

39



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

PURIFICACION DE LAS GLICOPROTEINAS GP24 Y GP39-42 DE LOS CISTICERCOS DE *Taenia solium* Y LA DETERMINACION DE SUS CARBOHIDRATOS.

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
JOEL MARTINEZ OCAÑA

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HUMANO EJE DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. AGISTIN PLANCARTE CRESPO.

ASESOR DE TESIS: DR. EDGAR ZENTENO GALINDO.

MEXICO, D. F.

2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**A MI MADRE PORQUE EN TODO MOMENTO HA SIDO MI MÁS GRANDE
INSPIRACIÓN, POR DARME TODO SU CARIÑO, SU AMOR Y SU APOYO
DURANTE TODOS ESTOS AÑOS..**

**A MIS HERMANAS: ROSA, BLANCA, LILIA Y LAURA
POR TODO SU APOYO Y SU CARIÑO.**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

A LA MEMORIA DE ROSA MARIA.

A CECI por ser compañera de tesis, por haber realizado tantos experimentos juntos, pero más por su amistad y apoyo incondicional.

A AGUSTÍN PLANCARTE por haberme enseñado el diagnóstico de la cisticercosis.

A EDGAR ZENTENO por asesorarme en todo lo referente a los carbohidratos.

A GUILLE por compartir sus conocimientos.

A ANA FLISSER por permitirme formar parte de su grupo y adentrarme en el fantástico mundo de la investigación

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de la Dra. Ana Flisser S. y fue financiado parcialmente por Comunidades Económicas Europeas. Grant CII*-CT-0081.

Departamento de Microbiología y Parasitología
Departamento de Bioquímica
UNAM

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	4
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	5
2.1. <i>Taenia solium</i> . Biología y morfología	5
2.1.1. La tenia en estadio adulto	7
2.1.2. El huevo de <i>Taenia solium</i>	9
2.1.3. El cisticerco	10
2.2. Patogénesis y sintomatología	10
2.2.1. Aspectos clínicos y patológicos	10
2.3. Diagnóstico	12
2.4. Epidemiología	14
2.5. Glicoproteínas	16
2.5.1. Purificación de glicoproteínas	19
2.5.2. Electroforesis de glicoproteínas	19
2.5.3. Cromatografía de afinidad con lectinas	20
2.5.4. Interacciones <i>Lens culinaris</i> con oligosacáridos	22
2.5.5. Análisis de carbohidratos por cromatografía gas-líquido (CGL)	23
2.5.6. Funciones de los oligosacáridos en las glicoproteínas	26
3. PROBLEMA	30
4. OBJETIVO	30
4.1. Objetivos particulares	30
5. HIPÓTESIS	30
6. METODOLOGÍA	31
6.1. Preparación del Extracto Crudo de Cisticercos	31
6.2. Obtención de la fracción enriquecida en glicoproteínas (FEG) por cromatografía de afinidad	31
6.3. Obtención de la GP24 y GP39-42 de la FEG por electroforesis y electroelución	33

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.4. Obtención de anticuerpos policlonales anti-GP24 y anti-GP39-42	34
6.5. Cromatografía Gas-Líquido (CGL)	35
6.5.1 Reacción de metilación	35
6.5.2 Reacción de N-re-acetilación	36
7. RESULTADOS	37
7.1. Obtención de la FEG por cromatografía de afinidad	37
7.2. Obtención de GP24 y GP39-42 de FEG por electroforesis y electroelución	39
7.3. Reconocimiento de GP 24 y GP 39-42	40
7.4 Cromatografía gas-líquido	41
8. DISCUSIÓN	43
9. CONCLUSIONES	45
10. PERSPECTIVAS	46
11. ANEXOS	48
11.1 Cuantificación de proteínas por Lowry	48
11.2 Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)	49
11.3 Sistema de geles en gradiente de acrilamida del 5% al 22.5%	50
11.4 Amortiguador para muestras de geles de acrilamida (AMGA) o coctail	52
11.5 Patrón de pesos moleculares preteñidos	53
11.6 Tinción para geles de acrilamida con azul de coomassie	54
11.7 Evaluación de blots	54
11.8 ELISA	56
12. BIBLIOGRAFÍA	59

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

Taenia solium ocasiona la teniosis y la cisticercosis que son enfermedades que prevalecen tanto en áreas urbanas como rurales de México. El diagnóstico inmunológico de la cisticercosis utilizado actualmente por su alta especificidad y sensibilidad es la inmunoelectrotransferencia, a través de este método se detectan anticuerpos específicos contra diferentes glicoproteínas presentes en el cisticerco y que por sus pesos moleculares en kilodaltones se denominan como: GP 50, GP 39-42, GP 24, GP 21, GP 18, GP 14 y GP 13, siendo las más frecuentemente reconocidas la GP 24 y la GP 39-42. En el presente trabajo se purificaron la GP 24 y la GP 39-42 y se identificaron los carbohidratos presentes en la fracción glicano de cada una de ellas.

Los resultados mostraron que las dos glicoproteínas GP 24 y GP 39-42 tienen enlace proteína- fracción carbohidrato del tipo N-glicosídico y que tienen los mismos carbohidratos pero en diferente proporción: manosa, N-acetil-D- glucosamina (GlcNAc) y galactosa en porcentajes de 9.7%, 4.8% y 3.7% y de 5.9%, 1.6% y 0.9% para cada glicoproteína respectivamente. Este tipo de estructura se ha encontrado en otras glicoproteínas purificadas por *Lens culunaris* como la lactotransferrina humana y la IgG de mieloma humano. La estructura propuesta para las dos glicoproteínas es del tipo biantenarico y con un esqueleto interno en común con residuos de GlcNAc con enlaces β 1-4 y manosa unida a dos manosas más con enlaces α 1-3 y α 1-6.

Llama la atención que la GP24 esté más glicosilada que la GP39-42 debido a que puede estar involucrada en mecanismos de evasión inmune lo que ocasiona que las dos glicoproteínas sigan mecanismos de modificación postraduccional diferentes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. INTRODUCCIÓN

Taenia solium es un céstodo, agente causal de la cisticercosis y la teniosis. El estadio adulto de *Taenia solium* parasita al hombre, alojándose en el intestino delgado, donde se desarrolla hasta producir proglótidos grávidos que liberan huevos en las heces de los individuos teniásicos. Los huevos al ser ingeridos por el hombre o el cerdo producen la cisticercosis, el humano al ingerir carne de cerdo inadecuadamente cocida infectada con cisticercos, se infecta con la tenia completando así el ciclo de vida de *Taenia solium*. En humanos la infección por la larva o cisticerco se manifiesta comúnmente cuando el cisticerco o metacéstodo se aloja en el Sistema nervioso central (SNC), ocasionando la neurocisticercosis (NC) que es una importante causa de morbilidad y mortalidad humana, especialmente en América Latina, en ciudades no islámicas de Asia y África¹.

El desarrollo de técnicas imagenológicas como la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética nuclear (RMN), así como el uso de métodos inmunológicos, han hecho posible un diagnóstico más certero de la NC. El diagnóstico inmunológico utilizado actualmente por su alta especificidad y sensibilidad es la inmunoelectrotransferencia (IET), esta técnica detecta la presencia de anticuerpos anti-cisticerco en el paciente. Los anticuerpos reconocen específicamente siete glicoproteínas (GPs) de los siguientes pesos moleculares en kDa: GP50, GP39-42, GP24, GP21, GP18, GP14 y GP13. Las GPs más reconocidas por los anticuerpos de pacientes con síntomas neurológicos son la GP39-42 y la GP24².

La localización y organización de estas moléculas (GP39-42 y GP24) en el cisticerco no se conoce con exactitud, pero debido a que probablemente sean moléculas que están muy expuestas al huésped, tal vez estén involucradas en algún mecanismo de evasión inmune.

En *Schistosoma mansoni* se han encontrado glicoproteínas con gran cantidad de carbohidratos, que en estudios de inmunohistoquímica han sido altamente refractarios a la reacción con los anticuerpos³. En *Hymenolepis* la expresión de residuos carbohidrato se ha relacionado con la baja respuesta inmune del huésped y la evasión inmune del parásito⁴. En la NC por *Taenia solium*, la larva o cisticerco puede sobrevivir por períodos prolongados de tiempo y en un buen número de casos la enfermedad tiene un curso asintomático, es posible que las glicoproteínas desempeñen algún papel dentro de los mecanismos de sobrevivencia que utiliza el parásito en el huésped⁵.

El presente trabajo tiene como objetivo determinar los componentes carbohidrato de las glicoproteínas inmunodominantes GP24 y GP39-42 de los cisticercos de *Taenia solium*.

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 *Taenia Solium*. Biología y morfología.

Taenia solium es un gusano parásito del hombre y del cerdo, pertenece al Phylum Platyhelminthes, Clase Cestoda, Subclase Eucestoda, Orden Cyclophyllidae, Familia Taeniidae y Género *Taenia*. Su ciclo biológico comprende la forma adulta o tenia que tiene como hospedero definitivo al hombre. La *Taenia solium* se adhiere al intestino delgado del hombre⁶, produciendo la teniosis y en ella se originan los huevos que se transformarán en nuevos parásitos. Los huevos son liberados por el parásito en la luz intestinal y salen en las heces del teniásico al medio ambiente contaminándolo.

Los huevos en el sistema digestivo son sometidos a la acción de los jugos gástricos perdiendo sus membranas protectoras y liberándose la oncosfera, que por movimientos amiboideos y con el uso de sus ganchos cruzan la pared intestinal alcanzando el torrente sanguíneo o linfático. Al continuar creciendo, las oncosferas se fijan a los tejidos de los huéspedes alcanzando dimensiones en general de 0.5-1.0 cm, produciendo la enfermedad denominada cisticercosis⁷.

Los cisticercos en el aparato digestivo son estimulados por los jugos gástricos con lo cual el escólex sale del interior de su vejiga y se fija al intestino delgado. El crecimiento de la forma adulta continúa desarrollándose, a partir del escólex fijo, formando un cuerpo segmentado constituido por proglótidos. Completando así el ciclo de vida de *Taenia solium* (figura 1).

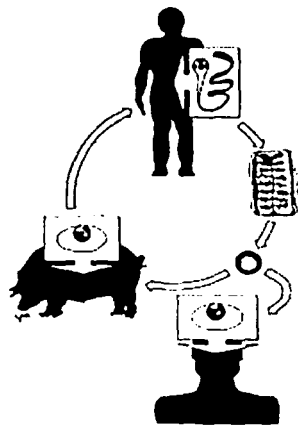


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*: A) huésped definitivo, B) eliminación de proglótidos llenos de huevos, los cuales pueden ser ingeridos por el hombre C), o por el cerdo D) ocasionando la cisticercosis, cuando el cisticerco se aloja en el SNC produce la neurocisticercosis

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.1.1. La tenia en estadio adulto.

La forma adulta de *T. solium*, está constituida por el escólex, cuello y estróbilo: el primero está formado por cuatro ventosas y un rostelo en donde existe una doble corona de ganchos, la interna con 12 a 16 ganchos de 0.13-0.16 mm y la externa, con igual número de ganchos pero ligeramente más pequeños de 0.10-0.12 mm (figura 2a). El estróbilo que llega a medir de 3-7 metros, se encuentra inmediatamente después del cuello y está constituido por unidades repetidas llamadas proglótidos en diferentes estados de desarrollo. Los más cercanos al cuello son inmaduros, ya que aún no tienen desarrollados los órganos sexuales, continuando con los proglótidos maduros que ya tienen desarrollados sus órganos sexuales, por último se encuentran los proglótidos grávidos, llenos de huevos. Cada proglótido grávido mide de 0.5 a 2 cm y contiene aproximadamente 60,000 huevos. Se cree en general, que cada individuo parasitado libera de 2 a 5 proglótidos 2 a 3 veces por semana⁸.

