



# Universidad Nacional Autónoma de México

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del C. C. H.  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

COMPONENTES DE SUPERFICIE EN EL METACESTODO DE LA Taenia solium

## T E S I S

Que para obtener el grado de Doctor en  
Investigación Biomédica Básica presenta el

M. en C. JUAN PEDRO LACLETTE SAN ROMAN

1985



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.

Dedico esta tesis a la memoria de mis padres, Rosario y Enrique, a quienes hubiera querido entregar un ejemplar.

Asimismo, dedico esta tesis a mi esposa Tila y a mi hija Tilita (un año), por su ayuda para mantener mi compromiso con la vida.

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue realizada en el laboratorio y bajo la dirección de la Dra. Kaethe Willms, a quién agradezco profundamente la oportunidad, la información y la formación recibidas.

Agradezco la revisión del manuscrito de tesis por parte del comité de sinodales formado por los Dres.: Aline S. de Aluja, Jesús Calderón, Lino Díaz de León, Raúl Mancilla, Adolfo Martínez Palomo, Librado Ortíz-Ortíz y Kaethe Willms; cuyos comentarios y sugerencias mejoraron substancialmente la presentación del trabajo.

Agradezco a los compañeros del laboratorio: Lourdes Arcos, Alicia Díaz, Guadalupe Guerra, Abraham Landa y Marie Merchant; por la ayuda recibida que rebasa con mucho el nivel técnico y quienes hacen que el trabajo cotidiano sea estimulante y amistoso.

Agradezco a los Dres. Ana Flisser y Carlos Larralde porque a lo largo de diversas colaboraciones han influenciado positiva y definitivamente mi posición ante la investigación científica.

Agradezco la colaboración de los Dres. Alejandro Alagón y Alfonso - Torre Blanco en los experimentos de cromatografía de afinidad del antígeno B.

Agradezco diversas ayudas técnicas del Biol. Braulio Centeno y de los Sres. José Aviles, Ismael Ramírez y Esperanza Ruiz.

INDICE

|   | página |
|---|--------|
| Capítulo I. <u>INTRODUCCION</u>   |        |
| 1. <u>BIOLOGIA DEL PARASITO</u>   | 1      |
| a) <u>Ciclo de vida</u>   | 1      |
| b) <u>Morfología del desarrollo</u>   | 3      |
| c) <u>Inseminación y Fertilización</u>                                      | 7      |
| 2. <u>IMPORTANCIA DE LA ENFERMEDAD EN MEXICO</u>                            | 8      |
| a) <u>Prevalencia y distribución geográfica de la cisticercosis humana</u>  | 8      |
| b) <u>Prevalencia y distribución geográfica de la cisticercosis porcina</u> | 10     |
| c) <u>Impacto económico de la cisticercosis</u>                             | 12     |
| 3. <u>DESCRIPCION DE LA ENFERMEDAD</u>                                      | 13     |
| a) <u>Sintomatología de la cisticercosis humana</u>                         | 13     |
| b) <u>Sintomatología de la cisticercosis porcina</u>                        | 16     |
| Capítulo II. <u>ANTECEDENTES</u>  | 18     |
| 1. <u>RESPUESTA INMUNOLOGICA DEL HUESPED</u>                                | 19     |
| a) <u>Cisticercosis por T. solium</u>                                       | 19     |
| i) <u>Antígenos</u>   | 19     |
| ii) <u>Anticuerpos</u>  | 20     |
| iii) <u>Células</u>   | 20     |
| b) <u>Cisticercosis por otros ténidos</u>                                   | 21     |
| i) <u>Antígenos</u>   | 22     |
| ii) <u>Anticuerpos</u>  | 24     |
| iii) <u>Células</u>   | 26     |
| 2. <u>INTERFASE HUESPED-PARASITO</u>  | 28     |
| a) <u>Superficie parasitaria</u>  | 28     |
| b) <u>Respuesta inflamatoria del huésped</u>                                | 33     |
| 3. <u>OBJETIVOS Y DESARROLLO DEL TRABAJO</u>                                | 38     |
| Capítulo III. <u>MATERIALES Y METODOS</u>                                   | 44     |
| 1. <u>MATERIALES</u>  | 44     |
| a) <u>Metacéstodos</u>  | 44     |
| b) <u>Reactivos químicos y biológicos</u>                                   | 44     |
| 2. <u>METODOS</u>   | 45     |
| a) <u>Bioquímicos</u>   | 45     |
| i) <u>Obtención de los extractos crudos de cisticercos</u>                  | 45     |
| ii) <u>Purificación de proteínas parasitarias:</u>                          | 46     |
| -Purificación del antígeno B  | 46     |
| -Purificación del antígeno B por cromatografía de afinidad                  | 48     |
| -Purificación de glicoproteínas   | 49     |
| iii) <u>Yodinación de cisticercos intactos:</u>                             | 52     |
| -Yodinación con el reactivo de Bolton-Hunter                                | 52     |

