

2 Ej. No. 56

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

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

Tesis

que para obtener el título de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presenta

Abraham Landa Piedra



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

JURADO DEL TEMA:

PRESIDENTE

Prof. MA. DOLORES LASTRA AZPILICUETA

VOCAL

Prof. BEATRIZ MEDINA JIMENEZ

SECRETARIO

Prof. OSCAR VELASCO CASTREJON

1er. SUPLENTE

Prof. RAUL AGUILAR CABALLERO

2do. SUPLENTE

Prof. SATURNINO DE LEON CHAPA

EXAMEN PROFESIONAL  
FAC. DE MEDICINA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS DE LA U. N. A. M.

*Mrs. Dolores Lastra*

M. en C. MA. DOLORES LASTRA A.  
( ASESOR DEL TEMA )

*Kaethe Willms*

Dr. KAETHE WILLMS M.  
( SUPERVISOR TECNICO )

*Abraham Landa P.*

ABRAHAM LANDA P.  
( SUSTENTANTE ).

EXAMEN PROFESIONAL  
FAC. DE MEDICINA



FACULTAD DE QUIMICA  
 SECRETARIA DE ASUNTOS ESCOLARES.  
 COORDINACION ACADEMICA DE EXAMENES  
 PROFESIONALES.  
 NUM. CUENTA: 7744134-4  
 T/1984/410/014

F O R M A C

(AUTORIZACION PARA ESCRIBIR DEFINITIVAMENTE EL TEMA REVISADO)

Coordinación de Admón. Escolar  
 Universidad Nacional Autónoma de México  
 P r e s e n t e

Me permito comunicar que el tema de \_\_\_\_\_  
T E S I S

Titulado: "ESTUDIO DE GLICOPROTEINAS DEL CISTICERCO DE LA  
Taenia solium"

que presenta: EL SR. ABRAHAM LANDA PIEDRA  
 de la carrera de: QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Fué aceptado por el Jurado nombrado para dicho examen, el cual -  
 quedó integrado en la siguiente forma:

- |               |        |                                |
|---------------|--------|--------------------------------|
| Presidente    | Prof.: | MA. DOLORIS LASTRA AZPILICUETA |
| V o c a l     | " :    | BEATRIZ MEDINA JIMENEZ         |
| Secretario    | " :    | OSCAR VELASCO CASTREJON        |
| 1er. Suplente | " :    | RAUL AGUILAR CABALLERO         |
| 2do. Suplente | " :    | SATURNINO DE LEON CHAPA        |

A t e n t a m e n t e

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cd. Universitaria D.F., 17 de enero de 1984

Vo. Bo.

*Irma Ramirez Cabañas*  
 ACTUARIA IRMA RAMIREZ CABANAS  
 SECRETARIA DE ASUNTOS ESCOLARES.

IRC mb

EXAMENES DE...  
 FAC. DE QUIMICA

**Esta tesis fue dirigida por los Dres.  
Kaethe Willms y Juan Pedro Laclette, en el  
Departamento de Inmunología del Instituto  
de Investigaciones Biomédicas, UNAM.**

Dedico esta tesis al cariño,  
comprensión, ayuda, esfuerzo,  
y...

DE MIS PADRES

y

HERMANOS

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACF	Adyuvante completo de Freund
AIF	Adyuvante incompleto de Freund
Anti-B	Anti- antígeno B (anticuerpos)
Anti-ECI	Anti-antígenos de ECI (anticuerpos)
BSA	Albúmina sérica bovina
Con A	Concanavalina A
DE 52	Dietilaminoetil celulosa 52
DID	Doble inmunodifusión
ECI	Extracto crudo de cisticercos (ver sección IV, 3)
ECII	Extracto crudo de cisticercos (ver sección IV, 3)
EDTA	Acido etilén diamino tetracético
Emm	Fracción rica en glicoproteínas obtenida por cromatografía (Sefarosa 4B-Con A) de ECI.
ELISA	Análisis inmunoenzimático cuantitativo
Fmm	Fracción rica en glicoproteínas obtenida por cromatografía (Sefarosa 4B-Con A) de FV.
FV	Fluido vesicular
IEF	Inmunolectroforesis
IgA	Inmunoglobulina A
IgD	Inmunoglobulina D
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
LEF	Lectinolectroforesis
2-Merph	2- Mercaptoetanol
PAS	Tinción ácido periódico Schiff
PAGE-SDS	Gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
PBS, 7.2	Solución de NaCl 0.15M y 0.015M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> a pH de 7.2
PCMB	p- Cloro mercuribenzoato
PM	Peso molecular
PMSF	p- Metil sulfonilfluoruro
PPD	Derivado proteico purificado de <u>Mycobacterium tuberculosis</u>
VME/gth	Volumen de medio de extracción por gramo de tejido húmedo
αmm	Alfa metil manósido

## INDICE

	Pág.
I. OBJETIVO	1
II. RESUMEN	2
III. INTRODUCCION	4
1. Ciclo de Vida	5
2. Distribución Geográfica y Prevalencia de la Cisticercosis Humana	6
3. Sintomatología de la Cisticercosis	7
4. Anatomía Patológica	8
5. Diagnóstico	9
6. Tratamiento	9
7. Prevención	10
8. Respuesta Inmunológica del Huésped:	11
a). Antígenos	12
b). Anticuerpos	13
c). Células	15
9. Interfase Huésped-Parásito	16
10. Caracterización de Antígenos del Cisticerco de la <u>Taenia solium</u>	18
IV. MATERIALES Y METODOS	21
1. Reactivos Químicos	21
2. Materiales Biológicos	21
3. Métodos	22
V. RESULTADOS	29
1. Selección de las Fracciones Crudas del Tejido y Fluido Vesicular	29
2. Glicoproteínas en las Fracciones ECI y FV, Reconocidas por la Concanavalina A.	33
3. Cromatografía de Afinidad de las Fracciones ECI y FV en una Columna de Sefarosa 4B-Con A.	34

	Pág.
4. Análisis de los Antígenos Contenidos en las Fracciones Emm y Fmm	41
5. Purificación de Glicoproteínas a partir de la Fracción Emm.	43
VI. DISCUSION	49
VII. APENDICES	55
1. Clasificación del Párasito	55
2. Mecanismos Posibles para la Adquisición de Cisticercosis en el Humano	55
3. Glicoproteínas de Superficie de Céstodos	55
4. Glicoproteínas de Fluido Vesicular de Céstodos	58
5. Lectinas (Concanavalina A).	59
VIII. BIBLIOGRAFIA	64

## I. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo fue el aislamiento y la --  
caracterización parcial de las glicoproteínas solubles del cisticerco --  
de la Taenia solium, como contribución al mejor entendimiento de los --  
componentes bioquímicos de la relación huésped-parásito en la cisticer --  
cosis porcina y humana.

## II. RESUMEN

La superficie que el cisticerco presenta a su huésped humano o porcino es un tegumento sincicial y continuo en toda la cara externa de la pared vesicular. Distintos estudios han mostrado que la membrana plasmática del tegumento posee un rico glicocálix. Aunque se conoce poco acerca de la función que desempeña este glicocálix en la relación huésped-parásito, se ha sugerido que algunas glicoproteínas están involucradas en fenómenos de protección o daño al parásito. Sin embargo, no todas las glicoproteínas que el cisticerco libera al exterior provienen de la superficie. A este respecto se sabe que algunos de los antígenos más relevantes en las parasitosis por taenidos son glicoproteínas provenientes del fluido vesicular. El presente trabajo constituye la fase inicial de un esfuerzo por caracterizar las glicoproteínas somáticas y del fluido vesicular del cisticerco de la T. solium.

Los cisticercos disecados de músculo esquelético de cerdo altamente infectados fueron puncionados y el fluido vesicular colectado. El fluido vesicular fue dializado contra PBS pH 7.2 (FV) mientras que los cisticercos fueron homogenizados en una solución de 0.45 M de NaCl en 0.015 M de fosfatos a pH 7.2 y dializados contra PBS pH 7.2 (ECI). FV y ECI fueron cromatografiados a través de una columna de sefarosa 4B-Con A, obteniéndose fracciones ricas en glicoproteínas denominadas Fmm y Emm si provenían de FV y ECI respectivamente.

Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS de las fracciones mostró que Fmm contenía 15 bandas que se teñían con azul brillante

de Coomassie (ABC), de las cuales sólo 3 (de pesos moleculares de 37,000, 50,000 y 65,000) se teñían con ácido periódico Schiff (PAS). A su vez Emm contenía 22 bandas que se teñían por azul brillante de Coomassie y 8 por PAS (pesos moleculares de 50,000 - 148,000). Por inmunoelectroforesis contra 7 sueros de pacientes cisticercosos ambas fracciones mostraron 8 bandas de precipitación diferentes.

Emm se cromatografió posteriormente a través de sefacril S-300, obteniéndose una fracción formada por 2 glicoproteínas de 89,000 y 93,000 de peso molecular la que se denominó fracción pico IV. Inmunoelectroforesis de esta última fracción en contra de 7 sueros de pacientes cisticercosos, reveló la presencia de 2 antígenos, uno catiónico reconocido por 6/7 sueros y otro aniónico reconocido por 4/7 sueros. Las fracciones Emm, Fmm y pico IV, debido a su gran enriquecimiento antigénico, son de interés para el uso y mejoramiento de los métodos de inmunodiagnóstico, su ensayo en la inmunización y en especial para entender la relación huésped-parásito en la cisticercosis.

### III. INTRODUCCION

La cisticercosis es un serio problema de salud pública y de economía en el mercado e industria de alimentos elaborados con carne de cerdo en países subdesarrollados entre los que se encuentra México (1).

El agente etiológico de la cisticercosis humana y porcina es el cisticerco de la Taenia solium (algunas veces llamado Cysticercus cellulosae). La T. solium es un céstodo ciclofílido (ver Apéndice VIII, 1) cuyo estadio de metacéstodo es un cisticerco (2), en forma de bolsa translúcida (3-6) de 5-10 mm de diámetro con un escólex invaginado y opaco que visto al microscopio de luz posee 4 ventosas y un rostelo con una doble corona de ganchos (Figura 1), el escólex está rodeado por un líquido contenido en la bolsa o pared vesicular.

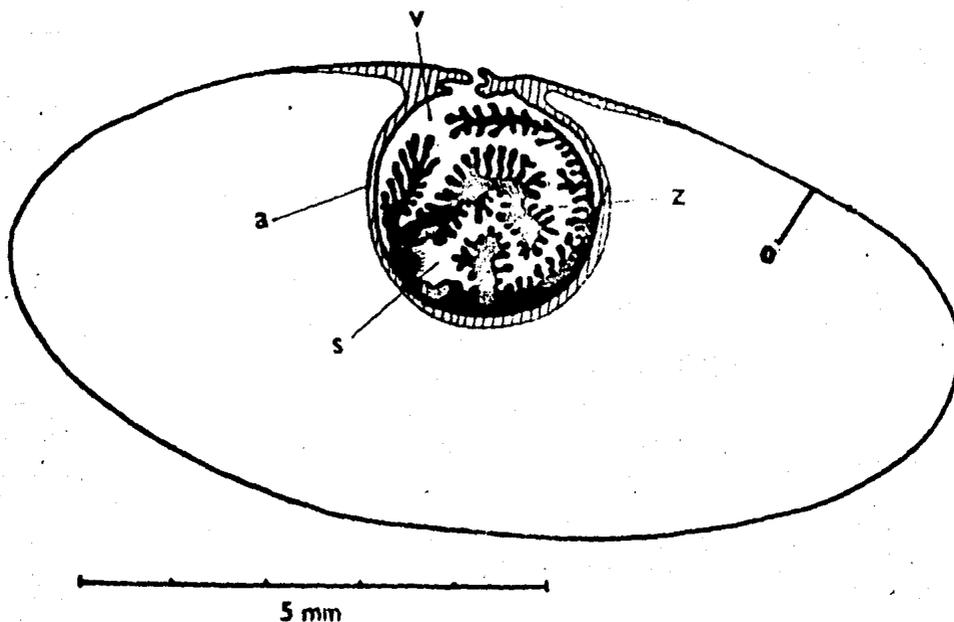


Figura 1. Ilustración esquemática del metacéstodo de T. solium. s- escólex invaginado, z- canal espiral, v- espacio vestibular, a- pared vestibular, o- pared de la vejiga (6).

### 1. Ciclo de Vida

La Taenia solium o tenia solitaria es el gusano adulto que vive solamente en el tracto intestinal del humano (Figura 2) por lo que se dice que el hombre es el único huésped definitivo. La tenia desprende proglótidos grávidos que salen al medio en las heces del huésped a un ritmo de 4-5 por día. Estos proglótidos al desintegrarse, liberan una gran cantidad de huevecillos que pueden contaminar aguas, suelos y alimentos. Al ser ingeridos por el hombre (ver Apéndice VIII, 2) o el cerdo la larva hexacanto contenida dentro del huevecillo se activa y penetra la pared intestinal hasta alcanzar la circulación sanguínea o linfática, lo que produce su distribución en distintos tejidos del huésped (tejido conectivo subcutáneo, ojo, cerebro, músculo, corazón, hígado, pulmones, etc.). en donde requiere de 12-15 semanas para crecer y diferenciarse en el metacétodo o cisticerco. El ciclo se completa si el hombre ingiere carne de cerdo cisticercosa cruda o mal cocida: puesto que al llegar a su aparato digestivo el cisticerco viable se desarrolla hasta la etapa de tenia adulta productora de huevecillos (3-5).

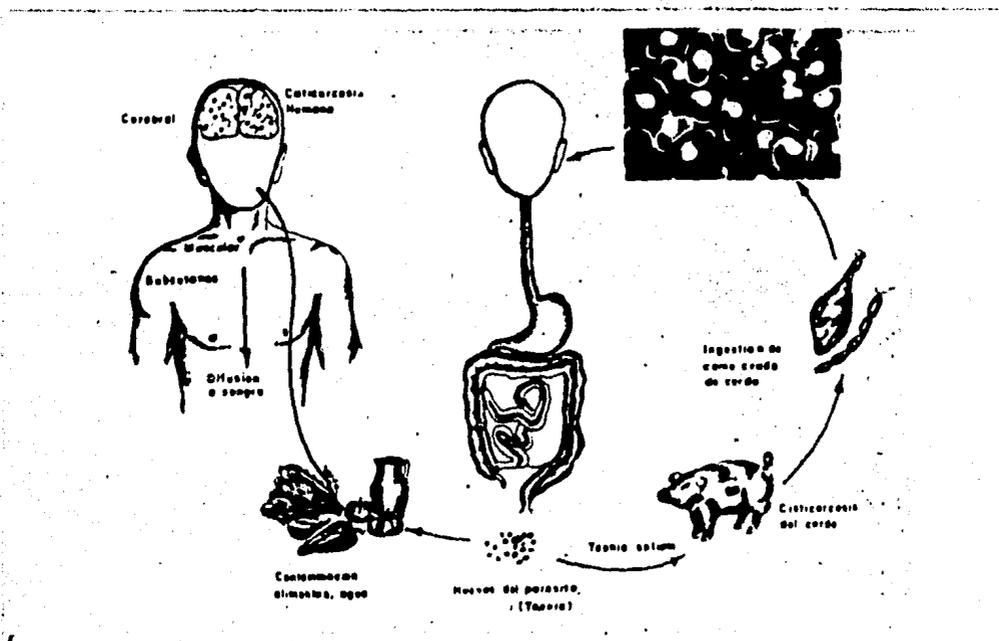


Figura 2. Ciclo de vida de la Taenia solium (7).