La tenia carece de boca y aparato digestivo, además de ser hermafrodita. El aparato sexual masculino consiste en numerosos testículos dispersos pero conectados por medio de túbulos finos a un espermatoducto enrollado, cuyo final se encuentra modificado para formar un órgano muscular copulatorio llamado cirro. El espermatoducto llega al poro genital, en el cual también desemboca la vagina, que es el conducto femenino que recibe los espermatozoides y los conduce al receptáculo seminal que se conecta con el oviducto (figura 2b). El ovario, libera los óvulos hacia el oviducto donde se lleva a cabo la fertilización. Finalmente, los huevos se acumulan en el útero, que tiene una región central a lo largo del proglótido de la que salen de 7 a 12 ramas laterales, a cada lado del conducto uterino principal (figura 3)



Figura 2a. Micrografía electrónica de barrido del escólex de *T. solium* (tomado de Lachette et al; 1982). V: ventosas, G: ganchos, R: rostelo y C: cuello.

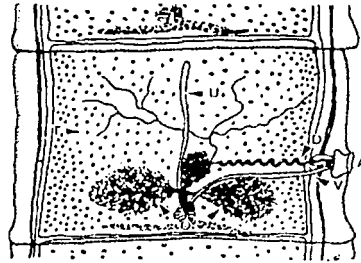


Figura 2b. Ilustración esquemática de un proglótido de *T. solium* A: atrio genital, D: ducto genital, O: ovario trilobulado, T: testículos, V: vagina y U: útero.

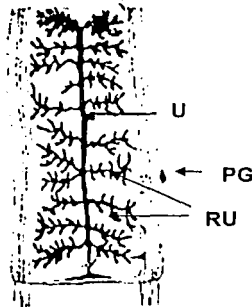


Figura 3. Representación esquemática de proglótido de *Taenia solium*. U útero, PG poro genital, RU ramas uterinas; (tomado de aluja, a. et al. 1987).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.1.2. El huevo de *Taenia solium*.

Cuando se observan bajo el microscopio de luz los huevos son esféricos tienen una apariencia radial y están rodeados por una gruesa capa de bloques embriofóricos (figura 4a). La capa más externa del huevo es el vitelio, pero es poco frecuente encontrar huevos aún cubiertos por el vitelio en la materia fecal. La siguiente capa es la membrana embriofórica que tiene apariencia de cráteres y rodea al embrióforo. La capa más interna es la membrana oncosférica; ésta es impermeable a las condiciones ambientales externas, aunque se vuelve permeable cuando se pone en contacto con la pancreatinina y permite que el embrión expuesto, pero en reposo, se active⁹. La oncosfera (figura 4b) se llama también embrión hexacanto porque tiene seis ganchos, pero se considera una larva al salir del huevo.



Figura 4a. donde se observa huevo de *T.solium* rodeado por una gruesa capa de bloques embriofóricos visto bajo el microscopio de luz.



Figura 4b. Se observa la oncosfera de *T.solium* rodeada por una gruesa capa de bloques embriofóricos vista por microscopio electrónico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.1.3. El cisticerco.

Los cisticercos localizados en el cerebro humano muestran dos tipos morfológicos: celuloso y racemoso. El tipo celuloso es pequeño (0.3 a 1.5 cm); tiene una vesícula esférica u ovalada blanca o amarillenta, con una pared translúcida a través de la cual se puede observar el escólex como gránulo sólido excéntrico. Las características morfológicas de los cisticercos celulosos alojados en los seres humanos y en los cerdos son similares. El tipo celuloso es más frecuente en el humano y generalmente está separado del tejido del huésped por una cápsula fina de colágena¹⁰. El cisticerco racemoso es una vesícula grande, redondeada o lobulada, circunscrita por una pared delicada, o bien es similar a un racimo de uvas. Los cisticercos de tipo racemoso son parásitos muy grandes, hasta de 10 a 12 cm, y pueden contener hasta 60 mL de fluido¹¹. Probablemente la característica más importante del tipo racemoso es que en apariencia no tiene escólex, aunque en algunos casos se pueden observar vestigios del escólex en estudios histológicos¹².

2. 2. Patogénesis y sintomatología

2.2.1. Aspectos clínicos patológicos

La NC es una enfermedad causada por la presencia de cisticercos de *Taenia solium* en el SNC. Los cisticercos localizados en el cerebro humano pueden ser celuloso o racemoso, siendo el celuloso más frecuente. La NC es una enfermedad compleja cuyas manifestaciones principales dependen del número, localización, estado y tipo de parásitos.

El grado de la reacción inflamatoria inducida por el parásito y el estado inmune del hospedero también son factores importantes¹³.

La NC se ha clasificado como maligna y benigna¹⁴ o como activa e inactiva¹⁵. La clasificación de Estañol¹⁴ se orienta al pronóstico del enfermo y no depende del estado del cisticerco (vivo o calcificado). La de Sotelo¹⁵ considera la enfermedad como activa cuando los parásitos están vivos, independientemente de las consecuencias que puedan ocasionar en el hospedero, y como inactiva en los casos en que el cisticerco presenta calcificaciones o fibrosis. El tipo benigno de la enfermedad generalmente se vincula con cisticercos de tipo celuloso. En contraste, el cisticerco de tipo racemoso ocasiona los casos más peligrosos de la enfermedad.

La NC puede ser una enfermedad asintomática¹⁶ o presentar gran variedad de signos y síntomas, esta enfermedad es causa de epilepsia de aparición tardía en 50 % de los pacientes¹⁷. Las características de las crisis dependen de la localización de los parásitos en el parénquima cerebral, mientras que su presencia depende de factores fisiopatológicos no bien conocidos¹⁸. La hipertensión endocraneal es otra de las complicaciones de la NC y se encuentra en aproximadamente 23% de los casos. También se presenta cefalea no debida a hipertensión endocraneal, alteraciones del estado mental y muy diversos signos y síntomas neurológicos¹⁹⁻²¹. En fecha reciente se informó que la NC puede ser causa de demencia, de modo similar a la enfermedad de Alzheimer²². Además puede confundirse con otras entidades clínicas como epilepsia idiopática, lesiones neoplásicas cerebrales, meningitis y cualesquiera otra causa de aumento en la presión intracraneal. También debe tomarse en cuenta el diagnóstico diferencial con tuberculosis (tuberculomas), coccidioidomicosis, criptococosis, neurosífilis, sarcoidosis y otras parasitosis del SNC.

2.3 Diagnóstico

El diagnóstico de la NC es difícil debido a que los signos y síntomas de este padecimiento son comunes a otros desórdenes neurológicos²³. En los últimos años, las técnicas imagenológicas como la Tomografía Computarizada (TC)²⁴ y la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) han mejorado significativamente el diagnóstico, pero su uso es costoso, además del limitado número de sitios que cuentan con estos equipos. Como alternativa a las técnicas imagenológicas, los métodos inmunológicos son útiles para apoyar el diagnóstico clínico de la NC.

Desde principios de este siglo se han empleado métodos inmunológicos para su diagnóstico. La técnica de fijación del complemento se estandarizó en Brasil en 1911²⁵, pero esta prueba era complicada, además de inespecífica en suero, por lo que sólo podía usarse en LCR. Después se usó la inmunoelectroforesis (IEF) técnica que se basa en la separación de los componentes proteicos de la mezcla antigénica según su carga eléctrica y la reacción posterior de ellos con anticuerpos específicos en un medio semisólido, de tal manera que por su tamaño estas reacciones antígeno-anticuerpo precipitan haciéndose evidentes a simple vista. Esta prueba permitió identificar al antígeno B como el más frecuentemente reconocido por los anticuerpos de enfermos con NC, sin embargo era poco sensible, por lo que no podía emplearse en LCR y sólo detectaba anticuerpos séricos en el 44% de los enfermos con cisticercosis²⁶.

En 1972, Engvall y Perlmann desarrollaron un ensayo inmunoenzimático (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) ELISA, basado en la captura de los anticuerpos por medio de un antígeno adsorbido a una fase sólida: la presencia de los anticuerpos de la clase IgG específicos

contra el antígeno se detectaban después de incubar esta reacción con un anticuerpo anti inmunoglobulina-IgG acoplado a una enzima y posteriormente con el sustrato para la enzima, que al hidrolizarse desarrolla un color en los casos positivos²⁷. En el diagnóstico de la cisticercosis por *T. solium* se utilizaron como antígenos, un extracto crudo de cisticercos y el antígeno B purificado por Guerra y col²⁸. La sensibilidad fue similar con ambos antígenos y la especificidad, al emplear como controles muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) de enfermos neurológicos y sueros de individuos sanos, ambos antígenos permitían definir claramente a los pacientes con NC. Sin embargo al emplearlo con muestras de poblaciones abiertas se identificaron diversas reacciones cruzadas²⁹.

El método más utilizado para el diagnóstico de la NC es la inmunoelectrotransferencia (IET), este procedimiento permite superar el problema de la reactividad cruzada con otros parásitos sin afectar la sensibilidad. La IET usa como antígeno una fracción enriquecida de glicoproteínas que se obtiene al purificar un extracto crudo de cisticercos por cromatografía de afinidad con la lectina *Lens culinaris*. Las glicoproteínas obtenidas por este procedimiento se separan por electroforesis en poliacrilamida y se transfieren a membrana de nitrocelulosa, la cual se corta en tiras de tres milímetros de ancho, para posteriormente enfrentarse a los anticuerpos de pacientes, los cuales identifican específicamente a siete glicoproteínas: GP50, GP39-42, GP24, GP21, GP18, GP14 y GP13, siendo las más reconocidas por los anticuerpos de pacientes y cerdos con cisticercosis las GP24 y GP39-42^{30, 31}, (figura 5).

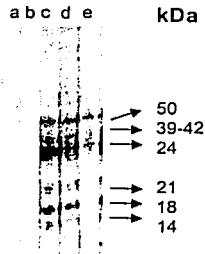


Figura 5. Diagnóstico de cisticercosis por Inmunolectrotransferencia (IET) controles negativos a y b, controles positivos c-e donde se observa las glicoproteínas específicas.

2.4. Epidemiología

La teniosis y la cisticercosis ocasionadas por *Taenia solium* son enfermedades que prevalecen tanto en áreas urbanas como rurales, en estas últimas se asocian a las prácticas tradicionales de crianza de cerdos, malas condiciones sanitarias e higiénicas^{32,33}. En México, en un estudio llevado a cabo en autopsias en 1979, la NC fue causa de muerte en el 13% de los casos³⁴. En hospitales de neurología el 11% de los casos son ocasionados por NC³⁵.

La contribución de la cisticercosis a las tasas de morbilidad y mortalidad son el resultado de la invasión del cisticerco al SNC, causando frecuentemente casos de incapacidad física y en ocasiones la muerte.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los signos y síntomas no son específicos, lo cual dificulta el diagnóstico, requiriendo técnicas imagenológicas, así como de ensayos inmunológicos que puedan apoyar el diagnóstico y puedan usarse también en estudios epidemiológicos¹³⁻¹⁵.

En poblaciones rurales se han llevado a cabo varios estudios epidemiológicos para identificar factores de riesgo y estimar la prevalencia de teniosis y cisticercosis³⁶⁻⁴¹. En una comunidad del estado de Sinaloa se evaluó el tratamiento masivo con prazicuantel contra la teniosis, un año después de aplicado el tratamiento, no se reportaron casos de teniosis ni de cisticercosis porcina⁴². En Morelos se evaluaron dos estrategias en dos comunidades para tratar de controlar a *T.solium*, una comunidad recibió tratamiento masivo con prazicuantel y otra recibió sólo educación para la salud. En la primera comunidad la teniosis se redujo en un 53%, probablemente el efecto no fue mayor debido a que se utilizó la mitad de la dosis de prazicuantel (5 en vez de 10 mg/kg de peso), esto por recomendación de la Organización Mundial de la Salud para evitar aparición de cuadro clínico compatible con NC de casos asintomáticos de NC (debido a que se usa el mismo medicamento para combatir las dos parasitosis), aun así se generó un caso de NC. En la comunidad que recibió educación para la salud, la cisticercosis porcina se redujo del 5 al 2 %, además hubo cambios significativos en conocimientos de la teniosis-cisticercosis y cambios en prácticas (no dejar deambular libremente a los cerdos y evitar el fecalismo al ras del suelo)⁴³.