|  |    |
|--|----|
| iv) Electroforesis en gel de poli-<br>acrilamida con dodecil sulfato<br>de sodio | 54 |
| v) Autoradiografía de los geles  | 54 |
| vi) Isoelectroenfoque  | 55 |
| vii) Yodinación de la concanavalina-A  | 55 |
| viii) Acoplamiento de la concanavalina-A<br>a la sefarosa 4B                     | 56 |
| ix) Acoplamiento de la colágena a la<br>sefarosa 4B                              | 56 |
| x) Análisis de aminoácidos   | 57 |
| b) <u>Inmunológicos</u>  | 57 |
| i) Obtención de los sueros hiperinmunes  | 57 |
| -Antígeno B  | 57 |
| -Glicoproteínas  | 58 |
| ii) Purificación de los anticuerpos a<br>partir de los sueros hiperinmunes       | 59 |
| iii) Dobleinmunodifusión e immuno-<br>electroforesis                             | 59 |
| iv) Immuno-electrotransferencia  | 60 |
| v) Immunofluorescencia indirecta   | 62 |
| vi) Immunoperoxidasa indirecta   | 62 |
| c) <u>Microscópicos</u>  | 63 |
| i) Procesamiento del tejido para mi-<br>croscopía electrónica                    | 63 |
| ii) Obtención de los cortes para inmu-<br>nofluorescencia                        | 64 |
| iii) Autoradiografía de cortes finos   | 65 |
| iv) Autoradiografía de cortes semifinos  | 66 |
| v) Tinción negativa  | 66 |
| <br>   |    |
| Capítulo IV. <u>RESULTADOS: EL ANTIGENO B</u>                                    | 68 |
| 1. PURIFICACION DEL AgB  | 68 |
| 2. CARACTERIZACION INMUNOLOGICA Y BIOQUIMICA<br>DEL AgB                          | 69 |
| 3. LOCALIZACION DEL AgB EN EL TEJIDO DEL CIS-<br>TICERCO                         | 71 |
| 4. LOCALIZACION DEL AgB EN LA SUPERFICIE TE-<br>GUMENTAL                         | 72 |
| 5. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE FIBRONECTINA<br>DEL AgB                         | 76 |
| <br>   |    |
| Capítulo V. <u>RESULTADOS: GLICOPROTEINAS DEL CISTICERCO</u>                     | 79 |
| 1. OBTENCION DE UNA FRACCION ENRIQUECIDA EN<br>GLICOPROTEINAS DEL CISTICERCO     | 79 |
| 2. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE GLICO-<br>PROTEINAS DEL CISTICERCO          | 82 |
| 3. LOCALIZACION DE LAS GLICOPROTEINAS EN LA<br>SUPERFICIE TEGUMENTAL             | 84 |
| <br>   |    |
| Capítulo VI. <u>DISCUSION</u>  | 88 |
| 1. CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS E INMUNOLOGI-<br>CAS DEL AgB                      | 88 |

|   |     |
|---|-----|
| 2. PAPEL DEL AgB EN LA RELACION HUESPED-CIS-<br>TICERCO | 91  |
| 3. GLICOPROTEINAS DEL CISTICERCO                        | 97  |
| Capítulo VII. <u>BIBLIOGRAFIA</u>                       | 105 |

## RESUMEN

En esta tesis se presentan los resultados de un estudio dirigido por un lado a purificar y caracterizar los componentes de superficie del cisticerco de la Taenia solium, y por otro lado, a definir su participación en la compleja relación huésped-parásito.

Se describe la purificación y caracterización de la proteína inmunodominante en la cisticercosis humana: el antígeno B. Este antígeno está constituido por dos cadenas polipeptídicas, antigénicamente semejantes, con pesos moleculares de 95,000 y 85,000. Su contenido de aminoácidos indica que se trata de una proteína con una gran riqueza de residuos cargados, que se manifiesta en un punto isoeléctrico de 5-5.3 y en su propiedad de precipitar en forma de estructuras fibrosas cuando se incubaba en presencia de ATP. El antígeno B es una glicoproteína con un contenido de carbohidratos cercano al 12% que tiene la propiedad de interaccionar fuertemente con colágena, lo cual permite su rápida purificación por cromatografía de afinidad.