## 2. Distribución geográfica y prevalencia de la cisticercosis humana:

La prevalencia de la cisticercosis cerebral en México ha sido estimada en alrededor de un 2% por estudios de autopsias en hospitales -- (8-21). Además se ha demostrado la presencia de anticuerpos anti-cisticerco en el 1-3.8% de la población abierta de acuerdo a datos seroepidemiológicos (22-26).

Por estos estudios se sabe que el riesgo de contraer la enfermedad varía con las áreas geoeconómicas del país (Figura 3). El mayor - porcentaje de sueros positivos se encontró en el área # 5 constituída por los estados de Guanajuato, Michoacán, Jalisco y Nayarit que tradicional-- mente son los más importantes productores de cerdos en el país.

Sorprendentemente, no se encontró ningún factor que influen-- ciara la prevalencia de la enfermedad en las distintas clases culturales, sociales y económicas dentro de cada una de las áreas geoeconómicas de -- México (22,23).

Esto hace suponer que el riesgo de contraer y padecer la en-- fermedad está determinado por una asociación compleja de factores, o -- por un factor único que no discrimina entre los distintos grupos socioculturales. En consecuencia, se ha propuesto el aire y al transporte de huevecillos por vectores (insectos), como factores de propagación de la cisticercosis, en nuestro país donde el fecalismo al aire libre ocurre comunmente (22,23).

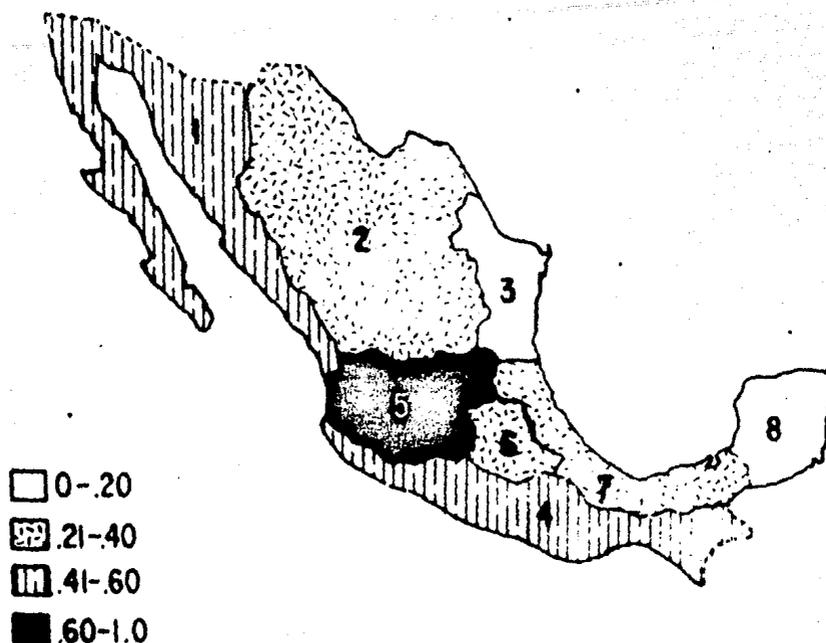


Figura 3. Mapa de las áreas geoeconómicas de la República Mexicana, indicando la frecuencia de anticuerpos anti-cisticercos por región. El área 5 tiene el mayor porcentaje, seguido por las áreas próximas a el océano pacífico (22,23).

### 3. Sintomatología de la cisticercosis humana:

En cada caso, la sintomatología dependerá en forma importante del sitio de localización del o los cisticercos en los distintos órganos. Por ejemplo; los cisticercos son relativamente bien tolerados en músculo esquelético o tejido conectivo subcutáneo en donde aún en infecciones masivas puede no haber síntomas. En el ojo, aunque frecuentemente la sintomatología es ligera, en ocasiones puede ocurrir desprendimiento de retina, enturbiamiento del humor vítreo, inflamación del iris, acompañada de dolor, deformaciones visuales, visión borrosa e incluso ceguera (3). La afectación del músculo cardíaco puede producir taquicardia, disnea, síncope y

ruídos cardíacos anormales.

Sin lugar a dudas las manifestaciones más graves corresponden a la cisticercosis de sistema nervioso central generalmente ligada a una cisticercosis sistémica que ha pasado desapercibida. La afección en la médula espinal puede ocasionar hiperestesia y alteración de los reflejos (3,4). No hay síntomas que definan la evolución y desarrollo del parásito en el cerebro, sin embargo su muerte siempre provoca reacciones inflamatorias dañinas. También se pueden presentar síntomas cuando el parásito es viable si por ejemplo, se produce presión sobre las meninges u obstrucción al flujo del líquido cefalorraquídeo. Los síntomas predominantes pueden ser: síndrome de hipertensión endocraneana, convulsiones, y otros como parálisis transitorias, defectos visuales, diplopia, cefaleas bruscas y trastornos mentales como confusión, irritabilidad, insomnio, ansiedad, cambios de personalidad, falta de concentración, alucinaciones e incluso deterioro mental. Con una considerable frecuencia, la gravedad de los síntomas puede ocasionar la muerte del paciente (3-5).

#### 4. Anatomía Patológica

La presencia del cisticerco en los tejidos del huésped provoca la formación de una respuesta inflamatoria en forma de granuloma crónica caracterizado por la presencia de eosinófilos y otros polimorfonucleares, de macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y células gigantes -- así como por la formación de una cápsula fibrosa con neovascularización -- que delimita al parásito (3-5). Datos recientes han demostrado la presencia de inmunoglobulinas (27) y complemento (27,28) en la superficie del cisticerco, así como de células plasmáticas productoras de anticuerpos --

anti-cisticerco (29) en la cercanía.

A pesar de lo anterior, en la mayor parte de los casos la estrutura celular del parásito parece no afectarse notablemente por la respuesta inflamatoria del huésped (29,30).

## 5. Diagnóstico

El diagnóstico de la cisticercosis cerebral se realiza tomando en cuenta la sintomatología (anteriormente explicada) o cuadro clínico del paciente en combinación con técnicas radiológicas como la tomografía axial computarizada (31) o inmunológicas como la inmunolectroforesis -- (IEF) (24), hemaglutinación (26,32), fijación de complemento (33) en suero y líquido cefalorraquídeo.

En el caso de otras localizaciones del cisticerco 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 (3-5).

## 6. Tratamiento

Hasta hace poco tiempo no se disponía de un tratamiento químico para la cisticercosis humana de tal modo que se recurría a la extirpación quirúrgica del cisticerco en los casos en los que su localización -- era accesible. En otros casos, el uso de derivaciones para el flujo del líquido cefalorraquídeo era la única alternativa posible. Con respecto a la cisticercosis cerebral, frecuentemente la extirpación no se puede --

llevar a cabo debido no solo a su inaccesibilidad sino también al alto riesgo que implica la intervención. En los últimos 5 años se han probado 2 medicamentos: El prazicuantel (34-36) y el metrifonato (37); en pacientes cisticercosos controlados por distintos grupos médicos de México y de otros países. Aunque los resultados no son totalmente confiables, hasta la fecha el tratamiento con prazicuantel aparece ya como de elección en casos de cisticercosis parenquimatosa cerebral en los que el parásito no se ha calcificado. Sin embargo, las evaluaciones acerca de su efectividad así como de los posibles efectos colaterales deben ser mejor estudiados.

## 6. Prevención

Al igual que muchas enfermedades parasitarias, la erradicación de la cisticercosis depende importantemente del mejoramiento de las condiciones educacionales y de vida de sectores considerables de la población, por lo que la solución a este problema posiblemente requiera de un período muy largo de tiempo. Sin embargo, distintos autores e instituciones han propuesto una serie de medidas que de aplicarse sin duda producirán resultados positivos a corto plazo (1,3,4,5,24,38,39,40).

- Organizar campañas educativas a nivel nacional en especial en las áreas de mayor riesgo de contraer la enfermedad, informando a la población de los mecanismos de infección en los humanos y el ganado así como su prevención y su cura.

- Mejorar las condiciones higiénicas del ganado porcino, para evitar su infección, así como vigilar estrictamente la salud de trabajadores que tengan contacto con este tipo de ganado.
- Establecer una inspección sanitaria efectiva que permita desechar la carne de cerdos cisticercosos en los rastros.
- Control sanitario de aguas negras para evitar que al ser utilizadas como aguas de riego, contaminen a los alimentos.
- Dotar de recursos sanitarios (agua potable, drenajes, fosas sépticas, etc.) a los centros urbanos y áreas rurales marginadas para una adecuada eliminación de las excretas.
- Organizar campañas masivas para la desparasitación de los portadores de T. solium, así como cuidar que éstos no tengan participación en la preparación de alimentos.
- Impulsar la investigación para el mejoramiento de los métodos de diagnóstico, así como para continuar la búsqueda de una vacuna, que ayude a reducir el riesgo de contraer la enfermedad.
- Realizar evaluaciones periódicas así como estudios seroepidemiológicos frecuentes, que vigilen el efecto de las medidas antes mencionadas.

#### 8. Respuesta Inmunológica del Huésped

El hecho de que la evidencia clínica de adquisición de inmunidad en muchas parasitosis es incompleta o dudosa, ha llevado a la creencia de que los parásitos son poco inmunogénicos. En realidad hay pocas bases para esta creencia puesto que en todas las infecciones estu-

diadas adecuadamente, se pueden encontrar anticuerpos o células específicas. En muchos casos los niveles de anticuerpo y células tienen poca o ninguna relación con el estado inmunológico y clínico del paciente lo que indica que su respuesta inmune no lo está protegiendo. En general se -- puede afirmar que el parásito efectivamente sensibiliza al huésped y sin embargo sobrevive por largos períodos. El entendimiento de los mecanismos que toman parte en esta compleja relación claramente se conseguirá a través del estudio de los factores que por parte del huésped y del parásito participan para conseguir ese delicado equilibrio entre los 2 organismos.

En el caso de la cisticercosis humana, el conocimiento de -- los factores involucrados por parte del parásito y del huésped es todavía muy pobre como, se podrá observar a continuación;

a) Antígenos

La composición antigénica de un extracto crudo del cisticerco de la T. solium puede ser determinado por IEF usando sueros de pacientes cisticercosos. Este procedimiento que es fácil de realizar y cuyos resultados son razonablemente confiables permitió establecer una clasificación de los antígenos del cisticerco de acuerdo a su movilidad electroforética, de este modo se sabe que son 8 los antígenos reconocidos por los sueros de los pacientes cisticercosos a los cuales se les denominó con una de las -- primeras letras del alfabeto (Figura 4),

Un componente isoeléctrico denominado antígeno B resultó con -- mucho ser el más frecuentemente reconocido (84%) por los sueros de los pa-

cientes, que tuvieron niveles detectables de anticuerpos por IEF (ver -  
sección III, 8b), seguido por los antígenos A (47%), E (35%), C (30%), etc.  
(Figura 4), (22,24,41).

b). Anticuerpos

La respuesta inmune humoral de pacientes cisticercosos ha --  
sido estudiada usando el método de IEF, mencionado anteriormente. Se en-  
contró que sólo la mitad de los sueros de pacientes tenían niveles de --  
anticuerpos detectables por este método. A pesar de la baja sensibilidad  
de la IEF se logró caracterizar la respuesta por anticuerpos de los pa--  
cientes con sueros positivos.

La respuesta humoral de estos pacientes es muy heterogénea a  
juizar por la variación del número y tipo de antígenos reconocidos por -  
los distintos sueros. El 77% de estos pacientes sintetizan anticuerpos  
contra 1-3 antígeno, mientras que sólo el 1% reconoce los 8 antígenos des  
critos. Con respecto a las clases de inmunoglobulinas que constituyen -  
los anticuerpos anti-cisticerco, se encontró IgG en el 98% de los casos,  
IgM en el 80%, IgE en el 37%, IgA en el 29% e IgD en el 24% Tabla I, --  
(22,24,41).

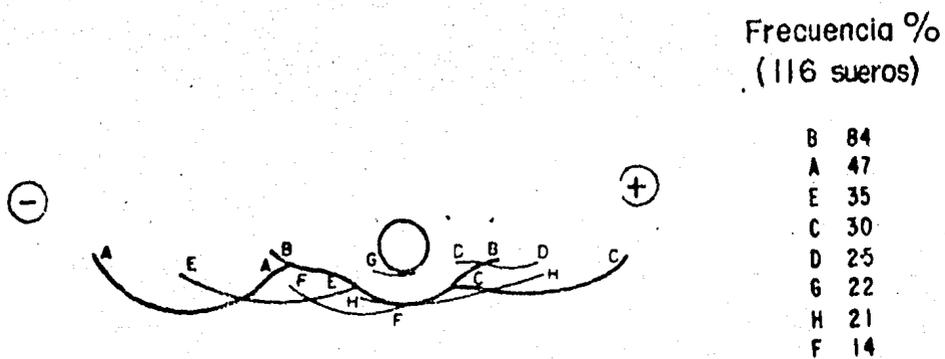


Figura 4. Diagrama de todas las bandas de precipitación encontradas por inmunoelectroforesis de sueros humanos contra un extracto antigénico de cisticercos de la T. solium (22).

TABLA I. FRECUENCIA EN PORCIENTO DE LA REACCION ENTRE LOS 8 ANTIGENOS ENCONTRADOS EN EL CISTICERCO DE LA T. solium Y LAS 5 CLASES DE INMUNOGLOBULINAS (22).

Inmunoglobina	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	18	5	0
IgD	20	0	11	6	0	0	6	0

c). Células

La respuesta inmune celular en la cisticercosis humana ha sido pobremente estudiada. El único dato sólido en este sentido proviene del descubrimiento de que la respuesta en piel al PPD que en México es notablemente alta, se encuentra disminuida en los pacientes cisticercosos; 17% de las pruebas en pacientes fueron positivas en comparación con un 64% de positividad en individuos sanos (22,41).

Muchas preguntas sobre la participación de células T citotóxicas, macrófagos, eosinófilos, etc. no pueden ser respondidas ni siquiera

superficialmente en la actualidad. Es clara la necesidad de futuras investigaciones en esta dirección (22,41).

#### 9. Interfase Huésped-Parásito

La interfase huésped-parásito se define como la región de -- contacto físico y químico entre ambos organismos. Es a través de esta - interfase que los dos organismos se interrelacionan y hasta donde cabe el uso del término, se comunican entre sí.

La superficie que el cisticerco presenta a su huésped humano o porcino, es un tegumento sincicial y continuo en toda la cara externa - de la pared vesicular. Los céstodos carecen de tracto digestivo y obtienen sus nutrientes y excretan sus desechos a través de la superficie tegumentaria (42). Esta superficie de absorción aparece aumentada por microvellosidades similares a las del epitelio intestinal humano (Figura 5).

Asimismo, la excreción de los desechos parasitarios, algunos de los cuales son antigénicos, ocurriré por el mismo tegumento (43).

A diferencia de los parásitos nematodos que poseen cutículas inertes (42), la superficie del cisticerco en contacto con el huésped es una membrana plasmática que como tal debiera ser susceptible al daño por - el complemento o células efectoras. Sin embargo, a pesar de que el huésped desarrolla una respuesta inflamatoria específica, la superficie del parásito no sufre daño aparente (29,30).

Distintos estudios indican que esta membrana plasmática posee un rico glicocálix (Figura 5) formado por glicolípidos y glicoproteínas - (30,42,44). Se conoce poco acerca de la función que desempeña este glicocálix en la relación huésped-parásito. Como se indica en la revisión sobre glicoproteínas de superficie en céstodos que se presenta en la sección VIII,; algunas glicoproteínas aparentemente están involucradas en fenómenos de transporte de solutos (42,45), mientras que otras pudieran jugar papeles protectores (al conferir carga negativa a la superficie, etc.) o deletereos (en el caso de antígenos relevantes en la superficie o secretados a través de ella) (27,28,30,46,47,48,49,50,51).