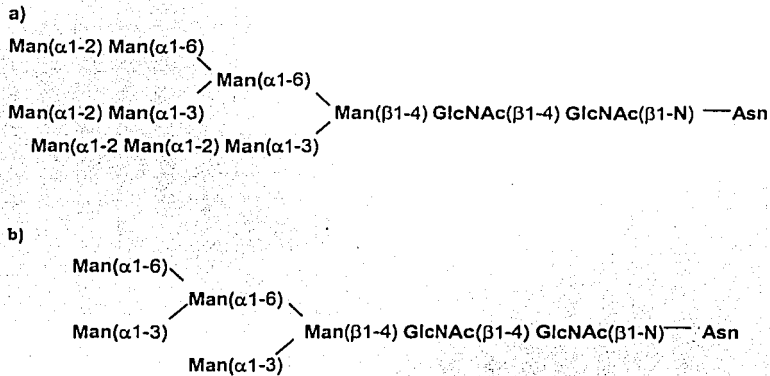


Figura 7. Ejemplos de enlaces N-glicosídico: a) estructura presente en la unidad A de la tiroglobulina de ternero y en la IgD humana. b) estructura presente en ovomucoide y ovalbúmina de gallina y en la IgM de mieloma humano.

La fracción carbohidrato de las glicoproteínas está compuesta por cuatro clases de monosacáridos: azúcares neutros, amino-azúcares, azúcares-urónicos y ácidos siálicos.

Azúcares neutros: D-galactosa, D-manosa, D-glucosa, L-fucosa, L-furano-arabinosa y D-xilosa.

Amino-azúcares: N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina.

Azúcares-urónicos: ácido-D-glucorónico, ácido-L-idurónico.

Ácidos siálicos: ácido-N-acetilneuramínico, ácido-N-glicolilneuramínico, ácido-N₁,O₇-diacetilneuramínico⁴⁴.

Los oligosacáridos se encuentran unidos a la parte proteica de una GP por medio de dos tipos de enlaces: enlace N-glicosídico (Asn-enlace) o enlace

TEXIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.5.1. Purificación de glicoproteínas

Los primeros reportes de aislamiento y purificación de glicoproteínas datan de los 30's, cuando se informó de la purificación del colágeno. Después hay una gran cantidad de artículos que relatan los problemas asociados a la purificación de las glicoproteínas. Pero en general, las estrategias de purificación de glicoproteínas son las mismas aplicadas a las proteínas no glicosiladas. En la purificación de todas las glicoproteínas hay que considerar el uso posterior que se le va a dar a ésta, si posee o no actividad biológica, enzimática o catalítica; de ser así, durante el proceso de purificación hay que controlar la temperatura, pH y evitar el ataque proteolítico, así como la eliminación de moléculas contaminantes.

Con excepción de las GPs extracelulares, el primer paso en la purificación de éstas es normalmente la extracción de la GP de interés en forma soluble. Este proceso usualmente involucra algún tipo de homogenización de tejido, seguido de la eliminación de material insoluble por filtración o centrifugación. Muchas GPs, son solubles en soluciones de sales diluidas y pueden mantenerse en solución a menos que algún componente se desnaturalize⁴⁵.

2.5.2. Electroforesis de glicoproteínas.

La electroforesis separa las proteínas con base en su migración en un campo eléctrico. Por esto las proteínas son fraccionadas sobre la base, tanto de carga, como de masa. En una modificación de la técnica estándar de electroforesis se emplea el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) cargando negativamente para sobrepasar la carga neta de las proteínas, de modo que sólo sean separadas con base en su masa. La electroforesis en SDS gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) se emplea para evaluar la pureza y para estimar

la masa molecular de una proteína. El SDS tiene una larga cola hidrofóbica que se fija a las cadenas laterales hidrofóbicas de los residuos de aminoácidos de la cadena polipeptídica. Se fija en una proporción de aproximadamente una molécula de SDS por cada dos residuos de una proteína típica. Todos los complejos SDS-proteína están muy cargados negativamente.

Después de aplicar las muestras de proteína dentro del gel y de aplicar un campo eléctrico, todos los complejos SDS-proteína se mueven hacia el ánodo. No obstante, su velocidad de migración a través del gel es inversamente proporcional al logaritmo de su masa molecular -cuanto mayores sean las proteínas mayor resistencia encuentran y por consiguiente migran con más lentitud que las proteínas más pequeñas-. El patrón de formación de bandas de la proteína después de la electroforesis se hace visible mediante una tinción⁴⁵.

2.5.3. Cromatografía de afinidad con lectinas para aislamiento de glicoproteínas

Las lectinas fueron descubiertas en 1888 cuando se observó que las semillas de la higuera (*Ricinus communis*) contenían sustancias que aglutinaban los glóbulos rojos⁴⁶. Éstas fueron llamadas lectinas alrededor de 1949. Las lectinas son proteínas de origen no inmune, algunas lectinas, incluyendo a la concanavalina A, no contienen componente carbohidrato. La habilidad de las lectinas para precipitar polisacáridos, glicoproteínas y aglutinar células se debe a que sus carbohidratos contienen por lo menos dos sitios de enlace⁴⁷. La variación en su afinidad depende de los cambios en el número de subunidades y su combinación.

Mientras que las lectinas son principalmente tetrámeros, las subunidades pueden ser idénticas y combinarse en diferentes proporciones. La afinidad de la lectina por ciertos carbohidratos y compuestos que contienen carbohidratos ha sido aprovechada para usarse en el aislamiento/purificación y caracterización de GPs⁴⁸.

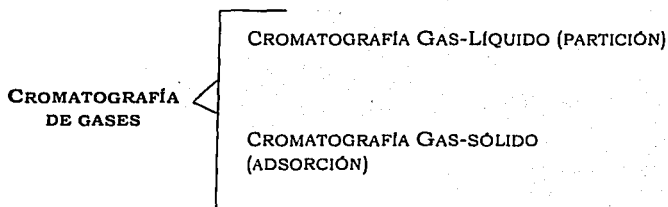
Los oligosacáridos de las GPs tienen diferentes funciones que han sido recientemente estudiadas^{3,4}, además debido a la gran variedad de estructuras de los oligosacáridos se hace necesario el poder purificarlos y analizarlos para entender mejor su función. Un método ampliamente usado en la separación y análisis de carbohidratos ha sido la Cromatografía de Afinidad con Lectinas (CAL), la cual facilita la separación de glicopéptidos u oligosacáridos de mezclas complejas a través de una columna de sefarosa con alguna lectina inmovilizada. A diferencia de otras técnicas la separación de GPs u oligosacáridos por CAL no sólo se basa en la separación por peso o carga del glicopéptido, sino que la separación depende de las interacciones específicas de la lectina inmovilizada con los carbohidratos de las GPs, las diferentes lectinas reconocen características estructurales de los oligosacáridos, lo cual hace posible que sean usadas en investigación, y si es posible realizar inferencias acerca de la estructura del oligosacárido. Sin embargo es importante subrayar que conclusiones definitivas con respecto a la estructura del oligosacárido no pueden ser obtenidas sólo de la interacción del oligosacárido con lectinas inmovilizadas, sino que este análisis debe complementarse con algún otro método analítico como la Cromatografía-Gas-Líquido (CGL), Cromatografía-Líquida de Alta Resolución o la Espectrofotometría de masas, etc.

2.5.4. Interacciones de la lectina *Lens culinaris* con oligosacáridos.

Esta lectina tiene alta afinidad por oligosacáridos con enlace N-glicosídico y tiene una afinidad mayor por los glicopéptidos que poseen residuos de GlcNAc, seguidos por los de galactosa y manosa. La *Lens culinaris* inmovilizada en una columna puede discriminar entre los isómeros de oligosacáridos N-glicosídicos con estructura biantenaria y triantenaria; sólo los oligosacáridos que contienen residuos de GlcNAc y manosa con enlace (β 1-4) unida a dos residuos de manosa con enlaces (σ 1-3) y (α 1-6) con estructura biantenaria son los que se unen a la lectina^{44, 45}. La *Lens culinaris* puede también interactuar con oligosacáridos libres que no se encuentran unidos a ninguna proteína, pero no puede interactuar con los carbohidratos, si estos han sufrido una previa reducción^{44, 45}.

2.5.5. Análisis de carbohidratos por cromatografía Gas-líquido (CGL)

La cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil, gaseosa y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser líquido o un sólido. De acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas y a los mecanismos de separación, la cromatografía de gases se divide en:



En la cromatografía de gases, la fase móvil es un gas (regularmente helio) y la estacionaria es un sólido. La partición se lleva a cabo entre una fase estacionaria líquida que cubre a un sólido inerte, como sílica, vidrio, etc. y el gas que transporta el soluto. Cuando se introduce la sustancia a analizar en la corriente del gas, ésta se volatiliza por la elevada temperatura y de esta manera es transportada por el gas a lo largo de la columna donde se distribuye entre las fases sólida y líquida. Este proceso de partición o reparto entre ambas fases está definido como el "factor de capacidad K" determinado bien sea por la cantidad o por el tiempo de residencia de la sustancia en cuestión entre las fases respectivas. Mientras mayor tiempo pase el soluto en la fase estacionaria, mayor será el valor de "K" y por lo tanto, mayor el tiempo de retención, por lo que el valor de "K"

dependerá del soluto, la cantidad y la composición de la fase líquida, la temperatura y la velocidad de flujo del gas. Cuando los componentes salen individualmente de la columna, pasan a través del detector, el cual indica la cantidad de cada uno de ellos. Las señales del detector pasan a través de un amplificador o electrómetro que está conectado a un aparato automático que grafica la señal, esta gráfica resultante es el cromatograma, el cual se emplea para determinar la identidad y concentración de cada uno de los componentes. El detector generalmente emite una señal proporcional a la concentración del soluto en el gas transportador cuando éste sale de la columna de manera que el cromatograma para cada producto aparece como un pico en forma de campana a un determinado tiempo.

La aplicación de la CGL para el análisis de monosacáridos requiere la preliminar hidrólisis parcial o total del oligosacárido. El uso del análisis de metilación en la determinación de la estructura de los oligosacáridos es uno de los más usados, se basa en la conversión de los hidroxilo libres de los carbohidratos en grupos O-metilo, mediante metilación y la posterior hidrólisis ácida rompe los enlaces glucosídicos adicionando un grupo oxidrilo donde anteriormente se encontraba el enlace. La hidrólisis total se emplea generalmente para la determinación y cuantificación de los carbohidratos presentes en una glicoproteína⁴⁹. La CGL emplea el método de los derivados O-metilglucósidos (derivados de los carbohidratos correspondientes), mediante las siguientes reacciones (figura 9).