Los resultados de ensayos bioquímicos e inmunomicroscópicos indican que el antígeno B es sintetizado por las células subtegumentales del cisticerco y posteriormente liberado hacia la interfase huésped-parásito. Los hallazgos anteriores sugieren que se trata de un antígeno de secreción, que desvía la acción de los anticuerpos hacia el tejido conjuntivo que rodea al cisticerco en los tejidos de su huésped intermediario.

Además, se describe un método de cromatografía de afinidad del extracto crudo de cisticercos que permite la obtención de una fracción rica en glicoproteínas. Ensayos de inmunolectroforesis utilizando sueros de pacientes cisticercosos indican que esta fracción presenta un paralelo enriquecimiento en antígenos parasitarios.

A partir de la fracción rica en glicoproteínas se purificaron y caracterizaron parcialmente, seis glicoproteínas con pesos moleculares incluidos en el rango de 45,000 a 200,000. Se obtuvieron anticuerpos en contra de cinco de ellas. Resultados de ensayos inmunomicroscópicos demuestran que las cinco glicoproteínas están expuestas en la superficie externa del cisticerco. Asimismo, resultados de inmunolectrotransferencia indican que una de las glicoproteínas purificadas es la cadena pesada de la IgG porcina. Este hallazgo confirma evidencias anteriores que demuestran que la superficie del cisticerco posee proteínas del huésped además de las parasitarias.



## I. INTRODUCCION

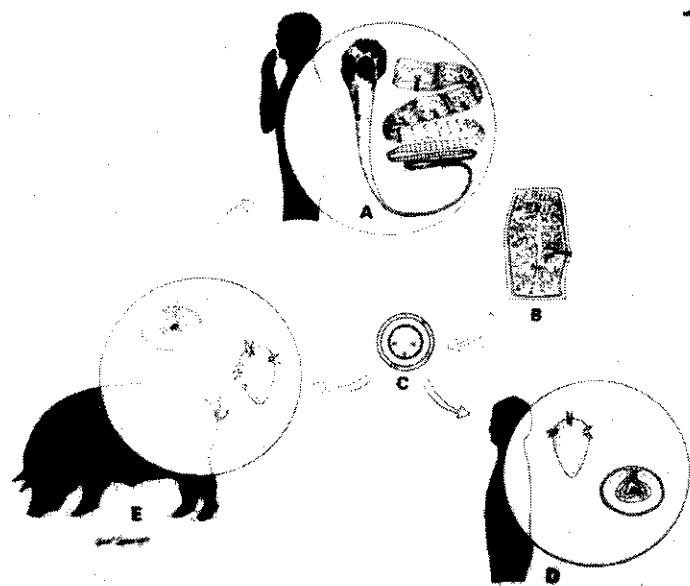
La cisticercosis es un serio problema de salud pública y de economía en el mercado e industria de alimentos elaborados con carne de cerdo, en países subdesarrollados entre los que se encuentra México (1).

El agente causal de la cisticercosis humana y porcina es el metacéstodo o cisticerco de la Taenia solium. El cisticerco es una forma intermedia en el desarrollo que sigue el embrión hexacanto para convertirse en el gusano adulto o solitaria. Puesto que el humano es el único huésped definitivo natural de la T. solium, la prevalencia de la teniasis-cisticercosis depende exclusivamente del vínculo que el hombre establece con los animales y en particular con el cerdo.

### 1.- BIOLOGIA DEL PARASITO

#### a) Ciclo de Vida (Fig. 1)

En condiciones naturales, la Taenia solium o solitaria habita únicamente en el intestino delgado del humano, en donde logra sobrevivir hasta por 25 años (2). Está constituida por un escólex o cabeza que en su parte inferior se adelgaza para formar un cuello a partir del cual se producen los proglótidos o segmentos. El conjunto de proglótidos unidos entre sí en forma de cadena se denomina estróbilo. Los proglótidos más cercanos al cuello son los más jóvenes e indiferenciados. A su vez, los más distales no solo están totalmente diferenciados, sino



1

FIG. 1. Ciclo de vida de la Taenia solium (ver explicación en el texto).

que además contienen un gran número de huevecillos (≈50,000 c/u) por lo que se dice que se encuentran grávidos. Los proglótidos grávidos son desprendidos espontáneamente por el gusano adulto (promedio de 4-5/día) (2) y evacuados en las heces fecales del huésped. La primera expulsión de proglótidos de T. solium generalmente ocurre entre los 62 y 72 días después de la infección (3). En ese momento, el gusano mide alrededor de 2.20 m de largo. Después de quimioterapia que no produce la expulsión del escólex, la evacuación de los proglótidos reaparece entre los 57 y los 61 días (2). En el medio ambiente, la descomposición de los proglótidos grávidos permite la liberación de los huevecillos, los cuales pueden infectar al huésped intermedio (cerdo) por ingestión directa de las heces, ingestión de alimentos o de aguas contaminadas, etc.