Sin embargo, es muy probable que no todas las glicoproteínas liberadas al exterior provengan de la superficie. Existe evidencia clara de que la pared vesicular permite el libre flujo de macromoléculas contenidas en el fluido vesicular de larvas de taenidos (50-52). Estas macromoléculas entre las que se encuentran algunas glicoproteínas (ver apéndice VIII, 4), seguramente participan de manera relevante en la interacción huésped-parásito.

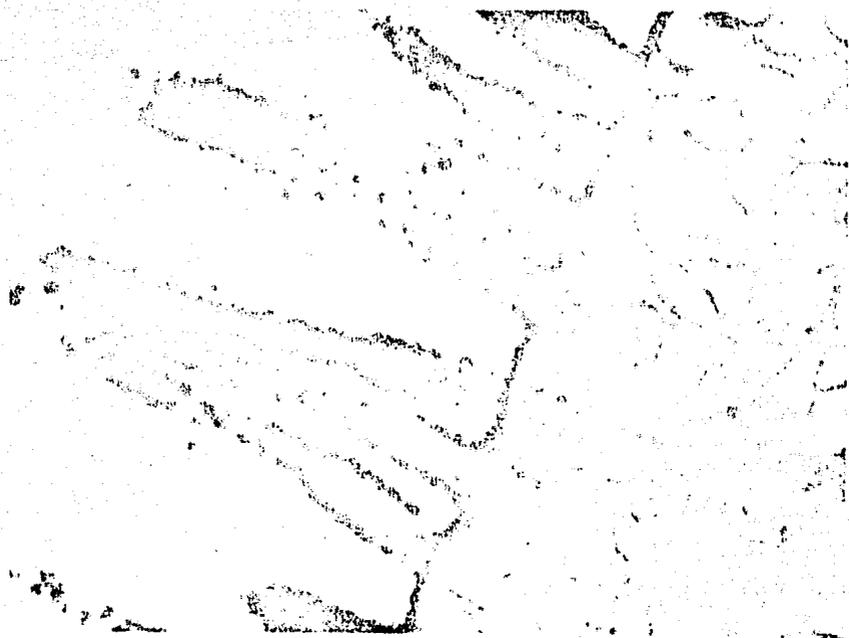


Figura 5. Superficie del tegumento de la bolsa vesicular de la Taenia solium (tinción con rojo de rutenio) (30).

#### 10. Caracterización de Antígenos del Cisticerco

Como se mencionó en la sección III, 8a, los sueros de los pacientes cisticercosos presentan anticuerpos que reconocen al menos 8 antígenos parasitarios. El único antígeno que ha sido purificado y caracterizado es el antígeno B (53). El hecho de disponer del antígeno B en forma pura, facilitó el descubrimiento de sus propiedades de fibronectina (49) que a su vez permitió postular un mecanismo novedoso para explicar como el cisticerco evade la respuesta inmune del huésped. Con respecto a los restantes 7 antígenos la información disponible es prácticamente nula.

Se han realizado varios esfuerzos para tratar de purificar - otros antígenos, que desafortunadamente han tenido poco éxito. La razón aparente para explicar la notable dificultad para purificar componentes del parásito se debe al menos en parte a la complejidad de los extractos crudos iniciales. El cisticerco posee un tejido constituido por al menos 6 tipos celulares diferentes (54). Debido a la naturaleza sincicial del tejido de los céstodos, no ha sido posible aislar poblaciones celulares de un tipo. Esto hace que el extracto crudo a partir del cual se inician los intentos de purificación sea de una complejidad extrema que impide que la metodología bioquímica tradicional sea de utilidad. Lo anterior sugirió que una alternativa metodológica eran los modernos métodos de purificación por afinidad. Puesto que no se disponía de anticuerpos dirigidos por separado contra cada uno de los antígenos, se decidió el uso de una lectina como factor de especificidad para el aislamiento de proteínas que contengan residuos de carbohidratos en su molécula (glicoproteínas). Con canavalina A (Con A) resultó la lectina seleccionada en parte por estar bien caracterizada, ser disponible comercialmente y por su especificidad hacia grupos carbohidratos muy comunes en las glicoproteínas (55). El uso de Con A garantizaba el atrapamiento de la mayor parte de las glicoproteínas del cisticerco lo que a su vez permitía su parcial caracterización.

Como es bien conocido, casi todas las proteínas de superficie en las células animales son glicoproteínas. Por otro lado las glicoproteínas que no son de superficie, prácticamente siempre son secretadas al exterior. En términos generales se puede afirmar que las proteínas que tienen una exposición, función o localización extracelular son glicoproteínas (56,57).

Para el caso de una relación huésped-parásito, el sistema inmune del huésped reconocerá primordialmente a los componentes que el parásito expone en su superficie o que secreta hacia el exterior. Por lo tan to, al intentar el aislamiento de glicoproteínas del cisticerco, se tenía como segundo propósito el aislamiento de componentes antigénicos del pará sito. La estrategia consistió en acoplar Con A a sefarosa 4B, para después utilizarla en la obtención de fracciones menos complejas y ricas en glicoproteínas del extracto crudo y del fluido vesicular del cisticerco, que permitiera rastrear la presencia de antígenos parasitarios.

#### IV. MATERIALES Y METODOS

##### 1. Reactivos Químicos

La albúmina sérica bovina (BSA), la agarosa tipo III, el ácido etilén diamino tetracético (EDTA), el alfa-metilmanósido ( $\alpha$  mm), la conca-navalina A (Con A), la sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno y el sefadex 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) fueron obtenidos de Bio-Rad Laboratories. El sefacril S-300 y la sefarosa 4B de Pharmacia Fine Company. La Dietilaminoetil celulosa (DE52) de Whatman. Las unidades sumergibles de filtración de Millipore Corporation. El reactivo de Bolton-Hunter ( $I^{125}$ ) de Amersham International y las placas para rayos X de Kodak de México.

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

##### 2. Materiales Biológicos

Cisticercos de la T. solium, fueron obtenidos por disección de músculo esquelético de cerdos altamente infectados provenientes de varios rastros oficiales de la ciudad de México. El fluido vesicular fue removido por punción y ambos materiales (fluido y cisticercos) se amacendaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Los adyuvantes completos (ACF) e incompleto (AIF) de Freund se obtuvieron de Difco Laboratories.

Sueros de pacientes con neurocisticercosis comprobada, fueron amablemente aportados por la Dra. Ana Flisser del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M., el suero anti-B fue amablemente proporcionado por la Químico Guadalupe Guerra del mismo Departamento e Instituto, los sueros hiperinmunes de conejos fueron obtenidos por inmunización subcutánea en conejos Nueva Zelanda, de acuerdo al siguiente protocolo:

<u>Día</u>	<u>Inoculación</u>	<u>Vehículo</u>	<u>Proteína</u>
0	Primera	0.5 ml de ACF + 0.5 ml de PBS, 7.2	0.5 mg
7	Descanso	-	-
14	Segunda	0.5 ml de AIF + 0.5 ml de PBS, 7.2	1 mg
21	Tercera,	"	1 mg
28	Sangrado		

El suero fue separado por centrifugación a 2000 rpm y almacenado en alícuotas a -20°C hasta su uso.

### 3. Métodos

#### - Obtención de los extractos crudos (EC):

ECI. Los cisticercos de T. solium fueron homogenizados en un medio de extracción que contenía NaCl 0.45 M, EDTA 1.5 mM, PCMB 0.04% (p/v), PMSF 0.006% (p/v), 2-Merpho 0.02 M y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.015 M, utilizando un homogenizador Politrón (Brinkman

Instruments) a máxima velocidad durante 1-2 minutos a 4°C. El homogenado fue ultracentrifugado a 100,000 Xg durante 35 min. a 4°C, y deslipidizado a esta misma temperatura. El precipitado era decantado y el sobrenadante inmediatamente dializado contra NaCl 0.15 M y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.015 M pH, 7.2 (PBS, 7.2). El objetivo de esta diálisis era el de eliminar al 2-Merpho, al PCMB y al PMSF los cuales interfieren con determinaciones bioquímicas posteriores. Pequeñas cantidades de material que se agregan durante la diálisis, se separaban por ultracentrifugación a 100,000 Xg durante 35 min. a 4°C para obtener un sobrenadante opalescente claro, al que se denominó ECI.

ECII. Este extracto se obtenía siguiendo un procedimiento idéntico al anterior sustituyendo solamente en el medio de extracción - NaCl 0.45 M por KCl 3 M.

- Obtención del fluido vesicular (FV)

El fluido vesicular colectado por punción de los cisticercos - fue ultracentrifugado a 100,000 Xg por 35 min. a 4°C, dializado contra PBS, 7.2 y finalmente ultracentrifugado de igual forma.

- Doble inmunodifusión, inmunolectroforesis y lectinolectroforesis:

La doble inmunodifusión (DID) se llevó a cabo en 0.8% de agarosa (p/v) en amortiguador de Barbitol 0.05 M pH 8.6, de acuerdo al método de Ouchterlony (58). Para la inmunolectroforesis (IEF) y la lectinolectroforesis (LEF), se cubrieron laminillas de -

microscopio con 0.8% de agarosa (p/v) en amortiguador de barbitol y se aplicaron 25 ul de muestra a los pozos del gel. -- Después de 60-90 min. de electroforesis a 3 ma por laminilla, el suero o la lectina (Con A) se adicionaban al canal y se -- dejaba difundir en una cámara húmeda durante 48 hrs., las laminillas se lavaban exhaustivamente en NaCl 0.5 M, en agua -- destilada y se secaban. Finalmente, las laminillas se teñían con negro amido al 0.1% (p/v) en ácido acético al 10% (v/v) y se desteñían con ácido acético al 10% (58).

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

La composición polipeptídica de todas las fracciones obtenidas fue determinada por PAGE-SDS en geles de placa al 10% de acuerdo a Payne (59). La tinción de los geles fue alternativamente con azul brillante de Coomassie para la tinción de proteínas o con la técnica de ácido periódico Schiff (PAS) (60) para glicoproteínas. Para las determinaciones de pesos moleculares (PM) se usaron proteínas globulares como estándares.

- Obtención de Con A ( $I^{125}$ ):

Se marcaron 300 ug de Con A con iodo radiactivo usando -- el reactivo de Bolton-Hunter (61) que se obtiene comercialmente.

La separación del iodo no unido a Con A se llevó a cabo pasando la muestra marcada por una columna de sefadex G-75. Después -- de lavar la radiactividad libre la Con A unida a la columna, -

fue eluída aplicando un volumen de  $\alpha$  mm 0.1 M en PBS, 7.2 (55).

De la columna se recuperaron aproximadamente 150 ug de Con A ( $I^{125}$ ) con una actividad específica de  $1.35 \times 10^6$  cpm/ug.

- Acoplamiento de la Con A a la sefarosa 4B:

- a) Activación de la sefarosa 4B; 17.5 ml de sefarosa 4B húmeda se suspendían en 17.5 ml de  $Na_2CO_3$  2 M y 10.5 ml de - agua destilada. La mezcla se enfriaba entre 5-7°C y se - añadían 0.7 g de bromuro de cianógeno disuelto en  $NaHCO_3$  0.1 M agitando durante 10 min. a la misma temperatura. La sefarosa 4B finalmente, es lavada con agua destilada y  $NaHCO_3$  0.1 M (62).
- b) Acoplamiento de la Con A a la sefarosa 4B; 100 mg de Con A fue disuelta en 50 ml de  $NaHCO_3$  0.1 M, NaCl 0.5 M y glucosa 0.1 M, a la solución anterior se adicionaban 17.5 ml de sefarosa 4B previamente activada y se mantenía la mezcla durante 2 horas con agitación suave a temperatura ambiente. Después del acoplamiento se bloqueaban los sitios activos remanentes usando glicilglicina 0.5 M.

El acoplamiento de la Con A ( $I^{125}$ ) a la sefarosa 4B se llevó a cabo de igual forma usando una mezcla de Con A fría y Con A -- ( $I^{125}$ ) de tal manera que se tuviera la actividad específica - deseada (63).

- Cromatografías

- a) De afinidad usando sefarosa 4B Con A: La columna consistía en una jeringa de plástico de 20 ml conteniendo 17.5 ml de sefarosa 4B Con A. La cual se equilibraba con PBS, 7.2. Generalmente, 40 ml de ECI con una concentración de proteínas de 3-4 mg/ml ó 7 ml de FV con una concentración de 6-7 mg/ml eran pasados a través de la columna con una velocidad de flujo de 30 ml/h utilizando una bomba peristáltica (L200 Varioperpex, LKB). Al terminar de eluir el material que no se unía a la columna se pasaba 40-60 ml de PBS, 7.2, posteriormente el material unido a la columna con baja afinidad era despegado pasando 45 ml de NaCl 0.5 M en PBS, 7.2. Finalmente el material con alta afinidad a la Con A era eluido pasando 45 ml de  $\alpha$  mm 0.1 M o glucosa 0.5 M en PBS, 7.2, fracciones de 3 ml fueron colectadas. Los picos obtenidos eran dializados contra PBS, 7.2 y concentrados hasta 6-7 mg/ml de proteína.

La fracción obtenida de este modo a partir de ECI se denominó Emm, mientras que al obtenido a partir de FV se le denominó Fmm.

La cromatografía usando sefarosa 4B Con A ( $I^{125}$ ) se corría de igual forma contando la radioactividad contenida en las fracciones en un contador de radiaciones gamma de Abott Laboratories, fracciones de 5 ml en este caso fueron colectadas.

- b) De intercambio iónico: La cromatografía de intercambio iónico de la fracción Emm, se llevó a cabo en una jeringa de plástico de 20 ml conteniendo 17 ml del intercambiador iónico (DE52)

activado (64). Antes de la cromatografía Emm fue dializado - contra amortiguador de fosfatos 0.015 M, pH 7.4 y centrifugado a 100,000 Xg por 15 min. a 4°C, en la cromatografía se usó el mismo amortiguador, el material unido fue eluido aplicando un gradiente de 0.1 - 0.5 M de NaCl. Generalmente 9 ml de una - concentración de 1.2 mg/ml fueron aplicados a la columna con un flujo de 60 ml/h; fracciones de 2.5 ml fueron colectadas y su absorbancia medida a 280 nm.

- c) Cromatografía de filtración en sefacril S-300; 3.5 ml de la fracción Emm conteniendo 10 mg totales de proteína, fueron cromatografiados en una columna de 200 cm de longitud y 0.9 cm de diámetro con un volumen de cama de 175 ml. La cromatografía se llevó a cabo en un amortiguador conteniendo NaCl 0.5 M, con una velocidad de flujo de 8 ml/h, usando una bomba peristáltica. Se colectaron fracciones de 1.5 ml, a los que se determinó su absorbancia a 280 nm. Los picos obtenidos fueron fraccionados concentrados y dializados contra PBS, 7.2 para determinaciones bioquímicas subsecuentes.

#### - Métodos varios

- a) Determinación de proteínas: La concentración de proteínas en todas las fracciones fue determinada por el método de Lowry modificado por Hartree, usando BSA como estándar (65).
- b) Determinación de carbohidratos: La concentración de carbohidratos en todas las fracciones fue determinada por el método de Fenol-sulfúrico, usando dextrosa como estándar (66).

- c) Autorradiografía: Los PAGE-SDS teñidos con azul brillante de Coomassie conteniendo material marcado con  $I^{125}$  se secaron y se pusieron en contacto con una placa de rayos X durante 6 - 24 horas. La placa se reveló por 2 min. en revelador D-19 diluido 1:1 y se fijó por 10 min. en fijador rápido de Kodak.