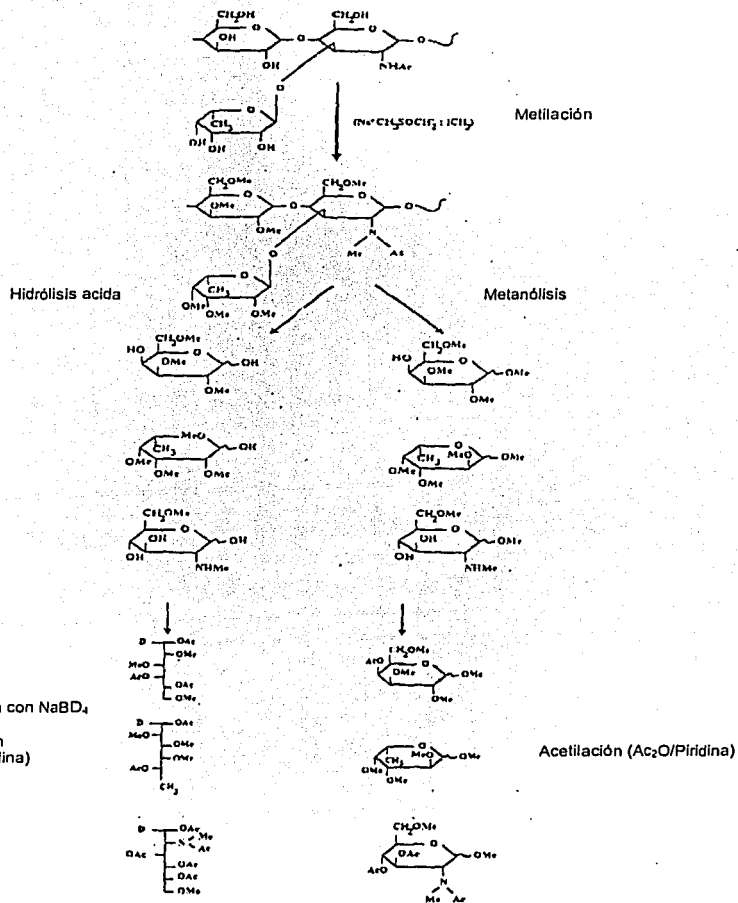


Figura 9. Reacción de metanolisis, la cual primero convierte los hidroxilos libres en grupos metilo, para posteriormente por hidrólisis con metanol-HCl producir los monómeros parcialmente metilados correspondientes a cada azúcar. El análisis posterior de los derivados metilglucósidos puede ser llevado a cabo por GLC o espectrometría de masas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.5.1. Funciones de los oligosacáridos en las glicoproteínas.

- En las últimas décadas el estudio de la bioquímica de las glicoproteínas ha tomado gran importancia debido a las funciones que estas biomoléculas cumplen en diferentes organismos:
- Estabilizan la conformación tridimensional de las proteínas biológicamente activas, protegen la cadena polipeptídica contra el ataque proteolítico de las enzimas, actuando como escudo.
- Son parcialmente responsables de la antigenicidad y reactividad de los anticuerpos dirigidos contra las glicoproteínas. De esta manera puede comprenderse cómo las glicoproteínas modulan el reconocimiento inmune por parte del hospedero y por consiguiente tener un papel importante en el mecanismo de evasión inmune.
- Los oligosacáridos de la superficie celular controlan la permeabilidad de la membrana y consecuentemente intervienen en la regulación del metabolismo y división celulares y la sola modificación de su estructura o distribución en la superficie celular puede ocasionar alteraciones metabólicas.
- Pueden funcionar como receptores para hormonas, proteínas y microorganismos como: virus, hongos, bacterias y parásitos⁴⁶.

Dado que los céstodos carecen de sistema digestivo, el tegumento del céstodo se ha adaptado para rendir una serie de funciones; las cuales incluyen, protección contra enzimas (proteasas principalmente) digestivas y respuesta inmune del hospedero. También, el tegumento provee una superficie metabólicamente activa a través de la cual hay absorción de nutrientes y eliminación de productos de desecho. En general el tegumento puede describirse como una epidermis sincitial compuesta por dos capas

citoplásmicas: una exterior o distal, anucleada y otra región proximal que contiene células nucleadas. La distal está delimitada por la membrana plasmática, la cual está formada por un modelo de "mosaico fluido", constituido por proteínas, glicoproteínas y lipoproteínas, embebidas en una bicapa de lípidos (figura 10). Azúcares y lípidos asociados a proteínas integrales forman la capa externa o glicocálix⁵⁰. El análisis de la superficie tegumentaria de gusanos adultos y metacéstodos se ha limitado a un restringido número de especies, y generalmente revela una compleja organización de macromoléculas, algunas exhiben actividad enzimática, con pesos moleculares desde 10,000 hasta 200,000 Da⁵¹.

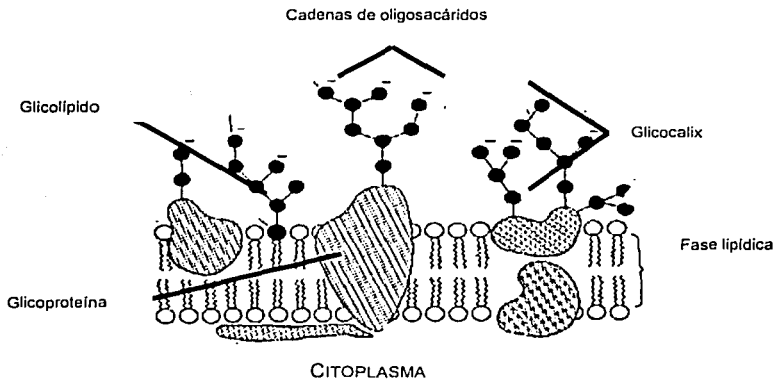


Figura. 10. Diagrama de la organización molecular del tegumento y membrana plasmática (basada en el modelo de mosaico fluido de Singer & Nicolson). Las porciones carbohidrato de las glicoproteínas de membrana y los glicolípidos están expuestas en la fase externa de la membrana, formando parte del glicocálix. (tomado de J.D. Smyth and D.P. Mc Manus).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el cisticercos de *Taenia solium* se han realizado algunos estudios bioquímicos que demuestran la presencia de porfirinas en el fluido vesicular, predominantemente coproporfirina y porfirina pentacarboxilada, que hacen que el parásito emita fluorescencia roja intensa al ser expuesto a luz UV de onda larga^{52,53}. También se ha demostrado la presencia de colágena⁵⁴, colinesterasas⁵⁵ y otras proteasas⁵⁶, así como de colesterol, glucógeno, glicoproteínas^{57, 58} y antígeno B o paramiosina y la miosina.

También componentes del hospedero (como inmunoglobulinas y seroalbúmina) han sido identificadas en la superficie de varias especies⁵⁹. El céstodo adulto no es en realidad permeable a partículas coloidales y sustancias de alto peso molecular, aunque recientemente se ha demostrado el proceso de endocitosis en el adulto de *Schistocephalus solidus* y en *Hymenolepis nana* ⁶⁰.

El cisticercos o metacéstodo, sin embargo, parece más permeable a sustancias de alto peso molecular, dado que macromoléculas del hospedero y del parásito están presentes en el fluido del cisticercos⁶¹. Todas estas propiedades del tegumento le confieren propiedades privilegiadas en la interfase huésped-parásito, que son favorables para el desarrollo del parásito.

En el tegumento de *Schistosoma mansoni* se han detectado glicoproteínas con altas cantidades de carbohidrato en todos los estadios del parásito, además en un estudio histoquímico con lectinas en el mismo parásito se revelaron residuos carbohidrato altamente refractarios al enlace con los anticuerpos lo que hace pensar en un probable mecanismo de evasión inmune⁶². Es probable que la fracción carbohidrato de las glicoproteínas tenga un papel importante en el mecanismo de evasión inmune porque al estar en contacto estrecho con el huésped evitan la actividad de las proteasas, además de ser las moléculas más expuestas al sistema inmune del hospedero. Por lo cual decidimos purificar la GP 24 y

GP. 39-42 de los cisticercos de *T. solium* y caracterizar la fracción carbohidrato de cada una de estas glicoproteínas inmunodominantes.

3. PROBLEMA

Los antígenos inmunodominantes GP24 y GP39-42 están constituidos por una fracción glicano y no existe una caracterización de estas importantes moléculas, el análisis de sus carbohidratos permitirá ampliar el conocimiento de estos componentes parasitarios.

4. OBJETIVO

Purificar las glicoproteínas GP24 y GP39-42 de los cisticercos de *T. solium* y caracterizar sus carbohidratos.

4.1. Objetivos particulares.

- Obtener la fracción enriquecida en glicoproteínas (FEG) de cisticercos de *Taenia solium*.
- Purificar de FEG la GP24 y GP39-42.
- Determinar los diversos tipos de azúcares de GP24 y GP39-42.

5. HIPOTESIS

Al purificar a las GP24 y GP39-42, caracterizar y cuantificar sus fragmentos glicanos nos permitirá conocer los diversos carbohidratos que forman parte de estas glicoproteínas.

6. METODOLOGÍA

6.1. Preparación del Extracto Crudo de Cisticercos

Treinta gramos de cisticercos de *Taenia solium* diseccionados del músculo esquelético de cerdos se homogenizaron en un Politron (kinematica gmbh brinkmann instruments) con amortiguador Hepes 0.05M, Sacarosa 0.025M, EDTA 0.002M pH=7.2 y el inhibidor de proteasas Fenil metil sulfonil fluoruro (FMSF) 0.005M en relación 1:5 p/v. El homogenado se dejó en agitación constante durante toda la noche a 4°C, al día siguiente se centrifugó a 40,000 g durante 30 min. Los sobrenadantes (sn 1) se recuperaron y el precipitado volvió a solubilizarse bajo las mismas condiciones.

Los sobrenadantes se ultracentrifugaron a 250,000 g durante 2 hr. Se recuperaron los sobrenadantes (sn 2) y se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry usando albúmina sérica bovina como estándar⁶³ (anexo 1)

6.2. Obtención de la fracción enriquecida en glicoproteínas (FEG) por cromatografía de afinidad

Los sobrenadantes (sn 2) recuperados de la ultracentrifugación se pasaron por una columna de 15 cm de longitud por 1 cm de diámetro interno con Sefarosa 4B acoplada con la lectina *Lens culinaris* (Sigma Chem., St Louis, MO), previamente equilibrada con Tris-NaCl (tris 0.05M, NaCl 0.2M) pH= 8.0. La matriz de gel contenía aproximadamente 8 mg/ml de lectina.

Las fracciones se colectaron a un flujo de 5.5 ml por minuto, todas las fracciones se leyeron en un espectrofotómetro a 280 nm. El material no retenido por la lectina *Lens culinaris* fue eluido con tris 0.05M, NaCl 0.2M pH= 8.0 hasta que la densidad óptica fue menor de 0.01, posteriormente las glicoproteínas que se adsorbieron a la lectina (FEG) *Lens culinaris* fueron eluidas, adicionando el amortiguador tris 0.05M, NaCl 0.2M- α -metilmanósido 0.2M.

Todas las fracciones obtenidas en el segundo pico de la cromatografía se juntaron para formar la FEG. La FEG se dializó contra PBS (anexo 2) (cuatro cambios de 4 L cada uno) y se concentró por ultrafiltración con membrana con un corte de peso molecular de 10 kDa hasta aproximadamente 4 ml, usando un sistema de presión Amicon (Amicon Division, W. R. Grace. Co.) (figura 11).

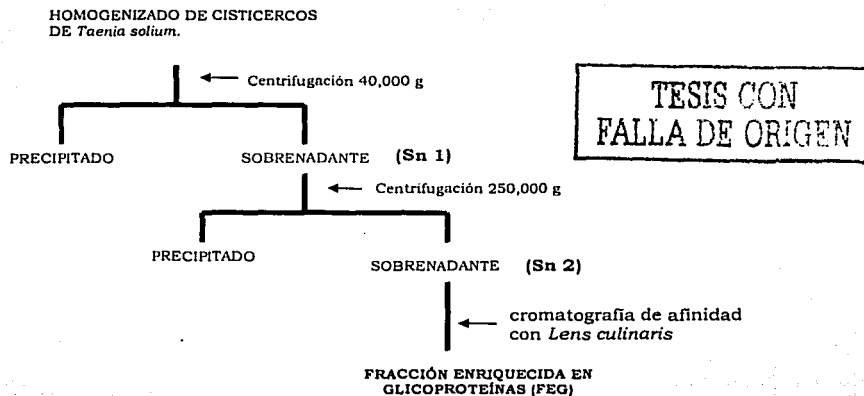


Figura 11. Esquema para la obtención de la fracción enriquecida en glicoproteínas (FEG) a partir de cisticercos de *Taenia solium*.