En el tubo digestivo del huésped intermedio, las enzimas proteolíticas y las sales biliares proveen la señal para la activación de la oncosfera o embrión hexacanto contenida en el huevecillo (4,5). Una vez activadas, las oncosferas penetran la pared intestinal del huésped hasta alcanzar capilares linfáticos y sanguíneos que las distribuyen a una gran variedad de órganos y tejidos (tejido subcutáneo, vísceras, músculo esquelético y cardíaco, cerebro, ojos, etc.). Aunque se desconocen muchos eventos después de la penetración de las oncosferas, se sabe que el embrión requiere al menos de 10 semanas para convertirse en un cisticerco (1). El cisticerco puede sobrevivir por varios años en los tejidos del huésped intermedio.

El ciclo se cierra cuando el humano ingiere carne cruda o insuficientemente cocida proveniente de un cerdo cisticercoso. Nuevamente, las enzimas gástricas e intestinales así como las sales biliares, activan al cisticerco que se fija en la pared intestinal (6). Una vez fijo, el pequeño gusano crece y se diferencia hasta convertirse en una tenia adulta.

Aunque el cerdo es el principal huésped intermediario de la T. solium, algunas otras especies (perro, jabalí, monos, etc.) (7-10) incluyendo al hombre pueden también alojar al cisticerco. En el humano al igual que en el cerdo, los cisticercos se pueden localizar en una gran variedad de tejidos entre los que destacan: sistema nervioso central, ojo y músculo esquelético.

La presencia de cisticercos con róstelo armado que presumiblemente pertenecen a la especie T. solium, ha sido además reportada en varias especies de mamíferos incluyendo a: camellos, conejos, liebres, osos pardos, gatos domésticos y silvestres, zorros, coatís, ratas y ratones (11,12). Sin embargo, la diagnosis de esos cisticercos no siempre ha sido basada en criterios taxonómicos estrictos por lo que su identidad es en muchos casos dudosa.

#### B) Morfología del Desarrollo

Las tenias solitarias como otras especies del género Taenia (familia Taenidae, orden Cyclophyllidea, clase Cestoda), son gusanos aplanados excepcionalmente largos. La T. solium

normalmente mide entre 1.5 y 5 m de longitud aunque ocasionalmente puede alcanzar los 8 m. Como se mencionó anteriormente, su cuerpo se puede dividir en tres regiones: escólex, cuello y estróbilo. El escólex (Fig. 2) posee cuatro ventosas y un rostelo coronado por dos hileras de ganchos. El número de ganchos rostelares puede variar entre 22 y 33, y su tamaño entre 159 y 173  $\mu$  (media  $165.7 \pm 5.0$ ) (10). Tanto las ventosas como el rostelo son estructuras de fijación que capacitan a la solitaria para mantenerse anclada en la pared del yeyuno.

El proceso de estrobilación (producción de proglótidos) ocurre en la región distal del cuello. Los proglótidos inmaduros cercanos al cuello son de tamaño variable, sin embargo, los maduros incluyendo a los grávidos generalmente miden de 7-12 mm de largo y de 5-6 mm de ancho. Cada proglótido maduro puede considerarse como una unidad reproductora independiente puesto que posee órganos genitales masculinos y femeninos (10). Los genitales masculinos están constituidos por un gran número (375-575) de testículos que confluyen en un ducto genital (Fig. 3). Los genitales femeninos están constituidos por un ovario trilobulado situado en la base del útero, en el extremo posterior del proglótido. El ovario desemboca a través de la vagina en el mismo atrio genital (Fig. 3). En los proglótidos grávidos, el útero repleto de huevecillos presenta 7 a 17 ramas laterales hacia cada lado (Fig. 4). Cada una de las ramas puede además presentar ramificaciones.