## V. RESULTADOS

### 1. Selección de las Fracciones Crudas del Tejido y del Fluido Vesicular

Puesto que el objetivo de la tesis fue el de caracterizar las glicoproteínas solubles del cisticerco de la T. solium, el primer esfuerzo se hizo para seleccionar el medio más eficiente para la solubilización del material proteico del parásito. En el caso del fluido vesicular el problema fue sencillo puesto que la fracción inicial FV cuya composición proteica se observa en la figura 7, se obtuvo dializando el fluido contra el amortiguador deseado (PBS, 7.2), seguido por una ultracentrifugación para eliminar una mínima cantidad del material agregado (ver sección IV, 3). En cambio, en el caso de la solubilización de proteínas tisulares del cisticerco, se decidió comparar los 2 métodos más comunmente usados (ver sección IV, 3) antes de elegir a uno de ellos. La diferencia entre los 2 métodos reside solamente en la composición del medio de extracción, que en un caso posee una alta fuerza iónica (KCl 3M) mientras que en el otro posee una mediana fuerza iónica (NaCl 0.45 M) pero que además contiene otro agente disociante (2 mercaptoetanol). En ambos casos se probaron distintas relaciones volumen de medio de extracción por gramo de tejido húmedo de cisticercos (VME/gth).

En la tabla II se observa que la concentración de proteínas en los 2 extractos disminuía conforme la relación VME/gth aumentaba. Sin embargo, la cantidad total de proteínas extraídas\* (que resulta de la concentración de proteínas por el volumen obtenido de ECI o ECII) ascendió sólo ligeramente en las relaciones mayores a 4. La comparación del rendimiento

obtenido para los 2 medios de extracción se presenta de forma gráfica en la figura 6. La cantidad total de proteínas obtenidas en ECI y ECII fue prácticamente igual. Asimismo, la composición de proteínas en las 2 fracciones fue similar; el patrón de bandeo en PAGE-SDS mostró en ambos casos más de 30 proteínas diferentes cuyos pesos moleculares estaban incluidos en un rango de 10,000 a 150,000 (Fig. 7). La figura 8 muestra el patrón antigénico obtenido por IEF de ECI y ECII contra un suero hiperimmune anti-ECI obtenido en conejo. En ambos casos consistió en al menos 5 diferentes antígenos de los cuales uno migraba isoelectricamente mientras los 4 restantes migraban al polo positivo.

TABLA II. SOLUBILIZACION DE MATERIAL PROTEICO EN LA OBTENCION DE ECI Y ECII

VME/gth +	Proteína mg/ml	Volumen total ml	Proteína total mg/ml
Obtención de ECI (NaCl 0.45 M)			
2	12.66	2	25.2
4	9.1	3.3	30.03
6	6.03	4.3	25.94
8	4.3	7.0	30.10
10	3.76	9.0	33.89
12	3.2	11.0	35.2
Obtención de ECII (KCl 3 M)			
2	7.8	3.3	25.74
4	5.8	4.4	25.66
6	4.3	5.3	22.79
8	3.76	8.0	30.13
10	2.96	11.4	33.81
12	2.56	13.5	34.64

+ VME/gth: Volumen de medio de extracción (en ml) por gramo de tejido húmedo.

Las extracciones fueron realizadas por duplicado con muestras de un gramo de tejido húmedo (gth) de cisticercos de la T. solium por caso.

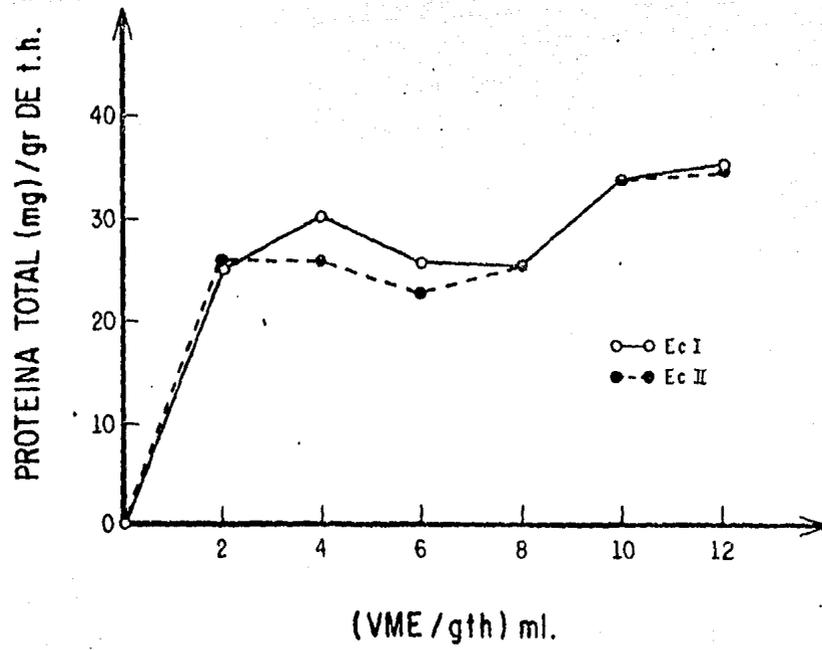


Figura 6. Proteína total determinada en los extractos obtenidos con los 2 medios de extracción.

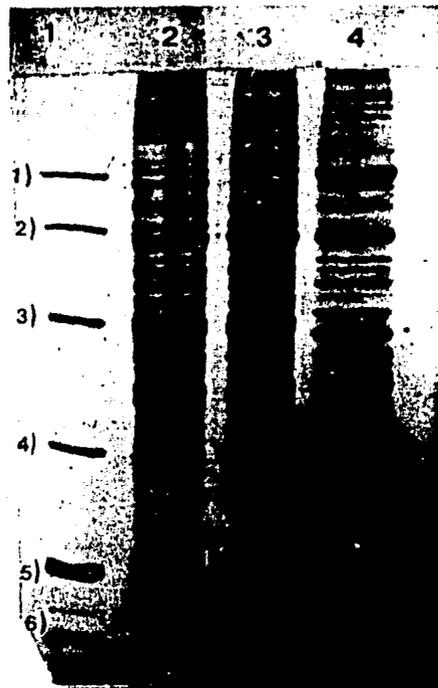


Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de los extractos ECI (carril 2), ECII (carril 3), FV (carril 4) y estándares de proteínas globulares de pesos moleculares conocidos: 1) Fosforilasa B (92,500), 2) BSA (66,200), 3) Ovoalbúmina (45,000), 4) Anhidrasa carbónica (31,000), 5) Inhibidor de tripsina de soya (21,500), 6) Lisozima (14,400. El gel fue teñido con azul brillante de Coomassie.

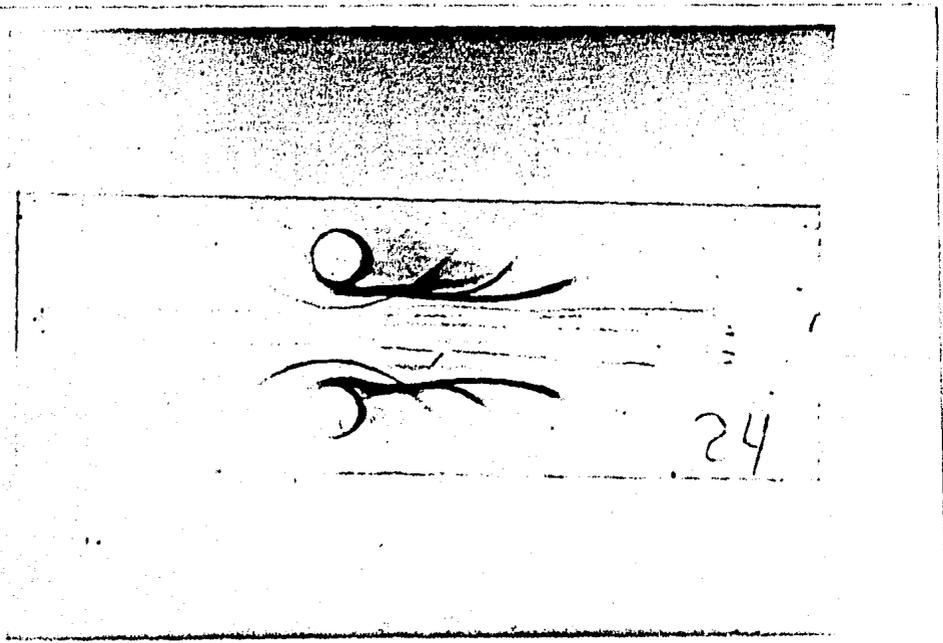


Figura 8. Inmunolectroforesis de ECI (pozo superior) y ECII -- (pozo inferior) frente a un suero hiperinmune de conejo (ver sección IV, 2) aplicado en el canal central.

## 2. Glicoproteínas en las Fracciones ECI y FV, reconocidas por la Con A

Para determinar si las fracciones ECI y FV contenían glicoproteínas con grupos de carbohidratos reconocidos por la Con A (ver apéndice VIII, 5) se probó esta lectina contra cada fracción en un sistema idéntico al de la IEF en el que se adicionó la Con A al canal central. Como se observa en la figura 9, la fracción ECI contenía al menos 2 componentes reconocidos por la Con A; que de acuerdo a su migración electroforética uno era catiónico mientras que el otro era aniónico al pH de 8.6 - en que se llevó a cabo la IEF. En cambio en la LEF de la Con A frente a la fracción FV, se observó una sola banda isoeléctrica (Figura 9).

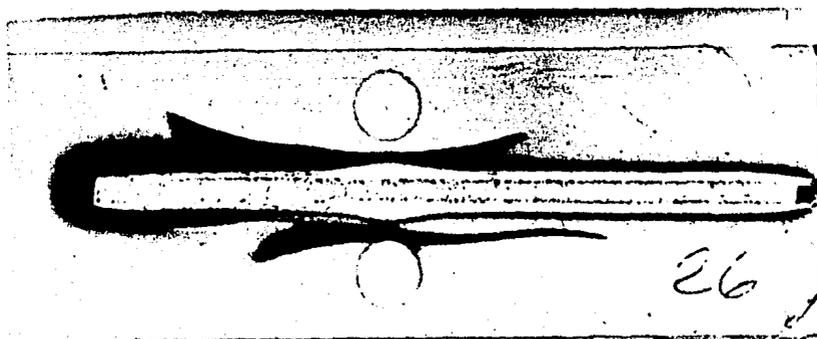


Figura 9. Lectinoelectroforesis de ECI (pozo inferior) y de FV (pozo superior) frente Con A. La precipitación de arcos distintos entre ambas muestras es visualizada en el sistema.

3. Cromatografía de Afinidad de las Fracciones ECI y FV en una Columna de Sefarosa 4B-Con A.

Una vez evidenciada la presencia de glicoproteínas reconocidas por la Con A en las fracciones ECI y FV, se procedió al acoplamiento de la lectina con la sefarosa 4B. Para ello se utilizó una preparación comercial de Con A (ver sección IV, 1) cuyo patrón de bandeo en PAGE-SDS (Figura 11) mostró que el monómero de 27,000 de peso molecular (PM) constituía alrededor del 90% del material. Esto decidió a usar la Con A sin una posterior purificación. El acoplamiento de la Con A a la sefarosa 4B se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en la sección IV, 3. La eficiencia del acoplamiento fue cercana al 80% de tal modo que la columna de 17.5 ml (volumen de cama) de sefarosa 4B contenía cerca de 80 mg de Con A acoplada.

Las figuras 10 a y b muestran los perfiles de elución de las fracciones ECI y FV respectivamente por columnas de sefarosa 4B-Con A. Después de terminar el cargado de las columnas se les aplicaban 45 ml de NaCl 0.5 M con el objeto de remover el material unido inespecíficamente a la columna, aunque en realidad este pulso era con el objeto de eluir el material unido con baja afinidad, cosa que no sucedía. En ambos casos, después de la aplicación de 45 ml de  $\alpha$  mm 0.1 M, se obtuvo un solo pico asimétrico que incluía el material unido con alta afinidad a la Con A. Los tubos colectados del pico eran mezclados y dializados contra PBS, 7.2, para eliminar el exceso de  $\alpha$  mm y concentradas hasta alcanzar una concentración de proteína de 6-7 mg/ml. La fracción obtenida de este modo a partir ECI era denominada Emm y la obtenida de FV era denominada Fmm.

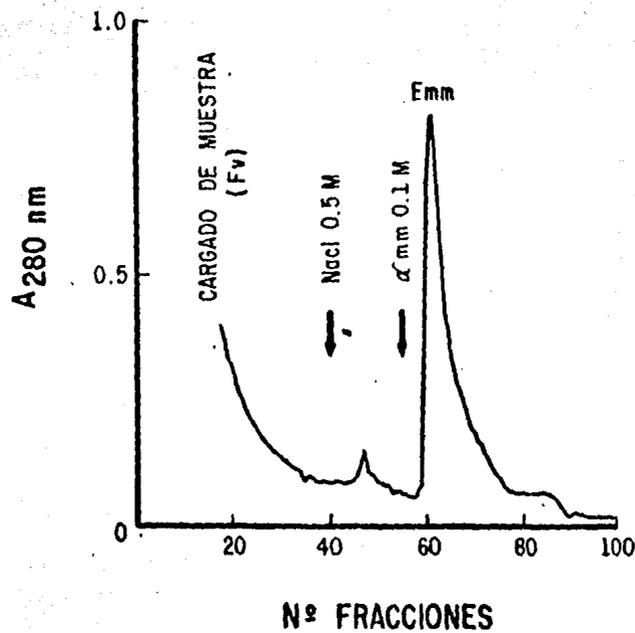
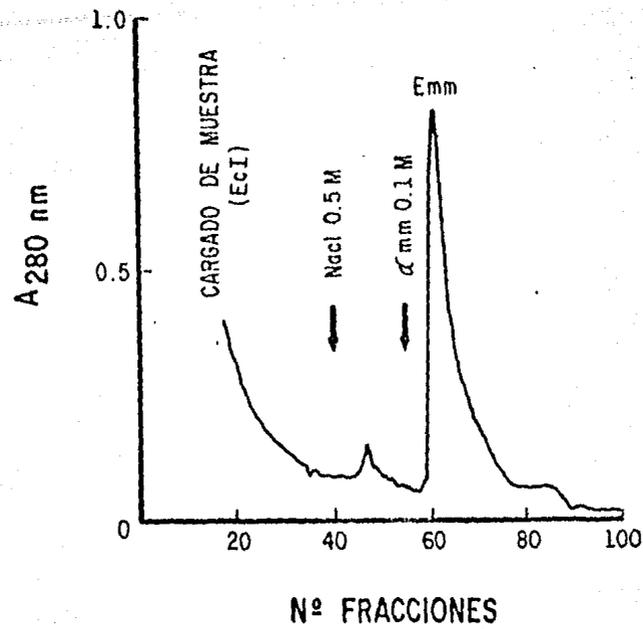


Figura 10. Perfil de elución de ECI (a) y (b) pasados a través de columnas de sefarosa 4B-Con A. La columna fue eluida con un volumen de 45 ml de NaCl 0.5 M (para eluir el material unido con baja afinidad) seguido por un segundo un volumen de 45 ml de  $\alpha$  mM 0.1M -- (para eluir el material unido con alta afinidad), ambos en PBS, pH 7.2. Este último pico fue denomi nado Emm (a) y Fmm (b).