6.3 Obtención de la GP24 y GP39-42 de la FEG por electroforesis y electroelución.

La electroforesis vertical de la FEG se realizó en geles por gradiente de poliacrilamida del 5-22.5%, (anexo 3) de acuerdo al método descrito por Tsang y col.² (Hoefer Scientific Instruments SE 600) con placas de vidrio de 18 cm x 8.3 cm y un grosor de 0.75 mm. La proteína se mezcló en relación 1:2 v/v con el amortiguador para muestras de geles de acrilamida (AMGA) (anexo 4)

Se utilizaron 10 µl de marcadores de pesos moleculares comerciales (anexo 5) que correspondían a los siguientes pesos moleculares: miosina cadena H (200 KDa), fosforilasa B (97.4 KDa), albúmina sérica bovina (67 KDa), ovalbúmina (43 KDa), anhidrasa carbónica (29 KDa), beta-lactoglobulina (18.4 KDa) y lisozima (14.3 KDa).

La electroforesis se realizó aplicando una corriente de 40 mA por gel durante 1.5 hr (Transphor/Electrophoresis hsi Hoefer) un gel se tiñó con acetato de sodio 4M y otro se transfirió a nitrocelulosa. Al término de la electroforesis un gel se lavó con agua bidestilada por 5 minutos y se realizó tinción negativa con una solución de acetato de sodio 4M⁶⁴ para visualizar las bandas correspondientes de 24 y 39-42 KDa, éstas se cortaron con una navaja de bisturí y se guardaron en tubos cónicos con agua destilada.

Las tiras de acrilamida conteniendo a la GP24 y a la GP39-42 (por separado) se sometieron a electroelución⁶⁵ en una cámara para electroelución submarina (HE 99 Hoefer Scientific Instruments) con un amortiguador interno de electroelución tris-base 0.2M, acetato de sodio 0.2 M, DSS 1% y DTT 10 mM pH= 7.4 (1 ml/0.1 g de gel). Las tiras de acrilamida con este amortiguador se colocaron en una membrana tubular de diálisis con un diámetro de 10 mm con un corte de peso molecular de 3,500 Da. El amortiguador externo fue tris-base 50mM, acetato de sodio

50mM y DSS 0.1%. La electroelución se realizó a 4°C con una corriente constante de 100 V por 4 h.

Posteriormente se eliminó la acrilamida y cada membrana se dializó contra un volumen de 2 L de agua bidestilada (tres cambios de 40 minutos cada uno). Cada glicoproteína en solución se concentró por ultrafiltración (usando el mismo equipo y condiciones anteriormente señaladas) hasta un volumen aproximado de 1 ml. Posteriormente se tomó una alícuota de 15 µl para determinar la concentración de proteínas por Lowry y 50 µg de cada GP se emplearon para analizar su pureza por geles de poliacrilamida (PAGE) mediante la tinción de azul de coomassie (**anexo 6**).

Las glicoproteínas se congelaron a -70°C por 15 minutos. Bio-freezer (Forma Scientific), para después someterse a liofilización durante 4.5 hr en un liofilizador (Freeze drier 3 LABCONCO). Al término de la electroforesis el otro gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Protran BA83) en una cámara para electrotransferencia (Bio-rad Trans-blot cell) aplicando una corriente de 1A durante 1hr a 4°C. Para posteriormente evaluar los blots con los controles de sueros de pacientes negativos y positivos a cisticercosis (**anexo 7**).

6.4. Obtención de anticuerpos policlonales de conejo anti-GP24 y anti-GP39-42.

Para obtener anticuerpos específicos anti-GP24 y anti-GP39-42 se inmunizaron dos conejos de acuerdo a un protocolo establecido. La inmunización (IZ) se realizó por vía subcutánea (VS) usando adyuvante completo de Freund (ACF) en dilución 1:1 con la GP. El 1er refuerzo se realizó también por VS usando adyuvante incompleto de Freund (AIF) en dilución 1:1 con la GP. El 2º refuerzo se realizó por vía intramuscular sin adyuvante. Se tomó una muestra de sangre en la IZ y en cada refuerzo

para monitorear la producción de anticuerpos por ELISA (**anexo 8**). Por último, cada conejo fue sacrificado y sangrado a blanco hasta el día 35 después de la IZ.

GP	Concentración de antígeno	Inmunización	1er refuerzo a los 15 días	2° refuerzo a los 30 días
24	1 mg/ml	500 µl de GP + 500 µl de ACF por VS	500 µl de GP + 500 µl de AIF por VS	500 µl de GP por VI
39-42	1 mg/ml	500 µl de GP + 500 µl de ACF por VS	500 µl de GP + 500 µl de AIF por VS	500 µl de GP por VI

Los sueros de conejos anti-GP 24 y anti-GP 39-42 se evaluaron por IET contra FEG para analizar el reconocimiento de GP 24 y GP 39-42 (**anexo 7**).

6.5. Cromatografía Gas-Líquido (CGL)

6.5.1 Reacción de metilación

Para la CGL se usó inositol como estándar interno y se trató de la misma manera que a cada glicoproteína. Por separado 100 µg de GP 24 y GP 39-42 liofilizada y 10 µg inositol (cada uno se trató por separado) se les adicionaron 200 µl de metanol-HCl 0.5M por 24 h a 80°C. Las muestras estaban dentro de tubos de vidrio cubiertos con teflón dentro de un baño de hielo. Una vez pasadas las 24 hr esta solución ácida se neutralizó con solución de carbonato de plata 0.1M hasta un pH= 6.5.

6.5.2 Reacción de N-re-acetilación.

Una vez neutralizada la solución se adicionaron (dentro del mismo tubo) 10 μ l de anhídrido acético. Esta reacción se mantuvo durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente esta solución se centrifugó a 2000g por 5 minutos y se colectó el sobrenadante.

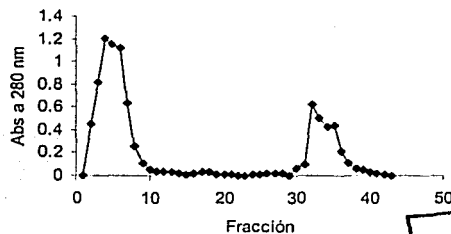
Al sobrenadante conteniendo los derivados trimetilsililados se le adicionó 20 μ l de bis-sililtrifluoroacetamida (BSTFA) en presencia de 10 μ l de piridina y se dejó con agitación por 2 hr a temperatura ambiente. En este paso final se obtienen los derivados metilglucósidos trimetilsililados (MGTS) en solución.

Se inyectaron 20 μ l de MGTS al cromatógrafo y se usó una columna capilar de 25 x 0.35mm con 5% de silicón OV 210, (Applied Science Lab., Buffalo, NY,USA), en un cromatógrafo de gas Varian (Orsay, France) equipado con un detector de flama e inyector de vidrio sólido; el cual utilizó gas helio como vector a una presión de 0.6 Bar y el intervalo de temperatura programado fue de 150°C a 250°C con incrementos de 3°C por minuto, como describe Zanetta y Montreuil^{66, 67}

7. RESULTADOS

7.1. Obtención de la FEG por cromatografía de afinidad

La columna de la lectina *Lens culinaris*, tenía una capacidad de retención (de acuerdo con el proveedor) de 3 mg de proteína por ml de gel de sefarosa hidratada; la columna que se empleo tenía un volumen de 25 ml por lo tanto, la capacidad de retención era de 75 mg de proteína. La FEG se obtuvo a partir de la fracción Sn 2 por cromatografía de afinidad con *Lens culinaris*, eluyendo con α -metilmanósido 0.2M. En todas las cromatografías realizadas, se mantuvo el mismo patrón de corrimiento. Todas las fracciones se leyeron en el espectrofotómetro a 280 nm. Para las proteínas que no fueron retenidas por la columna de *Lens culinaris*-sefarosa 4B la lectura fue hasta de 1.2 nm, pero al bajar a cero y adicionar el amortiguador de elusión Tris-NaCl- α -metilmanósido 0.2M, para recuperar las glicoproteínas retenidas por la columna (FEG), la lectura fue de 0.6 (Gráfica 1).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Grafica 1. Se observa el cromatograma de la purificación de FEG con la lectina *Lens culinaris*. Las fracciones de la 30 a 40 corresponden a la FEG.

Resultados

Al final de todo el procedimiento de purificación de la FEG se obtiene un rendimiento de 2.47 %, partiendo de la proteína total = 1.575 g y obteniendo finalmente 0.039 g de la FEG. Tomando en cuenta el valor de 1.575 g y 1.31 g como la proteína total después de la cromatografía se obtiene una recuperación del 83% (tabla 2).

proteína total (previo a la cromatografía con lentillectina)	Fracción	Volumen	Concentración mg/ml	Proteína obtenida
	Proteínas no retenidas	55 ml	23.28	1.28 g
90 ml (17.50 mg /ml) = 1.575 g	FEG	6 ml	6.5	0.039 g

Tabla 2. Muestra el porcentaje de rendimiento de FEG

Una vez obtenida la FEG 114 μg de esta, fueron sometidos a electroforesis en geles de gradiente de poliacrilamida del 5-22.5% y posteriormente se realizó la transferencia de estas glicoproteínas a nitrocelulosa para observar el reconocimiento específico de los anticuerpos y se lograron visualizar las glicoproteínas: GP50, GP39-42, GP24, GP21, GP18, GP14 y GP13 (figura 12).

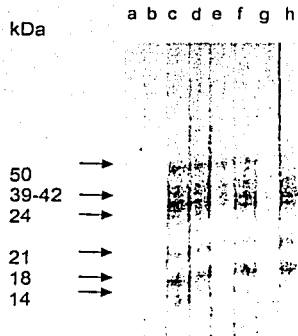


Figura 12. Inmunoelctrotransferencia de anticuerpos anti-cisticercos de pacientes con controles negativos (a y b) y positivos (c-h) para verificar el reconocimiento específico de los anticuerpos contra la FEG.

7.2. Obtención de la GP24 y GP39-42 de la FEG por electroforesis y electroelución.

Se analizó la pureza de la GP 24 y GP 39-42 por electroforesis en PAGE-SDS. Se colocaron 300 µg por carril de FEG y 50 µg por carril de GP 24 y GP 39-42 y posteriormente se tiñó el gel con azul de coomassie para visualizar las bandas de glicoproteínas purificadas y se observa una alta pureza de cada una de las glicoproteínas (figura 13).

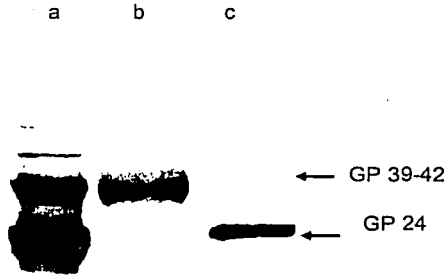


Figura 13. Electroforesis en PAGE-SDS del 5-22.5% a) fracción LL-GP b) GP 39-42 purificada y c) GP 24.

7.3 Reconocimiento de GP 24 y GP 39-42 por anticuerpos policlonales.

Se analizó el reconocimiento de la GP24 y la GP39-42 por los anticuerpos policlonales de conejo por IET. En el carril b se enfrentaron anticuerpos anti-GP 24 y en el carril c anticuerpos anti-GP 39-42 los dos contra la FEG y se puede observar un reconocimiento cruzado entre las dos glicoproteínas (figura 14).

TESIS CON
FALLA DE CUBRIR

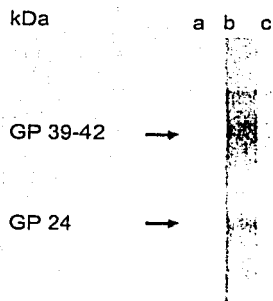


Figura 14. Inmuno-electrotransferencia de control negativo previo a inmunización a), anticuerpos anti-GP 24 b) y anticuerpos anti-GP 39-42 c). Los tres se enfrentaron contra FEG.