Los huevecillos contenidos en los proglótidos grávidos

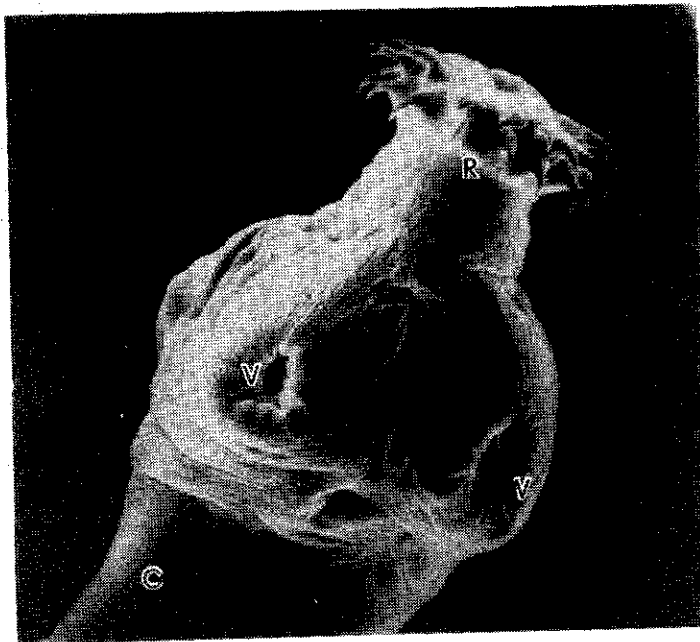


FIG. 2. Escólex de la T. solium observado en el microscopio electrónico de barrido. C: cuello; R: rostelo; V: ventosas.

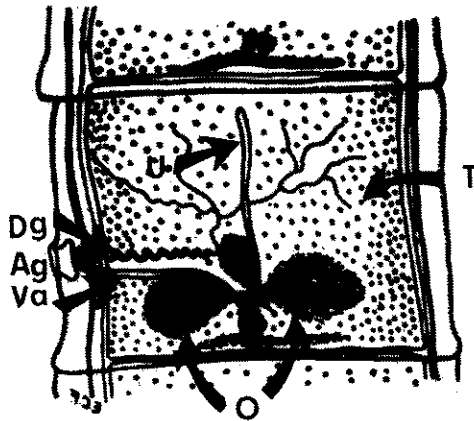


FIG. 3. Representación esquemática del aparato reproductor de la T. solium. Ag: atrio genital; Dg: ducto genital; O: ovario trilobulado; T: testículos; U: útero; Va: vagina.

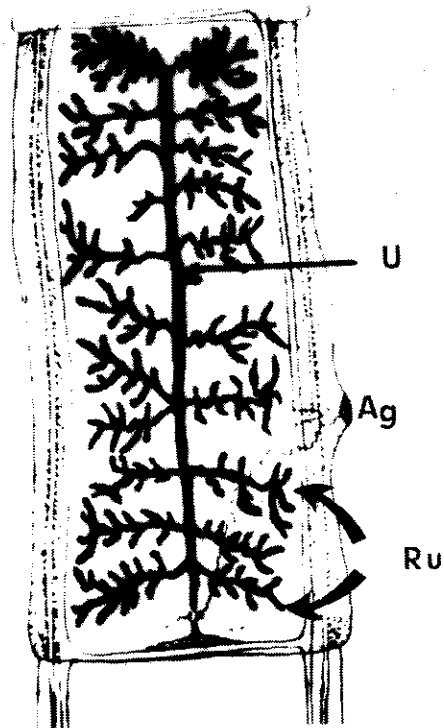


FIG. 4. Representación esquemática de un proglótido grávido de T. solium. Ag: atrio genital; Ru: ramas uterinas; U: útero.

presentan distintos grados de madurez; alrededor del 50% poseen oncosferas invasivas totalmente desarrolladas (4). Los huevecillos inmaduros pueden madurar fuera del huésped y permanecer viables e infectantes en aguas negras, ríos o pasturas durante varias semanas o meses (13). Los huevecillos de la T. solium son morfológicamente similares a los de otras especies de ténidos e idénticos a los de T. saginata (5,14, 15). Poseen varias envolturas (Fig. 5) que posibilitan la sobrevivencia de la oncosfera en el medio ambiente. La envoltura externa es el vitelo o cápsula, constituida por un grupo de células formando un sincicio. La siguiente envoltura es el embrioforo formado por pequeños bloques protéicos unidos entre sí por un material cementante. Esta envoltura, además de ser la más importante en la protección de la oncosfera, confiere a los huevecillos su apariencia estriada característica. A su vez, el embrioforo es producido por una envoltura celular más interna llamada célula embrioforal. Finalmente, la membrana oncosferal rodea directamente a la oncosfera o embrión hexacanto que posee tres pares de ganchos.