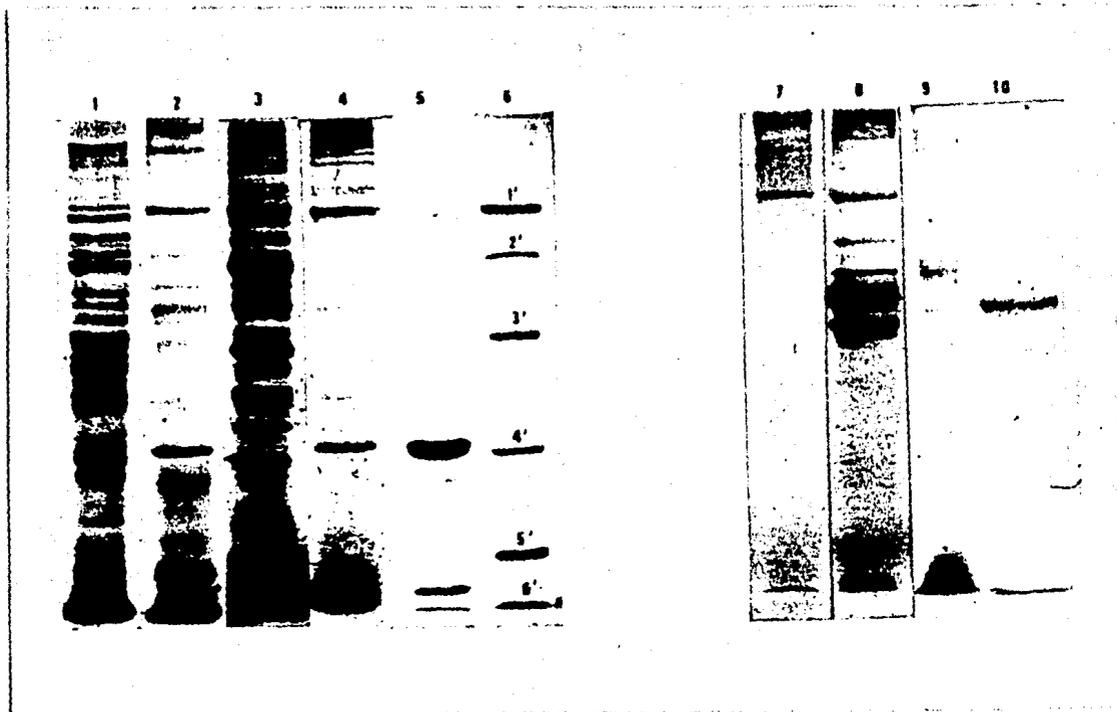


Figura 11. Patrones electroforéticos teñidos con azul brillante de Coomassie (carriles 1-6) y PAS (carriles 7-10) de: ECI (carriles 1 y 7), Emm (carriles 2 y 8), FV (carriles 3 y 9), Fmm (carriles 4 y 10), Con A (carril 5) y estándares globulares de pesos moleculares conocidos (carril 6) (ver leyenda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

El análisis de Emm usando PAGE-SDS teñido para proteínas con azul brillante de Coomassie mostró 22 bandas diferentes (Figura 11), una de las cuales era el frente de la corrida. La tinción para glicoproteínas con ácido periódico Schiff (PAS) mostró 8 bandas con pesos moleculares entre 50,000 a 148,000 (Figura 11). A su vez la fracción Fmm contenía 15 bandas diferentes (incluyendo la banda del frente) de las cuales 3, que se tiñeron para carbohidratos, correspondieron a pesos moleculares de 37,000 a 65,000 (Figura 11).

En la figura 11 también se observa que una de las bandas más prominentes, en cuanto a su tinción con azul brillante de Coomassie, coincidía en su movilidad relativa con el monómero de Con A, asimismo esta banda tenía la propiedad de no teñirse con PAS. Esto hizo surgir la duda de si parte de la Con A acoplada a la sefarosa 4B, se podía desprender de la columna y contaminar las fracciones Emm y Fmm. Para responder esta duda se preparó otra columna de sefarosa 4B-Con A en la cual una cantidad de la Con A acoplada había sido previamente marcada con  $I^{125}$ . Posteriormente una muestra de ECI se sometió a cromatografía a través de la columna de sefarosa 4B-Con A ( $I^{125}$ ). A las fracciones colectadas se les determinó absorbencia a 280 nm y radiactividad en un contador de radiaciones gamma. La figura 12 muestra que la columna de sefarosa 4B-Con A ( $I^{125}$ ) desprende radiactividad desde la etapa de cargado de la columna. El pico mayor de liberación de marca se superpone con el pico eluido al aplicar  $\alpha$  mm 0.1 M. Adicionalmente, la fracción Emm obtenida de la columna radiactiva se sometió a PAGE-SDS (Figura 13) para después de secar el gel preparar una autorradiografía del mismo. La autorradiografía (Figura 13) del PAGE-SDS de -

Emm mostró que la mayor radiactividad se encontraba a la altura de la banda correspondiente al monómero de la Con A, demostrándose que la banda de 27,000 de PM en las fracciones Emm y Fmm se debía a una contaminación por Con A proveniente de la columna de afinidad.

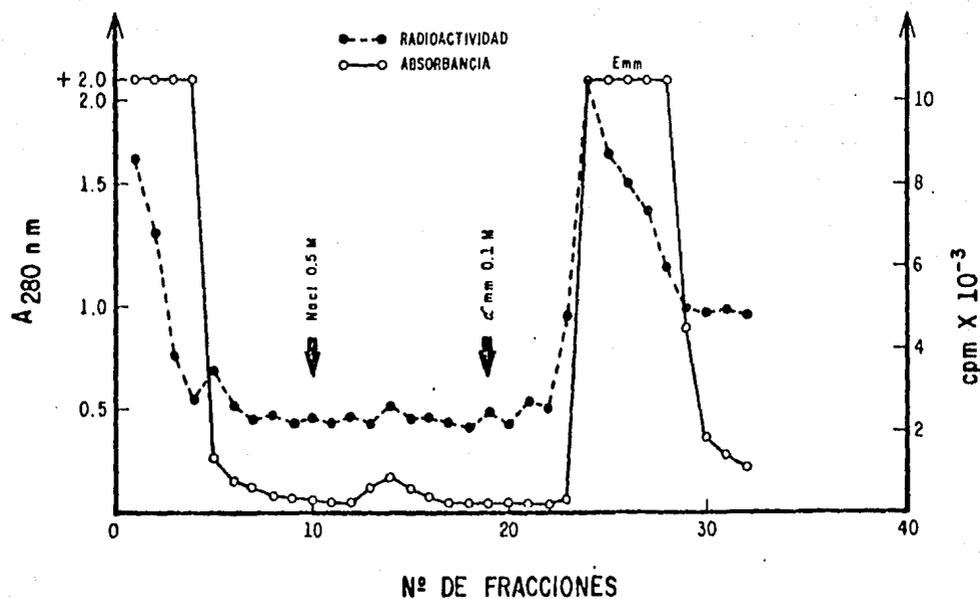


Figura 12. Perfil de elución de ECI pasado a través de una columna de sefarosa 4B-Con A ( $I^{125}$ ). La columna se eluyó con un volumen de 45 ml de NaCl (0.5 M) (para eluir el material unido con baja afinidad) seguido por 45 ml de volumen de  $\alpha$  mm 0.1 M (para eluir el material unido con alta afinidad), ambos en PBS, pH 7.2. Este último pico fue denominado Emm.

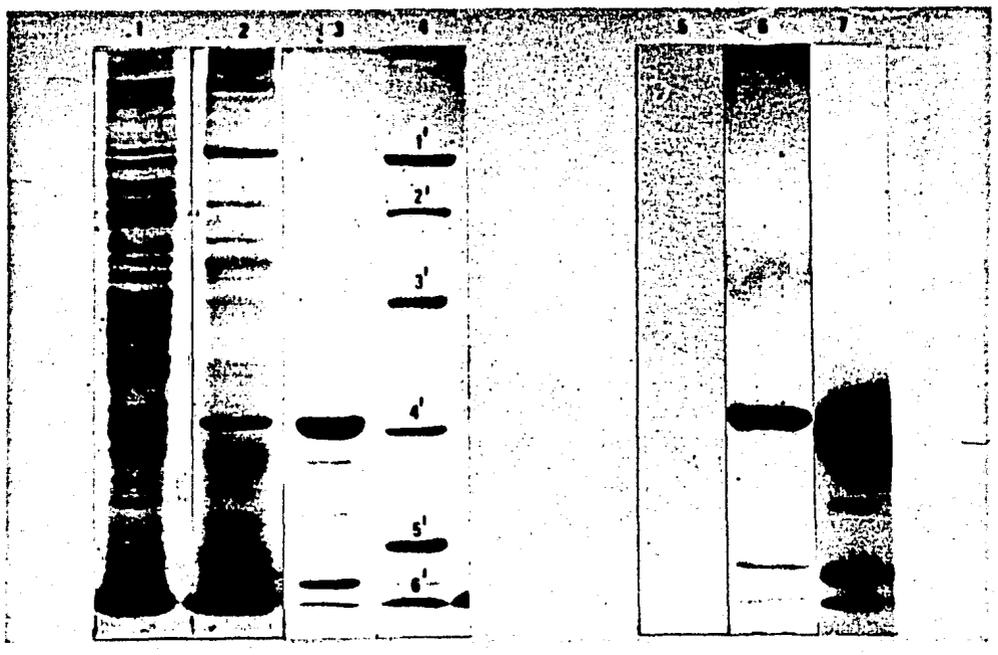


Figura 13. Tinción de Coomassie (izquierda) y autorradiografía (derecha) de PAGE-SDS de las fracciones obtenidas de la columna de sefarosa 4B-Con A ( $I^{125}$ ): ECI (carriles 1 y 5 Emm (carriles 2 y 6), Con A ( $I^{125}$ ) carriles 3 y 7. En el carril 4, se presentan estándares de pesos moleculares conocidos -- (ver leyenda de la Figura 7).

La tabla III resume la composición de proteínas y glicoproteínas de las fracciones Emm y Fmm usando la información obtenida en la figura 11.

Eliminando la banda correspondiente a Con A así como la correspondiente al frente del gel, las fracciones Emm y Fmm contenían respectivamente 20 y 13 proteínas distinguibles de acuerdo a su migración relativa. Asimismo, 2 de las 4 glicoproteínas contenidas en Fmm también aparecieron en Emm.

TABLA III. NUMERO DE BANDAS TEÑIDAS CON AZUL BRILLANTE DE COOMASSIE Y PAS DE LAS FRACCIONES EMM Y FM OBSERVADAS POR PAGE-SDS

Banda	Fracción Emm		Fracción Fmm		Peso Molecular
	Coomassie	Schiff	Coomassie	Schiff	
1	+	+	+		148,000
2			+		138,000
3			+		135,000
4	+	+	+		126,000
5	+		+		123,000
6	+		+		107,000
7	+		+		105,000
8	+	+	+		93,000
9	+	+	+		89,000
10	+				83,000
11	+				79,000
12	+	+			78,000
13	+				71,000
14	+	+	+	+	65,000
15	+	+	+		57,500
16	+				55,000
17	+	+	+	+	50,000
18	+		+	+	37,200
19	+		+		27,000
20	+				26,000
21	+				22,400
22	+				19,000
23	+				16,600
24	+		+		Frente

#### 4. Análisis de los Antígenos Contenidos en las Fracciones Emm y Fmm

La determinación del contenido de antígenos en las fracciones Emm y Fmm fue llevada a cabo por IEF usando 7 sueros de pacientes cisticercosos. Se encontró que en la fracción Emm se reconocían 8 antígenos diferentes. Con respecto a la fracción Fmm fueron también reconocidos 8 antígenos, aunque con una frecuencia de reconocimiento menor por cada suero que en la fracción Fmm (ver Tabla IV). La figura 14, muestra las IEF obtenidas con ambas fracciones contra 2 sueros de pacientes cisticercosos. El número de antígenos reconocidos por cada suero fue variable.

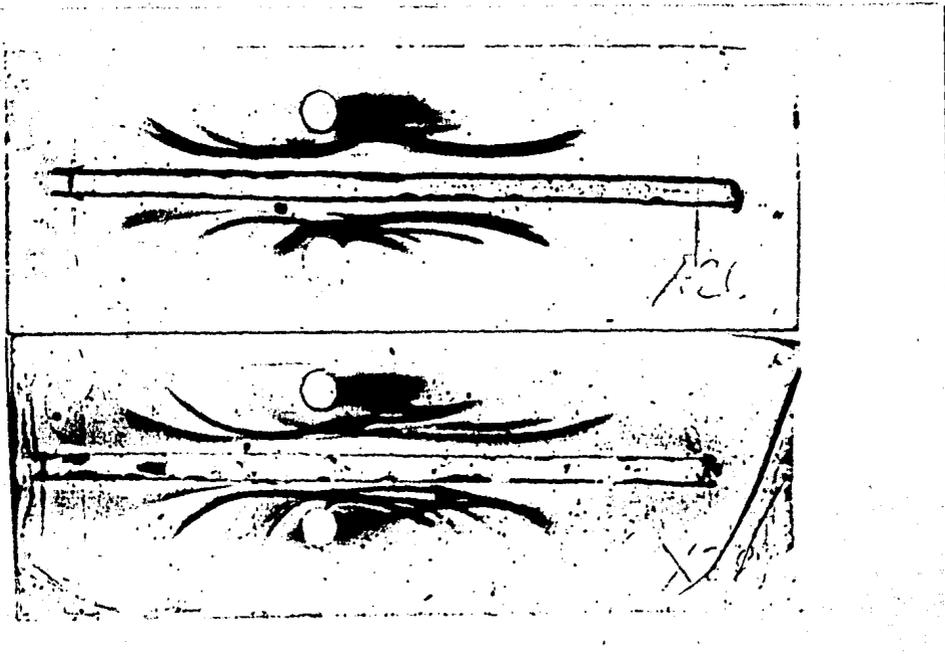


Figura 14. Ejemplos de inmunolectroforesis de 2 sueros humanos contra las fracciones Emm (pozos superiores) y Fmm (pozos inferiores).

TABLA IV. COMPARACION EN LA FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO DE ANTIGENOS POR 7 SUEROS DE PACIENTES CISTICERCOSOS, ASI COMO EL NUMERO DE ANTIGENOS PROMEDIO RECONOCIDOS POR SUERO DE LAS FRACCIONES Emm, Fmm y E+p

Muestra	Sueros							Promedio de bandas reconocidas/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
(+) E+p	7	4	3	4	2	1	1	3.1

(+) Los datos que aparecen en este renglón fueron aportados por A. Plancarte y A. Flisser.

La concentración de proteínas usada para el E+p fue de 15 mg/ml, mientras que para las fracciones Emm y Fmm fue de 6-7 mg/ml.

## 5. Purificación de Glicoproteínas a Partir de la Fracción Emm

Hasta esta etapa del trabajo se sabía que las fracciones Emm y Fmm representaban preparaciones en las que el contenido de glicoproteínas se habían incrementado notablemente. De igual modo, como se describió en la anterior sección ambas fracciones estaban enriquecidas en antígenos reconocidos por sueros de pacientes cisticercosos. Parecía haber correlación entre la riqueza de glicoproteínas y la antigenicidad de la fracción. Lo anterior motivó la decisión de intentar una purificación de algunas de las glicoproteínas. Para ello se eligió la fracción Emm y no la fracción Fmm. Debido a que se sabe que en los fluidos vesiculares de céstodos, se encuentran proteínas del huésped; dentro de las cuales se encuentran glicoproteínas (51,52).

La fracción Emm fue inicialmente cromatografiada a través de una columna de intercambiador iónico DE52 (ver sección IV, 3) y el material unido a la columna fue eluido usando un gradiente discontinuo de 0.1 a 0.5 M de NaCl. La figura 15 muestra el perfil de elución de esta columna, los picos obtenidos de los sucesivos pulsos de sal fueron analizados por PAGE-SDS para conocer su composición de proteínas. Se encontró que todos los picos estaban constituidos por una mezcla compleja de las mismas proteínas (datos no mostrados).