7.4 Cromatografía gas-líquido

La purificación por *Lens culinaris* y el análisis por CGL de la GP 24 y GP39-42 indican que las dos GPs tienen enlaces proteína-fracción glicano del tipo **N-glicosídico** y los carbohidratos presentes en diferente proporción son: manosa, N-acetil-glucosamina (GlcNac) y galactosa, no obstante la manosa se encuentra en proporción mayor en las dos GPs, indicando que estas GPs poseen estructuras ricas en manosa. Además se observa que GP 24 se encuentra más glicosilada que la GP 39-42.

No se encontró ácido N-acetilneuramínico, fucosa y ácido siálico que se han encontrado en otras glicoproteínas eucariontes (tabla 3).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Residuo	GP24	GP 39-42
Manosa	9.7	5.9
GlcNac	4.8	1.6
Galactosa	3.7	0.9
Total	18.3	18.3

Tabla 3. Porcentaje de carbohidratos M/M de las glicoproteínas inmunodominantes GP39-42 y GP24 de cisticercos de *Taenia solium*. No se encontró ácido N-acetilneuramínico, fucosa o ácido siálico.

La *Lens culinaris* tiene afinidad por glicoproteínas que poseen enlace proteína-fracción carbohidrato del tipo **N-glicosídico** y que además poseen GlcNac, manosa y galactosa. Del análisis obtenido por la CGL y la afinidad de *Lens culinaris* se proponen las siguientes estructuras para la porción glicano de la GP 24 (figura 15) y GP 39-42 (figura 16).

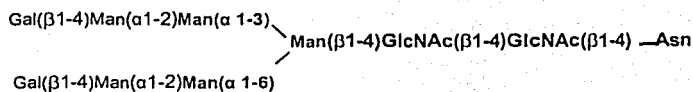


Figura 15. Estructura propuesta para la GP 24 donde se muestra el enlace N-glicosídico y el enlace manosa (β1-4) unido por dos residuos de manosa con enlaces Man(α 1-3) y Man(α 1-6).

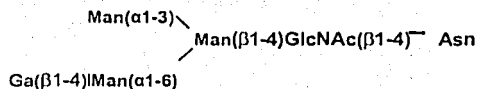


Figura 16. Estructura propuesta para la GP 24 donde se muestra el enlace N-glicosídico y el enlace manosa (β1-4) unido por dos residuos de manosa con enlaces Man(α 1-3) y Man(α 1-6).

8. DISCUSIÓN

La cisticercosis por *Taenia solium* es una importante causa de enfermedad neurológica en muchas ciudades de América Latina y Asia. Recientemente ha sido descrita como una enfermedad emergente en ciudades desarrolladas a causa de inmigrantes infectados con la forma adulta de *Taenia solium* lo cual puede producir nuevos casos de cisticercosis humana en países donde esta enfermedad no es endémica⁶⁸.

El alto costo de la TAC y la RMN ha hecho necesaria la purificación y caracterización de componentes antigénicos de las glicoproteínas del cisticerco, para llegar a establecer un diagnóstico más accesible e igual de específico que la IET. Además de que los antígenos de membrana son estudiados en varios parásitos debido a que tienen importantes funciones como la absorción de nutrientes, eliminación de desechos y mecanismos de evasión inmune^{3,4,62}.

Con el objetivo de determinar y caracterizar los carbohidratos presentes en la GP24 y GP39-42, estos antígenos inmunodominantes se purificaron de la FEG, se sometieron a electroforesis para determinar su pureza y finalmente se liofilizaron para posteriormente analizar sus carbohidratos por CGL.

Hay una estrecha relación bioquímica e inmunológica entre GP24 y GP39-42 como lo muestra el análisis de carbohidratos y la IET donde se observa reacción cruzada de los anticuerpos producidos contra cada una de las dos glicoproteínas, lo que sugiere la presencia de epítomos compartidos. Los resultados del análisis de carbohidratos muestran que las dos glicoproteínas contienen los mismos carbohidratos pero en diferente proporción: manosa, N-acetil-D-glucosamina y galactosa en porcentajes de: 9.7%, 4.8% y 3.7% para GP 24 y de 5.9%, 1.6% y 0.9% para GP 39-42. Comparando los porcentajes de carbohidratos de las dos glicoproteínas, llama la atención que la GP24 esté más glicosilada que la GP39-42 probablemente debido a que la GP24 se encuentra más expuesta al huésped y probablemente esté involucrada en mecanismos de evasión inmune lo que ocasiona que las dos GPs sigan mecanismos de modificaciones postraduccionales diferentes.

La *Lens culinaris* es una lectina que posee alta afinidad por residuos carbohidrato de GluNAc, que puede enlazarse a oligosacáridos con enlace N-glicosídico con estructura biantenaria. Los oligosacáridos que contienen residuos de GluNAc y manosa con enlace (β 1-4) unida a dos residuos de manosa con enlaces (α 1-3) y (α 1-6) con estructura biantenaria son los que se unen a la lectina. Este tipo de estructura se ha encontrado en otras glicoproteínas purificadas por *Lens culinaris* como la lactotransferrina humana, la IgG de mieloma humano⁶⁹.

La glicosilación de las proteínas es un proceso postraducciona que ocasiona gran polimorfismo en la estructura de los oligosacáridos que están formando parte de una glicoproteína. Debido a que la secuenciación de los carbohidratos en las glicoproteínas no está determinada genéticamente se ha complicado su purificación y análisis, además casi

todas las glicoproteínas revelan polimorfismo asociado a las diferentes estructuras en sus residuos carbohidrato, fenómeno denominado como "microheterogeneidad"⁶⁷. Es comprensible que los oligosacáridos presenten una gran variedad de estructuras aún teniendo la misma secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, en ovomucoide que contiene un sólo sitio de glicosilación, Fournet⁷⁰ ha caracterizado más de 25 diferentes estructuras de oligosacárido para la misma glicoproteína y Vliegthart *et al*⁷¹, han descrito 30 diferentes oligosacáridos en la glicoproteína de Tam y Horsfall, la cuál exhibe por lo menos cinco sitios de glicosilación. Debido a que el proceso de glicosilación es llevado a cabo por glicosiltransferasas específicas, que son producto de una conservación evolutiva, los procesos de conformación en la estructura de un glicano naciente son un campo abierto a la investigación de bioquímica comparativa y filogenia de la genética de las glicosiltransferasas, que junto con los estudios de histoquímica para detectar los diferentes residuos carbohidrato en el parásito y la inmunohistoquímica para la localización de la GP24 y GP 39-42 en el cisticercos nos ayudarán a comprender la función que desempeñan estos antígenos y tener un mayor conocimiento de la relación hospedero-parásito.

9. CONCLUSIONES

- El reconocimiento cruzado de los anticuerpos contra GP 24 y GP 39-42, así como la estrecha relación bioquímica entre las dos, sugiere la presencia de epítomos compartidos.

- Las dos glicoproteínas GP 24 y GP 39-42 tienen enlace proteína-fracción carbohidrato del tipo **N-glicosídico**, poseen los mismos carbohidratos pero en diferente proporción: manosa, N-acetil-D-glucosamina y galactosa en porcentajes de: 9.7%, 4.8% y 3.7% y de 5.9%, 1.6% y 0.9% para cada glicoproteína respectivamente.
- La estructura propuesta para las dos glicoproteínas es del tipo biantenarico y con un esqueleto interno en común con residuos de GlcNAc con enlaces (β 1-4) y manosa unida a dos manosas con enlaces (α 1-3) y (α 1-6)
- Estos resultados abren un amplio campo de investigación en biología molecular (para poder mejorar el diagnóstico), así como en la histoquímica e inmunohistoquímica, para ayudarnos a comprender aspectos de la relación hospedero-parásito.

10. PERSPECTIVAS.

- Realizar histoquímica para la localización de residuos carbohidrato en los tres estadios del parásito, usando diferentes lectinas con especificidad para diferentes residuos carbohidrato
- Dado que *T.solium* carece de aparato digestivo su principal fuente de nutrientes son los carbohidratos, entonces pueden usarse carbohidratos marcados y verificar su incorporación al parásito.
- Buscar glicosiltransferasas específicas para *T.solium* usando biología molecular.

- **Hacer Inmunohistoquímica** para la localización de los antígenos inmunodominantes GP24 y GP39-42, a través de la producción de anticuerpos contra cada una de las glicoproteínas.

11. ANEXOS

11.1 Anexo 1. Cuantificación de proteínas Lowry.

Estándar de albúmina sérica bovina (BSA): 1 mg/ml

Tubo	Concentración de BSA mg/ml
1	0.500
2	0.2500
3	0.1250
4	0.0625
5	0.0313
6	0.0156
7	0.0078
8	0.0039

NOTA: los tubos de la curva estándar, el blanco y la muestra deben contener 1 ml de PBS (anexo 2).

Reactivos: Solución de Lowry:

1. carbonato de sodio anhidro al 2% en hidróxido de sodio 0.1M ó 0.1N.....	9.8 ml
2. tartrato de sodio y potasio al 2%.....	0.1 ml
3. sulfato cúprico al 1%.....	0.1 ml
	10.0 ml

- Agregar a cada tubo 4 ml de la solución de Lowry y agitar bien.
- Incubar durante 10 min. a temperatura ambiente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Agregar rápidamente y con agitación: 0.4 ml de una solución 1:1 del reactivo de Folin-Ciocalteu y agua destilada.
- Incubar 30 min. a temperatura ambiente y leer en el espectrofotómetro a 600 nm. (la reacción es estable durante 1 hr).

11.2 Anexo 2. Solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

Solución A

- **fosfato de sodio monobásico monohidratado** ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O}$) 0.01 M.....1.38 g.
- **cloruro de sodio** (NaCl) 0.15 M.....8.77 g.

Aforar a 1L con agua destilada.

Solución B

- **fosfato de sodio dibásico dodecahidratado** ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12\text{H}_2\text{O}$) 0.01 M.....4.30 g
- **cloruro de sodio** (NaCl) 0.15 M.....10.52 g.

Aforar a 1.2 L con agua destilada.

Combinar la solución A con la B y esterilizar.

Nota: si se requiere usar tween agregar 3ml de tween 20 por cada 1000ml de PBS

11.3 Anexo 3. Sistema de geles en gradiente de acrilamida del 5% al 22.5%.

Se emplean:

- Una cámara para 10 geles de 0.75 mm de grosor (multicaster HSI, SE 600 SERIES).
- 20 vidrios de 18 x 8cm (Pharmacia Biotech SE 6402).
- 40 separadores de 2 x 8 x 0.75cm (Pharmacia Biotech SE 6419-275).
- Cinta de sellado para geles de 1.5 pulgadas (Gibco-BRL 11032-018).

La cámara preparada con las placas de vidrio para los geles, se conecta a un sistema que consta de una bomba peristáltica LKB BROMMA 12,000 (VARIOPERPEX) y de unos vasos conectores marcadores de gradiente (HSI,SG SERIES). Se preparan las soluciones correspondientes y se hacen pasar por dicho sistema.

Soluciones	5 %	22.5%
agua destilada	30.88 ml	8.44 ml
Tris	12.99 ml	12.99 ml
acrilamida al 40%- bisacrilamida al 1%	6.49 ml	29.24 ml
Temed	0.810 ml	0.810 ml
Persulfato de amonio	0.800 ml	0.490 ml
Volumen total	51.97 ml	51.90 ml

El lote de 10 geles preparados al mismo tiempo, se deja polimerizar toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente la cámara se

desmonta y los geles se almacenan a 4°C en un recipiente con agua destilada hasta su uso.