El cisticerco de la T. solium está formado por una vesícula ovalada y translúcida llena de líquido (0.5-2 cm de diámetro mayor), con un pequeño escólex invaginado (Fig. 6). Al igual que la tenia adulta, el escólex del cisticerco posee cuatro ventosas y un rostelo armado con dos hileras de ganchos. Cuando un cisticerco viable es ingerido por el huésped definitivo (humano), las enzimas gástricas e intestinales ac-



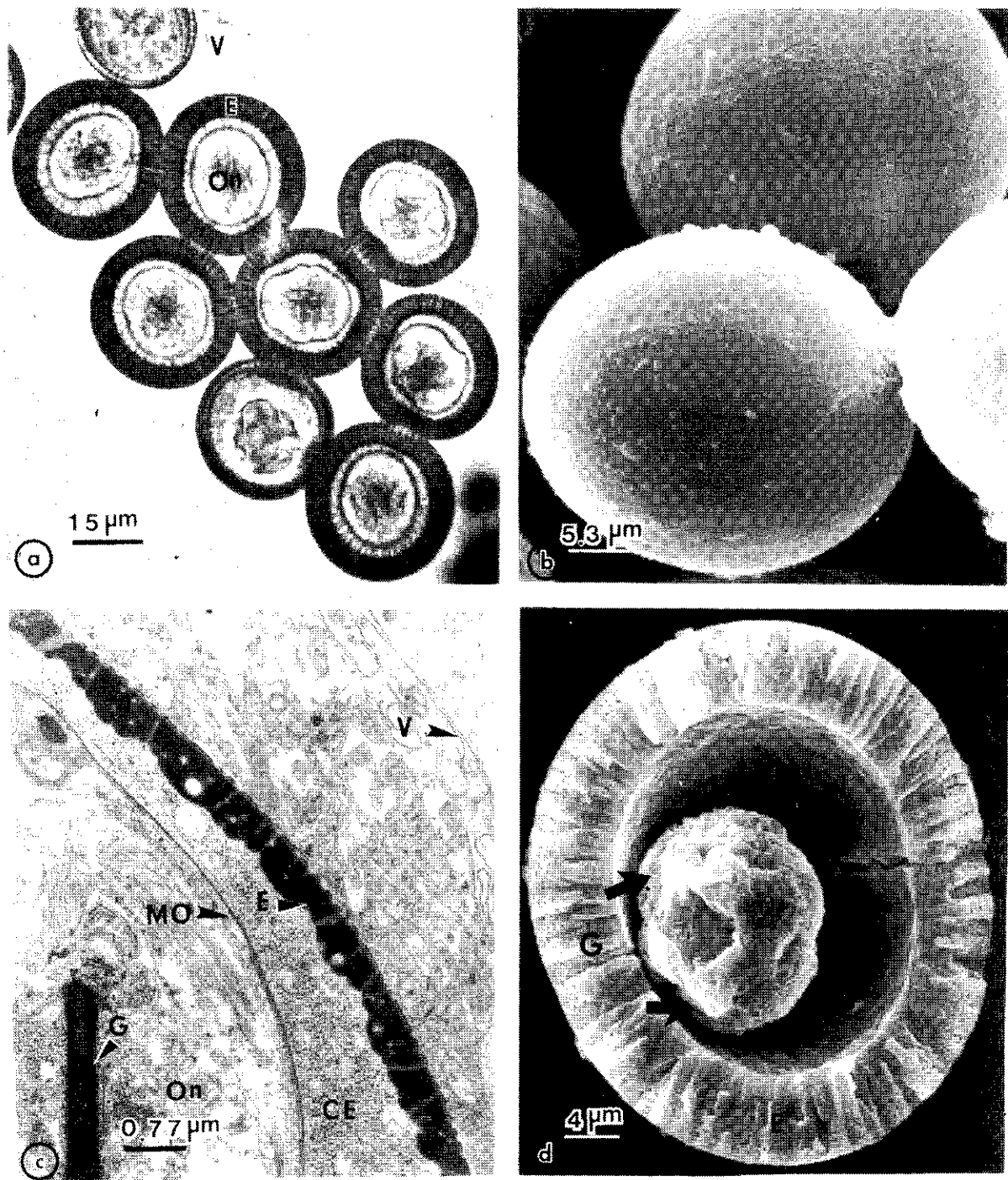


FIG. 5. Huevecillos de la *T. solium*. a) huevecillos en fresco observados en el microscopio de luz, b) huevecillos intactos observados en el microscopio electrónico de barrido, c) corte de un huevecillo inmaduro observado en el microscopio electrónico de transmisión y d) interior de un huevecillo observado en el microscopio electrónico de barrido. CE: célula embrioforesal; E: embriofores; G: ganchos oncosferales; MO: membrana oncosferal; On: oncosfera; V: vitelo. Fotografías tomadas de la referencia 5.