Puesto que la cromatografía de intercambio iónico no produjo la purificación de una de las glicoproteínas de la fracción Emm, se intento una cromatografía en la que se aprovechan las diferencias en peso molecular. Para maximizar la separación se utilizó una columna de sephacryl S-300 con una longitud de 200 cm, un diámetro de 0.9 cm y un flujo de

8 ml/h. De esta cromatografía se obtuvo el perfil de elución presentado en la figura 16, que muestra 4 picos principales a los que se denominó - i picos I, II, III y IV. El primero de los cuales se incluye en el volumen de exclusión de la columna. Las fracciones incluidas en cada pico fueron concentradas, dializadas y su composición proteica determinada por PAGE-SDS. La figura 17 muestra que los picos I, II, III son mezclas complejas de proteínas que incluyen la contaminación de Con A. En cambio el pico - IV además de una banda ligera que se teñía con azul brillante de Coomassie incluyendo Con A, mostraba un importante enriquecimiento de las glicoproteínas de 89,000 y 93,000 de peso molecular.

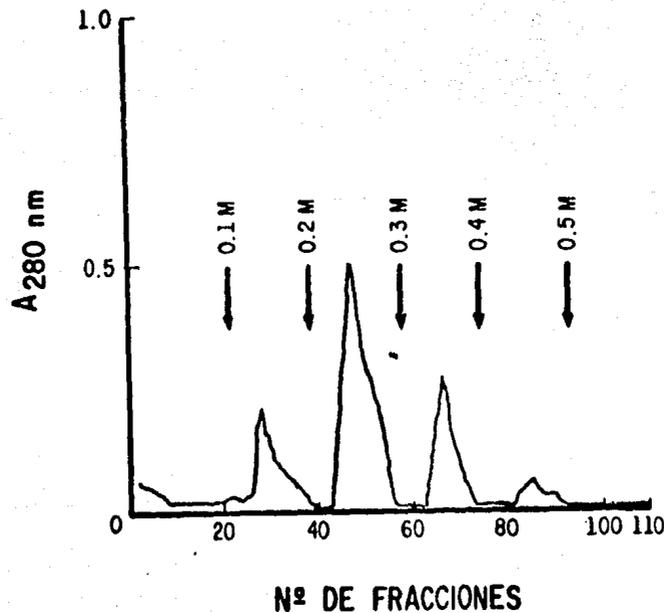


Figura 15. Perfil de elución de Emm pasado a través de una columna de DE52. La proteína unida fue eluida por medio de un gradiente discontinuo de 0.1 - 0.5 M de NaCl.

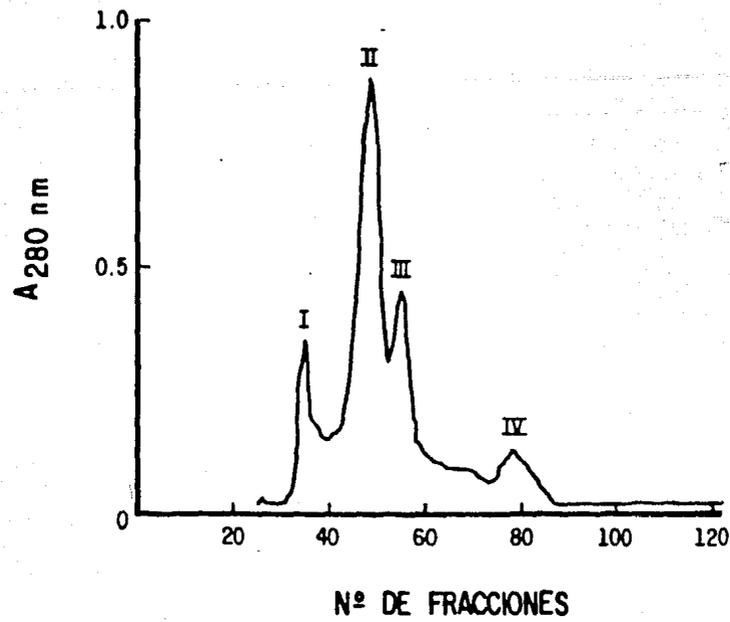


Figura 16. Perfil de elución de la fracción Emm cromatografiada a través de sephacryl S-300, el amortiguador de elución usado fue NaCl 0.5 M.



Figura 17. PAGE-SDS de las fracciones obtenidas durante la filtración de Emm a través de sephacryl S-300, teñidos con azul brillante de Coomassie (carriles 1-5) y PAS (carriles 6-9). Pico I (carriles 1 y 6), pico II (carriles 2 y 7), pico III (carriles 3 y 8), pico IV (carriles 4 y 9) y estándares globulares de pesos moleculares conocidos (carril 5) (ver leyenda de la Figura 7).

Para determinar la composición antigénica de estos picos se probaron en IEF con 7 sueros de pacientes cisticercosos. Debido a las limitaciones en la cantidad disponible de cada suero, solo se analizaron los picos I y IV. En las IEF del pico I se identificaron 7 antígenos, mientras que en el pico IV solo se identificaron 2 antígenos (Figura 18).

A pesar de que los sueros de pacientes no reconocieron al antígeno B en el pico IV, la posibilidad de que las glicoproteínas de alto PM fueran fragmentos de este antígeno no se podía excluir. Para descartarla se probó el pico IV y IEF contra un suero hiperinmune de conejo con una única y bien caracterizada actividad anti-B (53). La figura 19 muestra las IEF con el suero hiperinmune anti-B, no se formó la banda característica de precipitación de este antígeno en los pozos llena dos con el pico IV. En cambio, el suero formó la típica banda isoeléctri ca de precipitación frente al pico I (Figura 19). Estos resultados fueron confirmados por DID enfrentando el suero anti-B con los picos I y IV (Figura 20).



Figura 18. Inmunoelectroforesis del pico I (pozo inferior) y del pico IV (pozo superior) frente a 2 sueros de pacientes cisticercosos (canal central).



Figura 19. Inmunoelectroforesis de los picos I (pozo superior) y IV (pozo inferior), frente a un suero hiperinmune anti-B de conejo en el canal central.

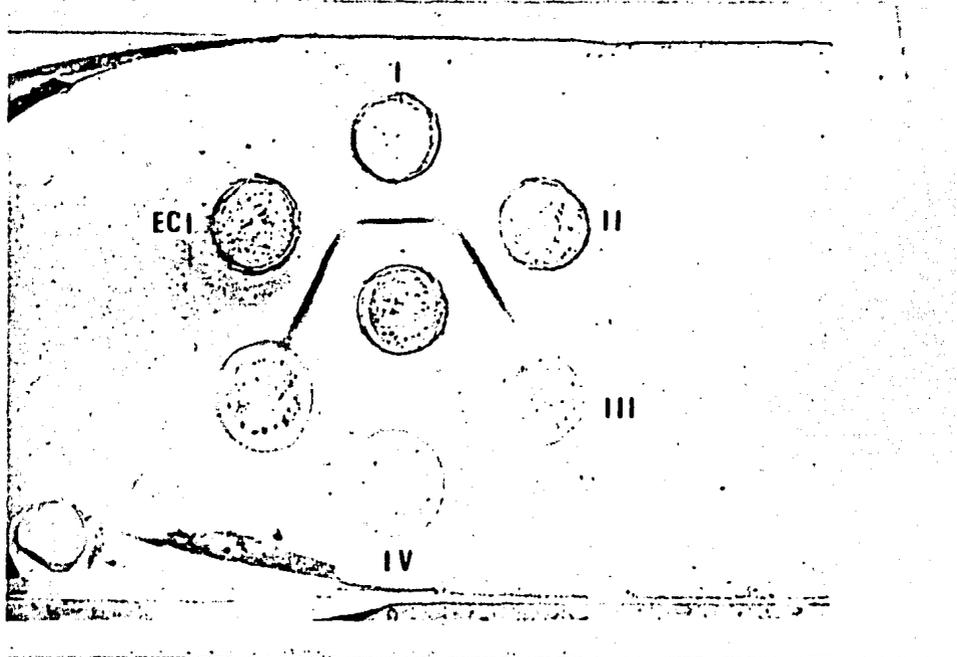


Figura 20. Doble inmunodifusión de ECI y los picos I, II, III, IV, frente a un suero hiperinmune anti-B de conejo (pozo central).

## VI. DISCUSION

Para la selección del método que mejor solubilizara el material proteico del cisticerco, se compararon los 2 métodos que se han venido usando por su probada eficacia. Los resultados de ambos procedimientos con respecto a la cantidad de proteína total extraída fueron prácticamente iguales (Tabla II y Figura 6). Asimismo, la composición de proteínas (Figura 7) y de antígenos (Figura 8) en los extractos crudos obtenidos por los 2 métodos fue también idéntica. Por lo tanto la decisión de usar el extracto obtenido con NaCl 0.45 M (ECI) en lugar del obtenido con KCl 3M (ECII), se tomó entonces por razones de importancia secundaria: 1) la concentración de proteína que se obtenía en ECI era alrededor de un 30% mayor que en ECII (Tabla II), 2) El menor consumo y costo de la sal usada.

En lo que se refiere a la relación VME/gth elegida, esta fue de 6-8 puesto que en el ECI se obtenía una concentración de 4-6 mg/ml que es adecuada para una variedad de ensayos (Tabla II).

Si consideramos que un gramo de tejido húmedo de cisticercos está compuesto en casi un 80% de agua (67) y que el restante 20% corresponde en un 50% a proteínas (68), el método seleccionado solubiliza alrededor del 30% de las proteínas presentes en la larva lo cual es un rendimiento muy razonable.

Con respecto al tipo de proteínas extraídas, puesto que el medio de extracción no contiene ningún agente que destruya estructura de membrana (detergente, solvente orgánico, etc.), parece razonable esperar

que pertenezcan al grupo de las proteínas solubles. Considerando específicamente el caso de las glicoproteínas, cabría esperar la extracción de glicoproteínas extrínsecas de superficie y de secreción (ver sección III, 10). Esto es importante puesto que indica como muy posible que las glicoproteínas intrínsecas de membrana no se encuentran representadas en la fracción ECI. A pesar de lo anterior se decidió no utilizar detergentes puesto que en ensayos realizados se encontró que detergentes no iónicos (triton X-100) producían un desprendimiento mayor de la Con A unida a la columna e impedían la unión de las glicoproteínas a Con A.

En cambio, con respecto al procedimiento usado en la obtención de una fracción del fluido vesicular, se puede afirmar que en FV se encontraban representadas prácticamente todas las proteínas del fluido. La composición proteica del FV aunque coincidió en algunas proteínas con la fracción ECI, resultó diferente en la mayor parte de ellas.

Esto concuerda con el hallazgo de que muchas de las proteínas presentes en fluidos vesiculares de taenidos tisulares no son de origen parásito, sino que estas las obtiene del suero o líquido intersticial del huésped (51,52).

La Con A fue seleccionada como herramienta para el aislamiento de glicoproteínas del cisticerco de la T. solium por su amplia especificidad en el reconocimiento de grupos carbohidratos; ha sido bien caracterizado que la Con A reconoce grupos  $\alpha$ -D-metil manósido y  $\alpha$ -D-metil glucósido, así como  $\alpha$  y  $\beta$ -D-arabino-furanósidos y  $\alpha$  y  $\beta$ -D-metil-fructofuranósido (55). Estos grupos son muy comunes en casi todas las glicoproteínas

de origen animal mientras que aparecen poco frecuentemente en los glicolípidos (55).

Las fracciones Emm y Fmm obtenidas de la cromatografía por la columna de sefarosa 4B-Con A, mostraron un enriquecimiento en las glicoproteínas contenidas con respecto a sus fracciones de origen ECI y FV (Figura 11). Sin embargo a juzgar por la diferencia en el número de bandas teñidas por azul brillante de Coomassie y por PAS en los PAGE-SDS de las fracciones, sólo una parte de las proteínas totales eran glicoproteínas; en la fracción Fmm 3 de 15 bandas se tiñeron con PAS mientras que en Emm fueron 8 de 22 (Tabla III). Cabe hacer notar que de las 3 glicoproteínas contenidas en la fracción Emm (Tabla III), ésto sugiere que se trata de una glicoproteína del fluido vesicular o bien del huésped que se encuentra en la bolsa vesicular.

Como se mencionó anteriormente (ver sección II, 10), el aislamiento de glicoproteínas parasitarias tenía como segundo objetivo el aislamiento de antígenos del cisticerco. Este segundo objetivo es potencialmente más relevante por sus posibles aplicaciones en el inmunodiagnóstico de la enfermedad, que el interés básico en la caracterización de las glicoproteínas parasitarias. Como era de esperar, la fracción Emm enriquecida en glicoproteínas también estaba enriquecida de antígenos. Esto fue demostrado al comparar el número de antígenos que cada suero de pacientes reconocían cuando eran probados por IEF en contra del E+P con el obtenido en contra de Emm (Tabla IV). Parece casi seguro que el uso de esta fracción en los métodos actuales de inmunodiagnóstico (IEF y ELISA) puede mejorar el porcentaje de pacientes cisticercosos detectados.

La fracción Fmm ha sido mantenida al margen en esta parte de la discusión solamente debido a la carencia de los datos correspondientes en la literatura, para hacer una comparación equivalente.

La utilidad potencial de Emm en el mejoramiento de los actuales métodos de inmunodiagnóstico, no es sin embargo la única característica que le confiere interés a esta fracción. Al igual que Fmm, la fracción Emm representa una mezcla menos compleja de componentes que sus respectivos extractos de origen (FV y ECI). Esto hace a ambas fracciones atractivas para intentar a partir de ellas la purificación total de algún antígeno. Al respecto, en la presente tesis, se realizó un corto intento para determinar si la utilización de Emm permitía la obtención de fracciones enriquecidas en algún antígeno. Los resultados fueron alentadores puesto que a través del uso de una columna de sefacril S-300 se consiguió una fracción llamada pico IV que estaba formada por 2 glicoproteínas principalmente y contaminada por Con A (Figura 17). Este pico IV en un sistema de IEF contra 7 sueros de pacientes cisticercosos, demostró la presencia de 2 antígenos; uno catiónico y otro aniónico (Figura 18). El antígeno aniónico fue reconocido por 6/7 sueros mientras que el antígeno catiónico fue reconocido por 4/7 (Figura 18). Actualmente se hacen esfuerzos para determinar a qué bandas de la fracción pico IV corresponden estos antígenos. La disponibilidad de alguno de estos antígenos o de ambos en forma pura, seguramente permitirá como en el caso de antígeno B, nuevos acercamientos para entender su participación en la relación huésped-parásito.

Un aspecto de los problemas parasitarios en el que la investigación inmunológica esta haciendo las aportaciones más relevantes es sin

lugar a dudas en el inmunodiagnóstico (69,70). En el caso de la cisticercosis humana, se han utilizado prácticamente todos los métodos de inmunodiagnóstico reportados (24,26,32,33,71,72) incluyendo al ELISA (73). La falta de sensibilidad y/o especificidad ha sido adjudicada además de al límite propio de cada método usado (32), a la existencia de pacientes no respondedores inmunológicamente (24) y al uso de preparaciones antigénicas no representativas (74). Considerando solamente la última alternativa, se ha dicho que el uso de extractos crudos bien puede explicar la falta de sensibilidad y/o especificidad de los métodos. Puesto que podría ocurrir que los antígenos prominentes, no se encuentren adecuadamente representados en el extracto (75) por razones variadas, entre ellas su solubilidad.