NOTA: los geles preparados por este sistema tienen una vigencia de 8 días.

Reactivos:

- **tris 4x.** 205.6 g de Tris-base en 1 L. Ajustar a pH = 9.18 con ácido clorhídrico concentrado.
- **acrilamida al 40%-bisacrilamida al 1%.** Pesar 40 g de acrilamida y 1 g de bisacrilamida, disolver en agua destilada, aforar a 100 ml y filtrar en membrana de 45µm, almacenar a 4°C aislada de la luz, Esta solución sólo dura 3 meses. Se recomienda prepararla un día antes de su uso.
- **temed.** 250µl y 1.8 ml de agua destilada.
- **persulfato de amonio.** 25 mg y 3 ml de agua destilada.

Gel superior (concentrador).

- **acrilamida al 12%-Bisacrilamida al 1.2%**.....2 ml.
- **amortiguador del gel superior**.....2 ml.
- **temed**.....6µl.
- **agua destilada**.....4 ml.
- **persulfato de amonio**.....150 µl.

persulfato de amonio. Preparado en el momento de su uso 25 mg y 3 ml de agua destilada.

amortiguador del gel superior. Disolver 2.62 g de TRIS en 50 ml de agua destilada, ajustar a pH = 6.14 con ácido sulfúrico 2M y aforar a 100 ml.

temed. 250 µl de TEMED y 1.8 ml de agua destilada.

Solución amortiguadora de la cámara superior (SACS).

- ácido bórico.....2.47 g
- tris-base.....4.92 g.

Aforar a 1L con agua destilada. Para su uso se colocan 495 ml de SACS y se adicionan 5 ml de SDS al 10%.

Solución amortiguadora de la cámara inferior (Stock 4x)

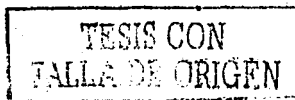
205.6 g de TRIS-base se disuelven en 750 ml de agua destilada, se ajusta a pH = 9.18 con ácido clorhídrico concentrado y se afora a 1L.

Solución de trabajo 1x

Tomar 500 ml del stock 4x y aforar a 2 L con agua destilada.

11.4 Anexo 4. Amortiguador para muestras de geles de acrilamida (AMGA) o cocktail.

- dodecil sulfato de sodio (SDS).....0.1 g.
- EDTA.....7.4 mg.
- glicerol.....1.0 ml.



Aforar a 10 ml con TRIS-HCl 0.05 M y adicionar una pizca de azul de bromofenol, filtrar por membrana de 45 μ m y almacenar en alicuotas a -20°C hasta su uso.

11.5 Anexo 5. Patrón de pesos moleculares preteñidos.

El rango de peso molecular es de 14,300-200,000 Da y se reconstituyen con 500 μ l de DTT (Dithiothreitol) 1 mM. y se almacenan en alicuotas a -20°C. hasta su uso.

Los pesos moleculares preteñidos se emplean sólo como herramientas cualitativas para determinar el tamaño aproximado de la proteína analizada.

Los pesos moleculares reales de las proteínas no modificadas, están reportados en la literatura y los pesos moleculares aparentes que presentan las proteínas preteñidas son los siguientes:

Proteína	Peso molecular reportado (Da)	Peso molecular aparente (Da)
Lisozima	14,300	15,350
Beta-lactoglobulina	18,400	18,850
anhidrasa carbónica	29,000	28,350
Ovoalbúmina	43,000	43,600
albúmina sérica bovina	68,000	69,100
Fosforilasa B	97,000	106,300
miosina (cadena H)	200,000	199,100

11.6 Anexo 6. Tinción para geles de acrilamida con azul de coomassie.

- metanol al 50%.....454 ml.
- azul de coomassie.....1.25 g.
- ácido acético al 7%.....46.0 ml.

1. Mezclar los reactivos y agitar hasta homogenizar perfectamente. Filtrar para remover cualquier material insoluble antes de su uso.
2. Colocar el gel en un recipiente y cubrirlo totalmente con el colorante, al menos por 3 hr a temperatura ambiente ó 30 min. con calentamiento. El tiempo requerido depende del grosor y la concentración del gel.
3. Desteñir el gel con ácido acético al 10% aplicando calor y realizar varios cambios, hasta obtener bandas teñidas de color azul contra el fondo transparente del gel.

11.7 Anexo 7. Evaluación de blots

1. Colocar las placas para incubación de los sueros sobre un agitador de vaivén. Cada carril requiere un volumen de 500µl.
2. Preparar leche descremada al 5% en PBS-tween20 al 0.3%.
3. Hacer las diluciones de sueros (positivos, negativos y problemas) en la solución de leche anterior.
 - Suero de humano dilución 1:100
 - Suero de conejo dilución 1:250.
4. Colocar las tiras de blot en cada suero ya diluido e incubar 1 hr a tem. amb. con agitación constante.

5. Desechar la leche y lavar con un volumen de 500µl 3 veces por 5 min cada uno con PBS-tween 20 al .03%.
6. Preparar la dilución del 2° anticuerpo o conjugado acoplado a peroxidasa en PBS-tween 20 al 0.3% y adicionar 500µl por carril anti-IgG(cadena gama) humana dilución 1:500
anti-IgG conejo (molécula completa) dilución 1:250.
7. Desechar el 2° anticuerpo y lavar como en paso 5.
8. Lavar dos veces más por 5 minutos cada una con PBS sin tween.
9. Preparar el sustrato para peroxidasa con diaminobencidina⁽¹⁾ (DAB) a partir de la solución stock y adicionar 500µl por carril.
10. Incubar hasta aparición de bandas color café (aproximadamente 10-15 min.)
11. Detener la reacción con agua destilada y lavar 3 veces con agua destilada.

Sustrato para peroxidasa con diaminobencidina⁽¹⁾

No de tiras de blot	PBS	Peróxido de hidrógeno al 30%	Solución stock de DAB
10	5ml	0.5µl	50µl
20	10ml	1µl	100µl
40	20ml	2µl	200µl

Solución stock de DAB

- diaminobencidina.....0.5g.

Mezclar con 10ml de PBS sin tween y agitar hasta completa disolución, almacenar en alícuotas de 100µl protegidas de la luz a -20°C.

11.8 Anexo 8. ELISA para determinar título de anticuerpos de conejos inmunizados.

Se emplean placas de fondo plano de 96 pozos tipo Immunolon 1 Dynatech.

1. El antígeno (extracto crudo de cisticercos) se diluye 1:400 con la solución amortiguadora de carbonatos pH= 9.6. Se adicionan 100µl por pozo de esta dilución.
2. Se incuba la placa por toda la noche a 4°C.
3. Se elimina la solución y se lava con 200µl por pozo 3 veces por 5 min con PBS-tween.
4. Se realizan diluciones consecutivas (en la misma placa) del suero de cada conejo por separado 1: 100, 1:200, 1:400 etc.
5. Se incuba la placa por 30 min a 37°C.
6. se repite el paso 3.
7. Se prepara el 2° anticuerpo o conjugado con peroxidasa en dilución 1:250 y se adicionan 100µl por pozo.
8. repetir el paso 5.
9. Repetir el paso 3.
10. Preparar el sustrato para peroxidasa con hidrocloreuro de orto-fenilendiamina (OPD). y adicionar 100 µl. Mantener la placa en oscuridad.
11. Detener la reacción con ácido sulfúrico H₂SO₄ 1M (5 ml de H₂SO₄ en 100ml de agua destilada.
12. Leer la placa a 492 nm.

Reactivos para ELISA
Solución amortiguadora de carbonatos pH=9.6

- carbonato de sodio anhidro 0.003 M.....0.159g.
- carbonato ácido de sodio 0.069 M.....0.293g.
- azida de sodio 0.0061 M.....0.020g.

Pesar y disolver todos los reactivos en 30ml de agua destilada y aforar a 50ml con agua destilada, filtrar por membrana de 0.20 μ m y almacenar a 4°C.

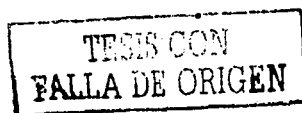
Solución amortiguadora de fosfatos

- cloruro de sodio 0.015 M.....16g.
- fosfato de potasio dibásico 0.0014 M.....0.4g.
- fosfato de sodio dibásico 0.02 M.....5.8g.
- cloruro de potasio 0.0026 M.....0.4g.
- azida de sodio 0.0061 M.....0.4g.
- tween 20 al 0.03%.....6ml.

Pesar y disolver todos los reactivos, adicionar 6ml de tween 20 en 1000ml de agua destilada y aforar a 2000ml con agua destilada, filtrar por membrana de 0.20 μ m y almacenar a 4°C.

Sustrato de OPD para peroxidasa

- hidrocloreuro de orto-fenilendiamina (OPD).....0.004g.
- solución amortiguadora de citratos(*) pH=4.5.....10ml.
- peróxido de hidrógeno al 30%.....4 μ l.



(*) Preparar de la siguiente manera:

Solución A

- ácido cítrico 0.1 M.....21g.

Solución B

- citrato de sodio 0.1M.....29.4g.

Tomar 25.5ml de la solución A, mezclarlos con 24.5ml de la solución B y aforar a 100ml. Filtrar por membrana de 0.20 μ m y almacenar a 4°C.

12. BIBLIOGRAFIA.

1. Plancarte A, flisser A, G Gauci C, W Lightowers M. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. Int J Parasitol 1999; x. 1-5.
2. Tsang VCW, Brand AJ, Boyer AE. An enzyme -linked immunoelectrotransfer blot assay by glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). J Infect Dis 1989; 159: 50-59.
3. Linder E, Huldt G. Distribution of exposed and hidden carbohydrates of *Schistosoma mansoni* adult worms demonstrated by selective lectin binding of fluorochrome conjugated lectins. Parasitol 1982; 85. 503-509.
4. Schmidt J. Expression of glycoconjugates on normally developing and immunologically impaired *Hymenolepis diminuta*. Parasitol Res. 1988; 75, 155-161.
5. Flisser A, Madrazo I, Plancarte A, Schantz P, Allan J, Craig P, Sarti E. Neurological symptoms in occult neurocysticercosis after single taeniocidal dose of praziquantel. The lancet. 1993; 342. 748.
6. Craig, Faust. Clinical Parasitology. Philadelphia. Lea & Febiger 1970; 529-535.
7. Zenteno, A, G. "A clasification of human cysticercosis", in Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura y F. Beltrán (eds): New York: Academic Press; 1982; 107-126.
8. Yoshino K. On the evacuation of eggs from detached gravid proglottids of *Taenia solium* and on the structure of its eggs. Taiwan Igakkai Zasshi. 1934; 33:47-58. Summary.

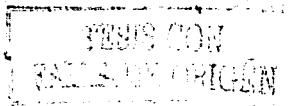
TESIS
CITA
FALLA DE ORIGENESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

9. Laclette JP, Ornelas Y, Merchant MT, Willms K. Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs, In Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F (eds): Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives, New York: Academic Press; 1982; 375-387.
10. Rabiela MT, Rivas A, Castillo S, Cancino F. Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis, In Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F (eds): Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives, New York: Academic Press; 1982; 179-200.
11. Berman JD, Beaver PC, Cheever AW, Quindlen EA. Cysticercus of 60-milliter volume in human brain. Am J Trop Med Hyg. 1981; 30: 616-619.
12. Rabiela MT, Rivas A, Flisser A. Morphological types of *Taenia solium* cysticerci. Parasitol Today. 1989; 5: 357-359.
13. Cook GC. Neurocysticercosis: Parasitology, clinical presentation, diagnosis and recent advances in management. Quarterly J Med. New Series. 1988; 68: 575-583.
14. Estañol B, Corona T, Abad P. A prognostic classification of cerebral cysticercosis: therapeutic implications. J Neurol Neurosurg Psychiat. 1986; 49: 1131-1134.
15. Sotelo J, Guerrero V, Rubio F. Neurocysticercosis: a new classification based on active and inactive forms. A study of 753 cases. Arch Intern Med. 1985; 145: 442-445.
16. Rabiela MT, Lombardo L, Flores F. Cisticercosis cerebral. Estudio de 68 casos de autopsia. Patología (Mex) 1972; 10: 27-40.
17. Medina MT, Rosas E, Rubio-Donnadieu F, Sotelo J. Neurocysticercosis as the main cause of late-onset epilepsy in Mexico. Arch Intern Med. 1990; 150: 325-327.