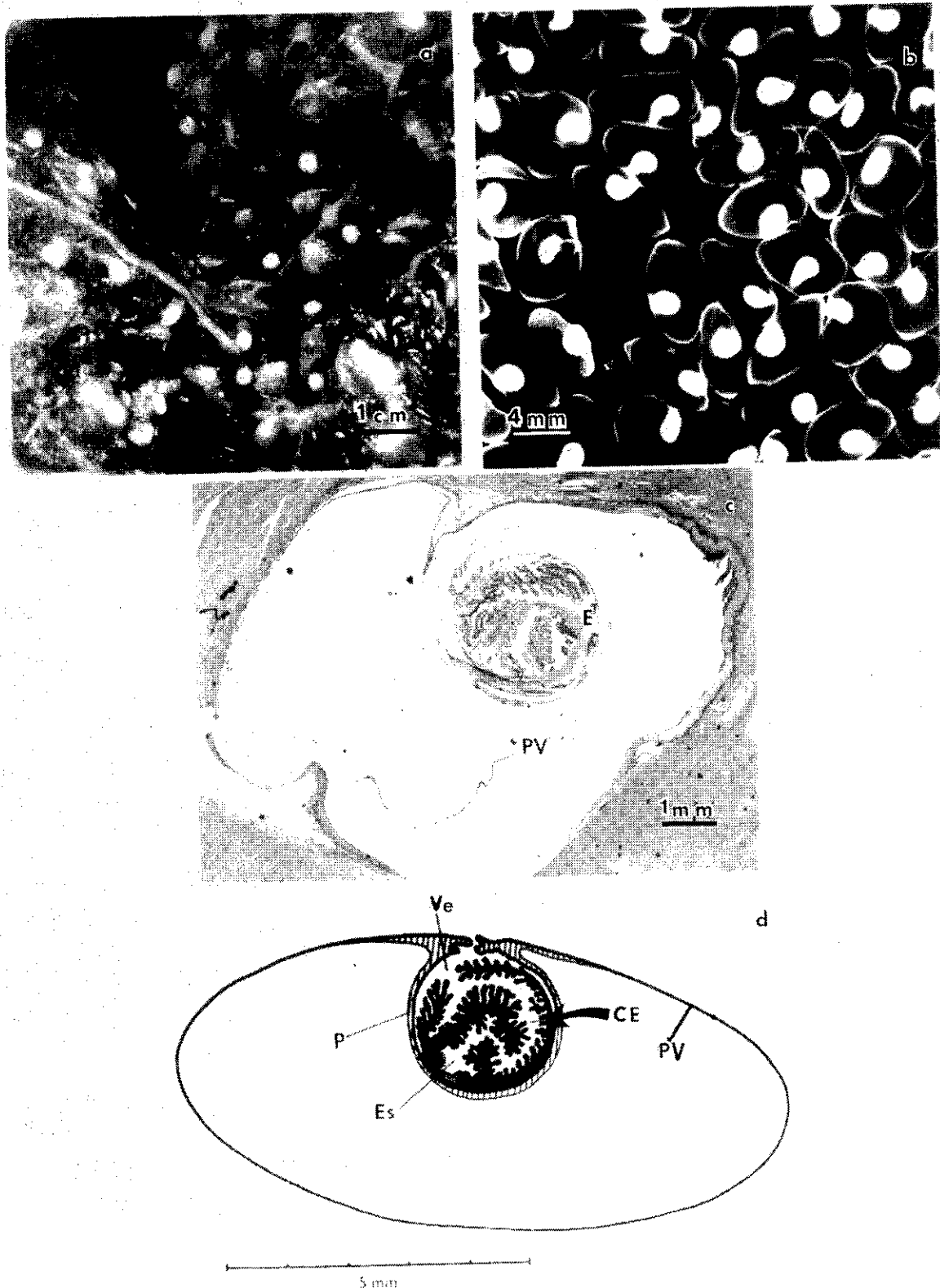


FIG. 6. Cisticercos de la *T. solium*. a) cisticercos expuestos al corte, en músculo esquelético de un cerdo masivamente infectado, b) cisticercos con pared vesicular intacta, disecados de músculo esquelético de cerdo, c) corte de un cisticercos rodeado por la cápsula inflamatoria en el músculo de cerdo y d) representación esquemática de un corte de cisticercos mostrando las distintas estructuras. CE: canal espiral; Es: escólex; P: parénquima; Ve: vestíbulo. Las figuras a, b y c fueron amablemente aportadas por la Dra. A. Flisser. La figura d, fué tomada de la referencia 248.

tivan al escólex para evaginar y posteriormente fijarse a la pared intestinal. El cisticerco de la T. solium es frecuentemente designado como Cysticercus cellulosa; sin embargo, debido a que este término no tiene validez taxonómica, se sugiere discontinuar su uso.

Frecuentemente se reporta la presencia de otra forma de metacésto en pacientes con cisticercosis cerebral. Esta forma que posee una vesícula multilobulada y que