínas del cisticerco de la Taenia solium. Tesis de Licenciatura, Fac. Química, UNAM. 1984.
140. Ziola, B. y Scraba, D. Recovery of SDS-proteins from polyacrylamide gels by electrophoresis into hydroxyl apatite. Anal. Biochem. 72: 366, 1976.
141. Karsnas, P. y Roos, P. Two methods for electrophoretic elution of proteins from polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 77: 168, 1977.
142. Hanaoka, F. Shaw, J. y Mueller, G. Recovery of functional proteins from dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 99: 170, 1979.
143. Hager, D. y Burgess, R. Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate gels. removal of sodium dodecyl sulfate and renaturation of enzymatic activity. Anal. Biochem. 109: 76, 1980.
144. Mills, G., Coley, C. y Williams, J. Lipid and protein composition of the surface tegument from larvae of Taenia taeniaeformis. J. Parasitol. 70:197, 1984.
145. Schantz, P., Shanks, D. y Wilson, M. Serologic cross-reaction with sera from patients with echinococcosis and cysticercosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29: 609, 1980.

146. Mackiewicz, J. S. Parasitic platyhelminth evolution and sistematics: perspectives and advances since ICOPA IV, 1978.
179. En: Parasites-their world and ours. D. F. Mettrick y S. S. Dessert (Eds). Elsevier Biomedical Press, Amsterdam. 1982.
147. Tarleton, R. y Walter, M. Demostration of IgG-Fc and C3 receptor on adult Schistosoma mansoni. J. Immunol.126: 379, 1981.
148. Handman, E., McConville, M. y Godding, J. Carbohydrates antigens as possible parasites vaccines. Immunology today. 8: 181, 1987.
149. Mitchell and Cruise, M. Schistosomiasis: Antigens and Host-Parasite Interactions. En: Parasite Antigens. Terry W. Pearson (Ed). Marcel Dekker, Inc. 275, 1986.
150. Slais, J. The morphology and patogenicity of the bladder worms Cysticercus cellulosa and Cysticercus bovis. Academia (Publishing house the Czechoslovac Academic of Sciences) Prague, pag. 144, 1970.