18. Escobar A, Nieto D. Parasitic diseases, In Pathology of the nervous system. Minckler J (ed). Vol. 3, New York MC Graw-Hill. 1972; 2507-2515.
19. Almeida-Pinto J, Veiga-Pires JA, Stocker A, Coelho T, Montero L. Cysticercosis of the brain. The value of computed tomography. Acta Radiol. 1988, 29: 625-628.
20. Nash TE, Neva FA. Recent advances in the diagnosis and treatment of cerebral cysticercosis. N Engl J Med. 1984; 311: 1492-1496.
21. Zhipiao XB, Wen-Kai C, Hui-lan Z, Man-ling F, Wei-ji C. Praziquantel in treatment of cysticercosis cellulosae. Report of 200 cases. Chinese Med J. 1985; 98: 489-494.
22. Wadia N, Desai S, Bhatt M. Disseminated cysticercosis. New observations, including CT scan findings and experience with treatment by praziquantel. Brain. 1988; 111: 597-614.
23. Tavares AR. Neurocysticercosis in the elderly. J Am Geriatr Assoc. 1993; 41, 781.
24. Rodríguez Carbajal J, Boleaga DB, Dorisman J. El diagnóstico de la neurocisticercosis humana por tomografía computarizada, en cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. 1989: 77-86.
25. Moses A. Dos métodos biológicos de diagnóstico nas cisticercoses. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1911; 3: 322-326.
26. Flisser A, Tarrab R, Willms K, Larralde C. Inmunoelectroforesis y doble inmunodifusión en el diagnóstico de la cisticercosis cerebral humana. Arch Invest Med (Méx) 1975; 6: 1-12.
27. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. J Immunol 1972; 109: 129-135.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

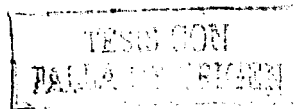
28. Guerra G, Flisser A, Cañedo L, Laclette JP. Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of *Taenia solium*. In Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F (eds): Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives, New York: Academic Press; 1982; 437-451.
29. Espinoza B, Ruiz Palacios G, Tovar A, Sandoval M, Plancarte A, Flisser A. Characterization by enzyme linked immunosorbent assay of the humoral response in patients with neurocysticercosis and its applications in immunodiagnosis. J Clin Microbiol 1986; 24: 536-541.
30. Schantz PM, Sarti E, Plancarte A, Wilson M, Criales JL, Roberts J, Flisser A. Community-Based epidemiological investigation of cysticercosis due to *Taenia solium*: Comparison of serological screening test and clinical findings in two population in Mexico. Clin inf Dis 1994; 18: 879-885.
31. Aluja A, Villalobos AM, Plancarte A, Rodarte LF, Hernández M, Sciutto E. Experimental *Taenia solium* cysticercosis in pigs: characteristics of the infection and antibody response. Vet Parasitol 1996; 61: 49-59.
32. Flisser A, Madrazo I, Delgado H. Cisticercosis humana. El Manual Moderno, 1998. pp171.
33. Aluja AS. Frequency of porcine cysticercosis in Mexico. En Cysticercosis: In Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F (eds): Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives, New York: Academic Press; 1982; 437-451.
34. Rabiela MT, Rivas A, Rodríguez IJ. Consideraciones anatomopatológicas de la cisticercosis cerebral como causa de muerte. Patología 1979; 17: 119-124.



35. Velasco Suarez M, Bravo MA, Quirasco F. Human cysticercosis: medical-social implications and economic impact. In Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F (eds): Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives, New York: Academic Press; 1982; 47-51.
36. Aranda-Alvarez JG, Tapia-Romero R, Alcántara-Anguiano I, Meza-Lucas A, Mata-Ruiz O, Celis-Quintanal G, Grijalva-Otero IE, Correa D. Human cysticercosis: risk factors associated with seric antigens in an open community of Mexico. *Ann Trop Med Parasitol* 1995; 89: 689-692.
37. Díaz- Camacho S, Candil A Uribe M, Willms K. Serology as an indicator of *Taenia solium* tapeworm infections in a rural community in Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84: 553-566.
38. García-García ML, Torres M, Correa D, Flisser A, Sosa -Lechuga A Velasco O, Meza-Lucas A, Plancarte A, Avila G, Tapia R, Aguilar L, Mandrujano A, Alcántara I, Morales Z, Salcedo A, Manon ML, Valdespino JL. Prevalence and risk of cysticercosis and teniasis in an urban population of soldiers and their relatives. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 61: 386-389
39. Keilbach N, Aluja A, Sarti E. A programme to control taeniosis and cysticercosis (*Taenia solium*). Experiences in a Mexican Village. *Acta Leidensia* 1989; 57: 181-189.
40. Sarti E, Schantz PM, Lara-Aguilera R, Gómez-Dantes H, Flisser A. *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a Mexican village. *Trop Med Parasitol* 1988; 39: 194-198.
41. Sarti E, Schantz PM, Plancarte A, Wilson M, Gutierrez I López A, Roberts J, Flisser A. Prevalence and risk factors for *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis in human an pigs in a village in Morelos, Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 46: 677-684.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

42. Díaz-Camacho S, Candil R, Suate P, Zazueta R, Félix M, Lozano R, Willms K. Epidemiologic study and control of *Taenia solium* infections with praziquantel in a rural village of Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 45: 522-531.
43. Sarti E, Schantz PM, Avila G, Ambrosio J, Medina-Santillan R, Flisser A. Mass Treatment against human taeniasis for the control of cisticercosis: a population-based intervention study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 94: 85-89.
44. Montreuil J. Glycoprotein structure and conformation: an overview: In *Methods on glycoconjugates*: Montreuil J, Bouquelet S, Cacan R, Debray H, Fournet B, Michalski JC, Spik G y Strecker G. Harwood Academic Publishers; 1995; 1,2.
45. Robertson ER, Kennedy JF. Glycoproteins: Aconsideration of the potencial problems and their solutions with respect to purification and characterisation. *Bioseparation* 1996; 6: 1-15.
46. Debray H, Decout D, Strecker G, Spik G, Montreuil J. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. *Eur J Biochem* 1981; 117: 41-55.
47. Allen HJ, Kisailus EC. *Glycoconjugates. Composition, Structure and Function.* 1992. Marcel Dekker, New York.
48. Kobata A. Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *Eur J Biochem.* 1992; 209: 483-501.
49. Fournet B, Strecker G, Leroy Y, Motreuil J. Gas-liquid chromatography and mass spectrometry of methylated and acetylated methyl glycosides. Application to the structural analysis of glycoprotein glycans. *Anal Biochem.* 1981; 116: 489-502.
50. Lasam S, Mc Manus DP. Molecular characterization of the surface and cyst fluid components of *Taenia crassiceps*. *Parasitol.* 1990; 101: 115-125.



51. Smyth JD, Mc Manus DP. The physiology and biochemistry of cestodes. Cambridge University Press; 1989:5-10.
52. Larralde C, Sassa S, Vanderkooi JM, Koloczek H, Lacleite JP, Goodsaid F, Sciutto E, Owen C. Analysis of porphyrins and enzymes in porphyrin synthesis in *Taenia solium* cysticercus from man and pig. Mol Bioch Parasitol. 1987; 22: 203-213.
53. Larralde C, Martinez-Cedillo G, Lagunoff D, Ludowyke R, Montoya RM, Goodsaid F, Dreyfus G, Sciutto E, Govezenky T, Díaz ML. Porphyrin content of the cysticercus of *Taenia solium*. J Parasitol. 1986, 72: 569-577.
54. Torre-Blanco A. The collagen of *Cysticercus cellulosae*: a study in the comparative biochemistry of collagen In Flisser A, Willms K, Lacleite JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F (eds): Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives, New York: Academic Press; 1982; 423-436.
55. Martinez-Zedillo G, Gonzalez-Barranco D, Perez-Gonzalez M, Gonzalez -Angulo A. Cholinesterases of *Cysticercus cellulosae* In Flisser A, Willms K, Lacleite JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F (eds): Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives, New York: Academic Press; 1982; 413-422.
56. White AC, Molinari JL, Pillai AV, Rege AA. Detection and preliminary characterization of *Taenia solium* metacestode proteases. J Parasitol. 1992; 78: 281-287.
57. Parkhouse RM, Harrison LJS. Cyst fluid and surface associated glycoprotein antigens of *Taenia solium* species metacestodes. 1987; 9: 263-268.
58. Knowles WJ, Oaks JA. Isolation and partial biochemical characterization of the brush border plasma membrane from the cestode, *Hymenolepis diminuta*.. J Parasitol; 65: 715-731.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Bibliografía

59. Cervantes M, González-Angulo A, Márquez-Monter H. Anatomía bioquímica del *Cysticercus cellulosae*. I. Estudio histoquímico y análisis por energía dispersiva de rayos X: ácidos, mucopolisacáridos, glucógeno, grasa, ADN, calcio y hierro. Patología. (Méx) 1986; 24: 209-218.
60. Smyth JD, Mc Manus DP. The adult cestode: special structural features relevant to its physiology: in The physiology and biochemistry of cestodes. Cambridge:Cambridge University Press; 1989: 12-14.
61. Grau E, Garrido F, Cañedo L. Calcification of the cysticerci of *Taenia solium* in the human brain In Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F (eds): Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives, New York: Academic Press; 1982; 499-515.
62. Langley JG, Dunne DW. Temporal variation in the carbohydrate and peptide surface epitopes in antibody-dependent, eosinophil-mediated killing of *Schistosoma mansoni* schistosomula. Parasite Immunol. 1992; 14: 185-200.
63. Lowry O, Rosenbrough N, Lewis-Farr A, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193: 265-275.
64. Ratchford C, Dahmus H. Rapid visualization of proteins bands in preparative SDS polyacrylamide gels. Biochem. 1979; 93: 257-260.
65. Harlow S, Lane D. Antibodies: A laboratory manual, Elsevier, Amsterdam. 1989:70.
66. Zanetta J, Breckenridge WC, Vincendon G. Analysis of monosaccharides by gas-liquid chromatography of the o-methyl glycosides as trifluoroacetate derivatives. J Chromatogr; 1972:69: 291-304.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

67. Michalski Jean-Claude. Analysis of monosaccharides by GLC and by HPLC: In Methods on glycoconjugates: Montreuil J, Bouquelet S, Cacan R, Debray H, Fournet B, Michalski Jean-Claude, Spik G y Strecker G. Harwood Academic Publishers; 1995; 31-35.
68. Schantz PM, Moore AC, Muñoz JL, Hartman BJ, Schaefer JA, Aron AM, Persaud D, Sarti E, Wilson M, Flisser A. Neurocysticercosis in an orthodox jewish community in New York City. N Engl J Med 1992; 327: 692-695.
69. Kornfield R, Ferris C. A potent inhibitor for *Lens culinaris* is glycopeptide isolated from myeloma IgG. J Biol Chem. 1975; 250:2614-2619.
70. Fournet B. Gas-liquid chromatography and mass spectrometry of oligosaccharides obtained by partial acetolysis of glycans of glycoproteins. Anal Chem. 1980; 108: 35-56.
71. Vliegenthart JFG, Dorland L, Van Halbeek H. High resolution, H-NMR spectroscopy as a tool in the structural analysis of carbohydrates related to glycoproteins. Adv Carbohydr Chem Biochem. 1983; 41: 202-374.

TESIS COM
FALLA DE ORIGEN