Por otro lado, el uso de un sólo antígeno puro no es probable que mejore grandemente la confiabilidad del método. En este sentido cabe mencionar el ejemplo de las pruebas de ELISA que utilizan alternativamente, muestras de antígeno B puro o de un extracto crudo del cisticerco: La sensibilidad obtenida con el antígeno B es de 75% (73) mientras que la obtenida con el extracto crudo es de 85% (73). Por todo lo anterior, se ha recomendado el uso de mezclas de varios antígenos purificados (76) con la idea en mente de que sólo de este modo se conseguirá detectar la presencia de anticuerpos en prácticamente todos los pacientes respondedores.

Desde este punto de vista, la fracción pico IV (constituída casi en su totalidad por 2 glicoproteínas antigénicas) parece un buen candidato para determinar si usada en mezcla con el antígeno B puro, aumenta su sensibilidad.

El trabajo descrito aquí es uno de los primeros intentos en el que directamente se pretende caracterizar el contenido de glicoproteínas de algún taenido. Creemos que en las fracciones Emm y Fmm estan representadas las más importantes glicoproteínas del cisticerco, algunas de las cuales son reconocidas como antígenos por sueros de pacientes cisticercosos. El uso de lectinas en el aislamiento por afinidad de glicoproteínas antigénicas del parásito parece ser de gran utilidad en este tipo de estudios. En particular, los estudios tendientes a determinar la localización de cada especie de glicoproteínas en el tejido del cisticerco, contribuirían grandemente al entendimiento de su participación en esta y otras relaciones huésped-parásito.

## VII. APENDICES

### 1. Clasificación del parásito (2):

Phylum : Platyhelminthes

Clase : Cestoda

Orden : Cyclophyllidea

Familia: Taeniidae

Género : Taenia

Especie: solium

### 2. Mecanismos posibles para la adquisición de cisticercosis en el humano:

- Heteroinfección: método más común para contraer la enfermedad y es debido a la ingestión de huevecillos de Taenia solium a través de agua y/o alimentos contaminados.

- Autoinfección externa: Cuando los huevos son transportados del ano a la boca en el mismo individuo infectado con T. solium.

- Autoinfección interna: caso en el que por peristalsis reversa, los los huevos de T. solium llegan al estómago y regresan al intestino delgado, resultando en una infección masiva. Sin embargo, este mecanismo no ha sido bien demostrado (67).

### 3. Glicoproteínas de superficie en céstodos:

El límite externo de los céstodos es una membrana plasmática cuya superficie externa presenta un importante glicocálix constituido por glicoproteínas y glicolípidos.

Se ha demostrado la presencia de carbohidratos en la superficie de los céstodos Taenia crassiceps y cisticerco de la Taenia solium (44,77) por medio de tinciones tales como (PAS), periodato-tiocarbohidrazida de osmio (78), subnitrato alcalino de bismuto (78), rojo de rutenio (30,79) y con lectinas como Con A conjugada con ferritina o peroxidasa, así como autorradiografía de cortes del parásito previamente tratados con lectinas radiactivas (Con A I<sup>125</sup>) (44).

Los carbohidratos de superficie son confirmados al tratar la superficie con enzimas específicas para carbohidratos por ejemplo la incubación de Hymenolepis diminuta con neuraminidasa, libera ácido siálico identificable por métodos químicos (78). Este carbohidrato también ha sido detectado en análisis de membranas tegumentales aisladas (42).

Los análisis bioquímicos de la membrana del cisticerco de la T. hydatigena (80) han revelado que los polisacáridos del tegumento contienen glucosa, glucosamina, galactosamina y 14 aminoácidos. La cantidad de carbohidratos de la superficie del cisticerco de la Taenia solium disminuyen notablemente por el tratamiento con glucosidasa (30). En estudios recientes se ha logrado obtener tegumentos aislados de Hymenolepis diminuta, los que por estudios bioquímicos de membrana revelaron una composición de 24 proteínas, 6 de las cuales son glicoproteínas y que se encuentran localizadas externamente en la membrana tegumental (81). También existe evidencia de que al menos parte de estos carbohidratos de superficie, se encuentran asociados a proteínas ya que el tratamiento de los cisticercos de Taenia solium con tripsina eliminan una gran parte del glicocálix (30).

Sin embargo hay poca información sobre el tipo de moléculas específicas que aparecen en el glicocáliz y de la función que estas 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 adsorción de una gran variedad de nutrientes transportados por acarreadores móviles. Esta inhibición no parece ser debida a una barrera de permeabilidad impuesta por la capa de Con A adsorbida, puesto que la entrada de nutrientes por difusión libre no es afectada por la lectina (82). Se ha sugerido que la unión de Con A proximal a sitios de transporte específico produce la inmovilización de constituyentes móviles en la membrana, los cuales están involucrados en la translocación de hexosas, pirimidinas y ciertos aminoácidos. Asimismo la florizina interactúa específicamente con el locus de transporte de glucosa ejerciendo este mismo efecto en la superficie del tegumento de otros céstodos (83).

Micrografías de alta resolución de la superficie de los céstodos indican que los filamentos del glicocáliz están adheridos a la membrana (79). La superficie de estos parásitos presenta una cubierta filamentosa uniforme y no se altera por lavado con EDTA y otros agentes los cuales pueden separar material debilmente unido (42). Esto es un argumento en favor de que al menos parte de tales cubiertas son componentes integrales y no estructuras o moléculas adsorbidas a la membrana.

Con respecto a la síntesis e incorporación de los carbohidratos a la superficie, estudios en los que adultos de H. diminuta y L. tenuis han sido incubados con hexosas tritiadas, han mostrado la incorporación de marca a la fracción proteica asociada con la estructura membranal.

Autorradiografías en cortes del parásito muestran que la mayor incorporación de la radiohexosa ocurrió dentro de las vesículas en las células subtegumentales que son transportadas al tegumento incluyendo al borde en cepillo (42).

#### 4. Glicoproteínas del Fluido Vesicular de Céstodos Larvarios

Los parásitos taenidos no sólo interactúan con su huésped por medio de moléculas constituyentes de la membrana externa, sino también por medio de moléculas del fluido vesicular que son expulsadas a la interfase huésped-parásito.

Estudios del fluido vesicular de metacéstodos, han demostrado el importante papel que juegan algunos de sus componentes en la relación huésped-parásito: a) Factores presentes en el fluido vesicular del quiste hidatídico producen una depleción del complemento a través de una activación por vía alterna, b) sustancias análogas a las anafilotoxinas contribuyen a la patogenia del síndrome de shock anafiláctico en pacientes con hidatidosis (50).

Con respecto al origen de los componentes se ha mostrado que en el líquido del quiste hidatídico existen algunas proteínas del huésped (51,52). Asimismo, se sabe que los metacéstodos son capaces de absorber in vitro e in vivo una gran variedad de moléculas del huésped (inmunoglobulinas, albúmina, etc.) sin que sufran cambios estructurales ni funcionales (51). Se cree que las moléculas que entran al fluido vesicular pueden cumplir funciones importantes en el control osmótico o aprovisionamiento de nutrientes del parásito, aunque también pudieran cumplir una función

evasora de la respuesta inmune mediada por anticuerpos debido a la internalización de estos (51).

Se ha descrito que en el fluido hidatídico de oveja existen 19 proteínas de las cuales 9 son tomadas del huésped. Entre los componentes del parásito existen 4 arcos de precipitación denominados 1, 2, 4 y 8 que son positivos a la tinción de PAS, indicando su naturaleza glicoproteica. Presumiblemente la glicoproteína arco 4 es de especial interés por ser un componente fuertemente antigénico reconocido por todos los sueros de pacientes humanos con hidatidosis. Con respecto a los componentes del huésped 4 proteínas se tiñeron con PAS mientras que las  $\gamma$ -globulinas que son glicoproteínas no resultaron teñidas (52).

Por medio de una cromatografía de afinidad en la que se utilizo. Con A 2 glicoproteínas se logran aislar del fluido hidatídico de oveja, las cuales se denominaron arcos 4 y 5. Estas proteínas purificadas son los antígenos más inmunorreactivos con sueros de pacientes con hidatidosis (84).

## 5. Lectinas

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas de origen principalmente vegetal que aglutinan y/o precipitan glicoconjugados, incluyendo células enteras. Presentan además las siguientes características:

- a). Una molécula de lectina contiene al menos 2 sitios de unión para azúcares.

- b) La especificidad de una lectina es generalmente definida en términos de los monosacáridos o simples oligosacáridos que inhiben la reacción de aglutinación que éstas inducen (Tabla V).
- c) Aglutinan células y partículas siendo de origen no inmune. Las lectinas fueron descubiertas en plantas de donde se encuentran ampliamente distribuidas, pero también aparecen en otros organismos de la escala filogenética. Pueden ser solubles en fluidos biológicos o pueden estar unidas a membranas (85,86).

La unión azúcar-lectina es análoga en muchos aspectos a un sistema antígeno- anticuerpo, en el cual la lectina desarrolla el papel del anticuerpo y el azúcar, el del antígeno. En ambos sistemas se forma un precipitado que se suele disolver cuando se añade un exceso de cualquiera de los componentes. Asimismo, la inhibición que ejercen los azúcares específicos sobre la formación de un precipitado entre la lectina y su azúcar, es análoga a la reacción de los haptenos en la formación de complejo antígeno-anticuerpo(85)..

Con A fué seleccionada para este trabajo porque es una de las lectinas más estudiadas, sabiendo mucho acerca de sus propiedades fisicoquímicas y de su utilización como herramienta en la purificación de glicoproteína y glicopeptidos. La Con A es una molécula polímera compuesta de 4 subunidades idénticas, con PM de 27,000 cada una, cuyo grado de asociación depende del pH del medio. .

TABLA V. ALGUNAS LECTINAS CONOCIDAS, ASI COMO LOS AZUCARES CON LOS QUE INTERACTUAN ESPECIFICAMENTE (85)

<u>Lectina</u>	<u>Abreviatura</u>	<u>Azúcar específico</u>
Aglutinina de frijol de soya	PHA	Acetil-galactosamina, galactosa.
Aglutinina de cacahuete		Acetil-galactosamina, galactosa
Aglutinina de Lotus tetragonolobus		Fucosa
Aglutinina de Haba de lima		N-acetil galactosamina
Aglutinina de trigo	WGA	N-acetil glucosamina
Aglutinina de Canavalia ensiformis	Con A	$\alpha$ -metil manósido y $\alpha$ -metil glucósido

Propiedades de Con A:

- Con A no contiene carbohidratos, ni uniones por puentes disulfuro en su molécula, pero contiene 3% de material lípidico.
- La Con A une iones de metales divalentes en 2 diferentes sitios de su molécula, denominados S1 y S2. El primero une metales de transición como Mn, Ni, Co, mientras que el segundo une preferentemente Ca. Estudios de dicroísmo circular y resonancia paramagnética electrónica, han mostrado que el sitio de unión con el carbohidrato es distinto a los sitios S1 y S2. Sin embargo, la ausencia de metales en la molécula inactiva el sitio de unión para carbohidratos.
- Efecto del pH: El pH de máxima actividad el cual involucra las reacciones de aglutinación y precipitación es entre 6-7, este mis

- rango de pH favorece la existencia de la forma tetramérica. A pHs 2 - 5.5 se encuentra la forma de dímero que retiene su habilidad para interactuar con derivados sacáridos.
- Efecto de temperatura: A bajas temperaturas 0-4°C se favorece la formación del dímero, mientras que a altas temperaturas 20 - 37°C se favorece la forma tetramérica. Cabe mencionar que a temperaturas de 30 - 50°C se causa la disociación de los complejos glicoproteína Con A.
  - Efecto de sales: Una fuerza iónica de al menos 0.3 es necesaria para estabilizar la molécula. Con esta fuerza iónica predomina la formación de dímeros mientras que a mayores fuerzas iónicas se favorece la formación del tetrámero. Asimismo, concentraciones de NaCl tan altas como 3.75 M no tienen efecto en la habilidad de Con A para precipitar dextranas cuando el sistema es amortiguado a un pH de 7.0 con fosfatos.
  - Efecto de compuestos desnaturizantes: La actividad de Con A es abatida por concentraciones de urea y guanidina, menores que las requeridas para la disociación de las subunidades. Estos compuestos producen cambios drásticos e irreversibles en su conformación. La conformación de Con A no es apreciablemente afectada por concentraciones de SDS de 0.65 g/g de proteína.
  - Sacáridos que interactúan con Con A: Monosacáridos específicos como  $\alpha$ -D-glucosa y en especial  $\alpha$ -D-manosa son potentes inhibidores de la actividad biológica de Con A, mientras que otros como galactosa no lo hacen.

La unión del residuo parece interactuar con la proteína a través de puentes de hidrógeno que involucran al oxígeno anómero y a los grupos OH de los carbonos C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> y C<sub>6</sub>. Los α-anómeros se unen más fuertemente que los β-anómeros. Un grupo OH axial en C<sub>2</sub> permite una más favorable interacción que un grupo ecuatorial en la misma posición en el monosacárido. Grupos OH ecuatoriales en C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub> y un grupo CH<sub>2</sub>-OH no modificado en C<sub>6</sub> son estrictamente requeridos en la unión (Figura 19).

Algunos azúcares furanoides pueden unirse a Con A debido a las características comunes que comparten con las α-D-hexopiranosas antes mencionadas. La disposición de los grupos OH en C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub> de los D-arabinofuranosil y de los grupos C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> y C<sub>5</sub> de los D-arabinosil. Por esta razón los α y β-D-arabinofuranosas también pueden unirse a Con A (55).

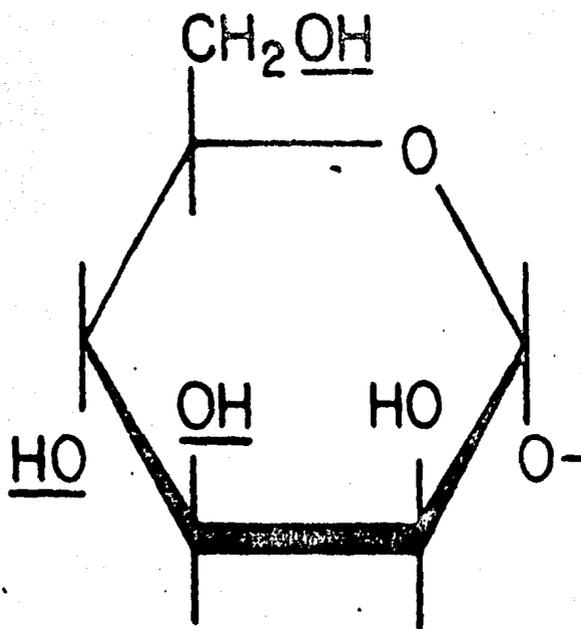


Figura 21. Estructura de un residuo de α-D-manopiranosil. Los grupos hidroxilo los cuales son esenciales para la unión a la Con A, se encuentran subrayados (55).

## VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Hird, W. D. and Pullen, M. M. Tapeworms, meat and man: A brief review and update of Cysticercosis caused by Taenia saginata and Taenia solium. J. of Food Protection. 42 (1): 58, 1979.
2. Zaman Vigar. II. Helminths (Céstodes). En: Atlas of parasitology. Adis Press Australia. Pag. 131, 1979.
3. Brown Harold M. Larvas de Céstodos extraintestinales del hombre. En: Parasitología clínica. Ed. Interamericana, pág. 175, 1977.
4. López Cruz O. Larvas de Céstodos extraintestinales del hombre. En: Parasitología. Ed. Francisco Méndez Otero, México. pág. 261, 1980.
5. Schmidt, G. D. and Roberts, S. L. Tapeworms of particular importance to humans. En: Foundations Parasitology. The C. V. Mosby Company, pág. 354, 1977.
6. Slais, J. The morphology and patogenecity of the bladder worms Cysticercus cellulosae and Cysticercus bovis. Academia (Publishing house the Czechoslovak Academy of Sciences) Prague, pág. 144, 1970.
7. Sealy, M. A. Respuesta inmune a antígenos de Cysticercus cellulosae. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Biomédicas; U.N.A.M., México, 1980.
8. Villaseñor, C. Algunos datos para la histopatología de la cisticercosis del encéfalo. Bol. Estud. Med. Biol. 1: 89, 1942.
9. Macías, V. and Maqueo, M. Cisticercosis cerebral. Rev. Invest. Clin. 10: 443, 1958.
10. Albores-Saavedra, J. and Altamirano-Dimas, M. Algunas consideraciones sobre 9,412 autopsias realizadas en el Hospital General de México. Gac. Med. Mex. 102: 193, 1971.

11. Martínez Romero, H., Martínez Murray, R., Boisselier Perea, E., and Martínez Duhart, E. Cisticercosis cerebral humana. *Cirugía y Cirujanos*, 43: 507, 1975.
12. Flores Barroeta, F., Aguirre García, J., Fernández Diez, J., Jurado Mendoza, J. y Velasco Avilés. La utilidad de los estudios post-mortem. *Patología* 13: 17, 1975.
13. Macías Sánchez, R., Rodríguez Trujillo, F. y Ordóñez Martínez, S. Cisticercosis cerebral: Anatomía patológica y correlación anatomoclínica. *Neurol. Neurocir. Psiquiatr.* 11: 271, 1970.
14. 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 General de México 1943-1968. *Gac. Med. Mex.* 102: 216, 1971.
15. López Hernández, A. y Cedillo Chimal. Cisticercosis intracraneana en los niños. Análisis de 48 casos. *Rev. Mex. Pediatr.* 45: 277, 1976.
16. Pérez Tamayo, R. y Flores, B. F. Datos generales de 2202 autopsias. *Prensa Med. Mex.* 24: 117, 1959.
17. Briceño, C. E., Biagi, F. y Martínez, B. Cisticercosis. Observaciones sobre 97 casos de autopsia. *Prensa Med. Mex.* 26: 193, 1961.
18. Márquez Monter, H. y Austria, B. Cisticercosis en el Hospital General de México, estudio anatomopatológico de 155 casos. *Rev. Lat. Am. Patol.* 8: 79, 1969.
19. Ridaura Sanz, C. y López Corella, E. Análisis de la mortalidad en el Hospital General de México, S.S.A. Observaciones de once años. *Rev. Med. Hosp. Gen. (Mex.)* 51: 259, 1968.
20. Rabiela, M. T., Lombardo-Rivera, L. y Flores-Barroeta, F. Cisticercosis cerebral. Análisis de 68 casos de autopsias. *Patología*, 10; 27, 1972.

21. Flores-Barroeta, F. y Velasco-Avilés, F. Hallazgos en el Hospital General, Centro Médico Nacional. Gac. Med. Mex. 102: 208, 1971.
22. Flisser, A. The immunology of human Cysticercosis. En: Molecules, cells and parasites in immunology. Eds. C. Larralde, K. Willms, L. Ortiz y M. Sela. Academic Press, New York; pág. 125, 1980.
23. Woodhouse, E. Seroepidemiología de la cisticercosis humana en la República Mexicana. Tesis de la Facultad de Ciencias, U.N.A.M., México, 1979.
24. Flisser, A., Woodhouse, E. and Larralde, C. Human Cysticercosis antigens, antibodies and non-responders. Clin. Exp. Immunol. 39: 27, 1980.
25. Flisser, A., Bulnes, I., Diaz, M.L., Luna, R., Woodhouse, E., Beltran F., Martínez, I. and Larralde, C. Estudios seroepidemiológicos de la cisticercosis humana en poblaciones predominantemente indígenas y rurales del estado de Chiapas. Arch. Invest. Med. (Mex.) 7: 107, 1976.
26. Goldsmith, R. S., Kagan, I. G., Reyes-González, M. A. y Cedeño, Ferreira, J. Estudios seroepidemiológicos realizados en Oaxaca, México. I. Encuesta de anticuerpos parasitarios mediante la prueba de hemaglutinación indirecta. Bol. Of. Sanit. Panam. 71: 500, 1971.
27. Willms, K. and Arcos, L. Taenia solium: Host serum proteins on the cysticercus surface identified by an ultrastructural immunoenzyme technique. Exp. Parasitol. 43: 396, 1977.
28. Correa, B. D. Elementos del sistema inmunológico en la superficie de cisticercos extirpados del ser humano. Tesis. Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., México, 1982.
29. Willms, K., Merchant, M. T., Diaz, S. and Arcos, L. Host-Parasite interface in the metacestode of Taenia solium En: Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives. Eds. A. Flisser, K. Willms, J. P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltran. Academic Press, New York; 397, 1982.

30. Willms, K., Merchant, M. T., Arcos, L., Sealey, M. and Diaz, S. Immunopathology of Cysticercosis. En: *Molecules, Cells and Parasites in Immunology*. Eds. C. Larralde, K. Willms, L. Ortiz, y M. Sela. Academic Press, New York, pág. 145, 1980.
31. Rodríguez-Carbajal, J. and Boleaga-Duran, B. Neuroradiology of human cysticercosis. En: *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Eds. A. Flisser, K. Willms, J. P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltran. Academic Press, New York, pág. 139, 1982.
32. Flisser, A., Pérez-Montfort, R. and Larralde, C. The immunology of human and animal cysticercosis a review. *Bull. W. H. O.* 57: 839, 1979.
33. Nieto, D. Cysticercosis of the nervous system. Diagnosis by means of the spinal fluid complement fixation test. *Neurology (Minneap.)* 6: 725, 1956.
34. Groll, E. W. Chemotherapy of human cysticercosis with praziquantel. En: *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Eds. A. Flisser, K. Willms, J. P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltrán. Academic Press, New York; pág. 207, 1982.
35. Spina-Fraica, A., Nobrega, J. P., Liurmento, J. A. and Machado, L. R. Administration of praziquantel in neurocysticercosis. *Tropen. Med. Parasit.* 33 (1-4), 1982.
36. Doteró, R., David y Castaño, M. S. Cisticercosis: Tratamiento con praziquantel. *Separata de Tribuna Médica de Colombia* No. 741 tomo LXIII No. 6, marzo, 1981.
37. Trujillo-Valdés, V.M., González-Barranco, D., Sandoval-Islas, M. E., Villanueva Diaz, G. and Orozco-Bohne, R. Chemotherapy of human cysticercosis using metrifonato. En: *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Eds. A. Flisser, K. Willms, J. P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltran. Academic Press, New York, 219, 1982.

38. Larralde, C., Flisser, A. and Pérez-Montfort, R. Vaccination against cysticercosis. Perspectives on the immunological prevention. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Eds. A. Flisser, K. Willms, J. P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltran. Academic Press, New York; pág. 675, 1982.
39. Presentado. En: Internacional symposium human Taeniasis and cattle cysticercosis. 20-24 septiembre, Czechoslovakia, 1982.
40. Pawlowski, Z. Epidemiology and Prevention of T. saginata infection. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Eds. A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltran. Academic Press, New York; pág. 69, 1982.
41. Flisser, A., Plancarte, A., Espinoza, B., Woodhouse, E., Rivera, L., Truebat., Yakoleff Greenhouse, V., Sierra, A., Laclette, J.P., Guerra, G., Cañedo, L. and Larralde, C. The immune status of patients with cysticercosis. AF. J. Clin. and Exp. Immunol. 3: 1983, 1982.
42. Lumsden, R. D. Surface ultrastructure and cytochemistry of parasitic helminths. Exptl. Parasitol. 37: 267, 1975.
43. Rickard, M. D. and Katiyar, J. C. Partial purification of antigens collected during in vitro cultivation of the larval stages of Taenia psiformis. Parasitol. 72: 269, 1976.
44. Sosa, A., Girón, H., Alva, S. and Calzada, L. Presence and nature of a glicocalix-like coat on the external vesicular membrane of Cysticercus cellulosae a high resolution histochemical study. Life Sciences, 21: 1021, 1977.
45. Pappas, P. and Read, C. Membrane transport in Helminths parasites. Exptl. Parasitol. 37: 469, 1975.
46. Pappas, P. and Read, C. Trypsin inactivation by intact Hymenolepis diminuta. J. Parasitol. 58: 864, 1972.

47. Pappas, P. and Read, C. Inactivation of  $\alpha$  and  $\beta$ -Chymotrypsin by intact *Hymenolepis diminuta*. *Biological Bulletin*. 143: 605, 1972.
48. Varela-Diaz, V. M. and Coltorti, E. A. The presence of host immunoglobulins in hydatid cyst membranes. *J. Parasitol.* 59: 484, 1973.
49. Plancarte, A., Flisser, A. and Larralde, C. Fibronectin like properties of antigen B from cysticerci of Taenia solium. En: *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Eds. A. Flisser, K. Willms, J. P. Laclette, C. Ridaura, C. Larralde and F. Beltran. Academic Press, New York, 453, 1982.
50. Hammerberg, B., Musoke, A.J. and Williams, J.F. Inactivation of complement by hydatid cyst fluid of E. granulosus. *J. Parasitol.* 63 (2): 327, 1977.
51. Husted, S. T. and Williams, J. F. Permeability studies on Taeniid metacestodes: I) Update of proteins by larval stages of Taenia Taeniformis, T. crassiceps and E. granulosus. *J. Parasitol.* 63 (2): 314, 1977.
52. Chordi, A. and Kagan, I.G. Identification and characterization of antigenic components of sheep hydatid fluid by immunoelectrophoresis. *J. Parasitol.* 51 (1): 63, 1965.
53. Guerra, G., Flisser, A., Cañedo, L., Laclette, J. P. Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from Cysticerci of T. solium. En: *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Eds. A. Flisser, K. Willms, J. P. Laclette, C. Ridaura, C. Larralde and F. Beltran. Academic Press, New York; 437, 1982.

54. Ramírez-Bon, E., Merchant, M.T., Gonzalez del Pliego, M. and Cañedo, L. Ultrastructure of the bladder wall of the metacestode of Taenia solium. En: Cysticercosis: Present State of Knowledge and perspectives. Eds. A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C., C. Ridaura, and F. Beltran. Academic Press, New York; pág. 261, 1982.
55. Bittiger, H. and Schnebli, H. P. Concanavalina A as a tool. A Willey Interscience Publication John Wiley and sons (London, New York, Sidney, Toronto). Pág. 5, 1976.
56. Lehninger, A. Principles of biochemistry. II. Carbohydrates Structure and biological function. Worth Publishers Inc. New York. pág. 277, 1983.
57. Winzler, R. Carbohydrates in cell surfaces. International review of cytology. 29: 77, 1970.
58. Ouchterlony, O. Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Ann. Arbor Science Pubs., Ann. Arbor, 1968.
59. Payne, T. W. Electrophoresis of proteins on sodium dodecyl sulphate poliacrilamide gels. En: Chromatografic and electrophoretic techniques. Vol. II: zone electrophoresis. Ed. I. Smith, Year Book Medical Publications, Chicago. pág. 321, 1976.
60. Fairbanks, G., Stack, T. and Wallach, D. F. H. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochemistry. 0: 2606-2617, 1971.
61. Bolton, A. E. and Hunter, W. M. Biochem. J., Vol. 133. pág. 529, 1973.
62. March, S. S., Parikh, I. and Cuatrecasas, P. A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. Anal. Biochem. 60, 149, 1971..
63. Affinity chromatography principles and methods. Pharmacia Fine Chemicals. Ljungföretagen AB. Sweden. pág. 1, 1979.

64. Campbell, H. D., Garvey, S. J., Cremer, E. N. and Sussdorf, H. D. Isolation of rabbit antibodies and their subunits. En: Methods in Immunology. W. A. Benjamin, Inc. New York, pág. 193, 1970.
65. Hartree, E. F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal. Biochem. 48: 422, 1972.
66. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K. Rebers, P. A. and Smith, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. 28: 350, 1956.
67. Camargo, C. B. El antígeno de Cysticercus cellulosae más frecuentemente reconocido por sueros de pacientes con cisticercosis cerebral: Optimización del método de obtención. Tesis de la Facultad de Ciencias, U.N.A.M., México, 1980.
68. Von Brand, T. Biochemistry of parasites. Academic Press. New York pág. 499, 1973.
69. Ruitenberg, E. J. and Van Knapen, F. The enzyme-linked immunosorbent assay and its application to parasitic infections. Journal Infection Diseases. 136: 267, 1977.
70. Diwan, A. R., Coker-Vann, M., Brown, P., Subianto, D. B., Yolken, R. Desowitz, R. Escobar, A., Gibbs, C. J. and Gajdusek, C. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to Cysticerci of Taenia solium. Am. J. Trop. Med. Hyg. 31 (2): 364, 1982.
71. Moses, A. Dos métodos biológicos de diagnóstico nas cisticercozes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 3: 322, 1911.
72. Trawinski, A. and Rothfeld, J. Über Anwendung der Präzipitationsreaktion zum Nachweis der Gehirnzystizerkose beim Menschen. Zentralbl. Bakteriol. (Ab. 1) 134: 472, 1935.

73. Espinoza, B., Flisser, A., Plancarte, A. and Larralde, C. Immunodiagnosis of human cysticercosis: ELISA and Immunoelectroforesis. En: *Cysticercosis: Present state of Knowledge and Perspectives*. Eds. A. Flisser, K. Willms, J.P. Lachette, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltran. Academic Press, New York; pág. 163, 1982.
74. Yakoleff-Greenhouse, V., Flisser, A. and Larralde, C. Analysis of antigenic variation in cysticerci of Taenia solium. *J. Parasitol.* 68: 39, 1982.
75. Anonymus. Parasite antigens. *Bull. W.H.O.* 52: 237, 1975.
76. Williams, J. F., Pérez-Esandi, M.V. and Oriol, R. Evaluation of purified lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* in the immunodiagnosis of human infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20: 575, 1971.
77. Trimble, J.J. and Lumsden, R. D. Cytochemical characterization of tegument membrane-associated carbohydrates in Taenia crassiceps. *J. Parasitol.* 61: 665, 1975.
78. Oaks, J. and Lumsden, R.D. Cytological studies on the absorptive surfaces of Cestodes. V. Incorporation of carbohydrate containing macromolecules into tegument membranes. *J. Parasitol.* 57: 1256, 1971.
79. Lumsden, R. D., Oaks, J. and 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.
80. Thakur, A., Schwale, C. and Koussa, M. Polysaccharide of the Taenia hydatigena cyst membrane. *Exp. Parasitol.* 30: 94, 1971.
81. 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.

82. 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 transport. Comp. Biochem. Physiol. 8 Comp. Biochem. 52 ( ): 331, 1975.
83. McCracken, B. and Lumsden, R.D. Structure and function of parasite surface membranes. I. Mechanism of phlorizin inhibition of hexose transport by the Cestode Hymenolepis diminuta. Comp. Biochem. Physiol. B. Comp. Biochem. 50 (1): 153, 1975.
84. Pozzuoli, A., Piantelli, M., Perucci, C. Arru, E. and Musiani, P. Isolation of the most immunoreactive antigens of Echinococcus granulosus from sheep hydatid fluid. J. Immunol. 115 (5): 1459, 1975.
85. Sharon Nathan. Lectins. Scientific American 236 (6): 108, 1977.
86. Coldstein, J.I. What should be called a lectin?. Nature 285: (5759), 66, 19.