supuestamente carece de escólex (Fig. 7a), ha sido designada como Cysticercus racemosus a pesar de que el término no tiene validez taxonómica. Algunos autores (16,17) han mostrado que en un porcentaje considerable de pacientes con cisticercosis cerebral coexisten ambas formas de metacésto (celulosa y racemosa). Asimismo, se han descrito formas celulosas en las cuales se observan principios de multilobulización (Fig. 7b). Finalmente, una revisión microscópica cuidadosa de los cisticercos racemosos frecuentemente permite la localización del escólex armado o de sus restos estructurales (Fig. 7c). Con base en las anteriores evidencias parece claro que los cisticercos celuloso y racemoso son formas alternativas del mismo parásito. En esta tesis, se acepta la identidad entre las dos formas de cisticercos y se sugiere nombrarlas como forma celulosa y forma racemosa del cisticerco de la T. solium (Nótese que las designaciones latinas han sido adaptadas al idioma español).

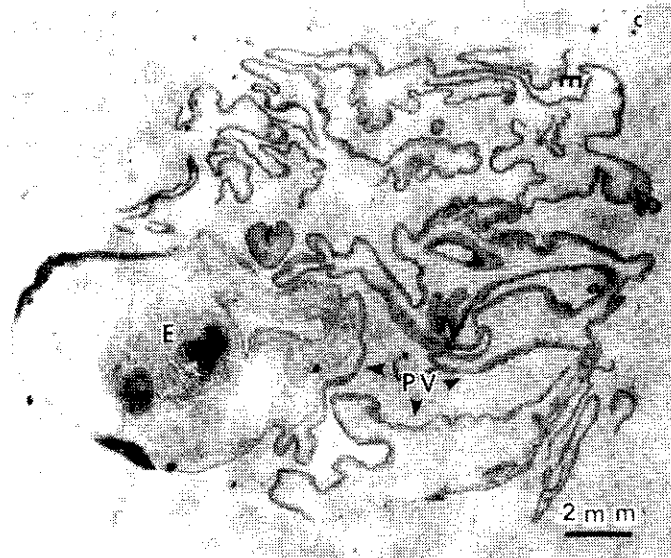
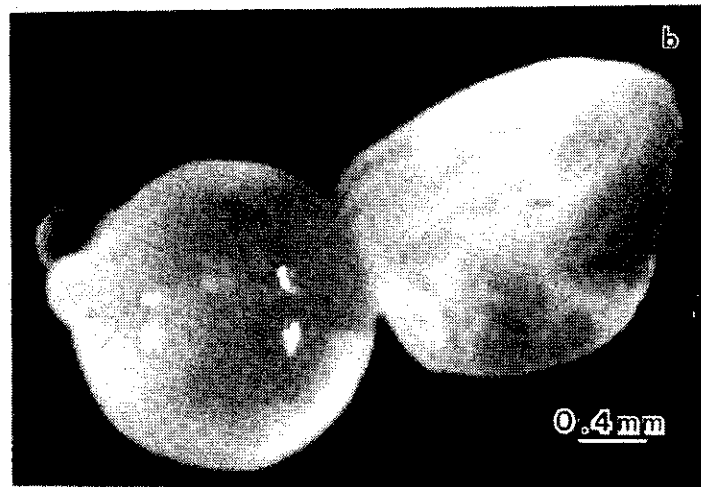
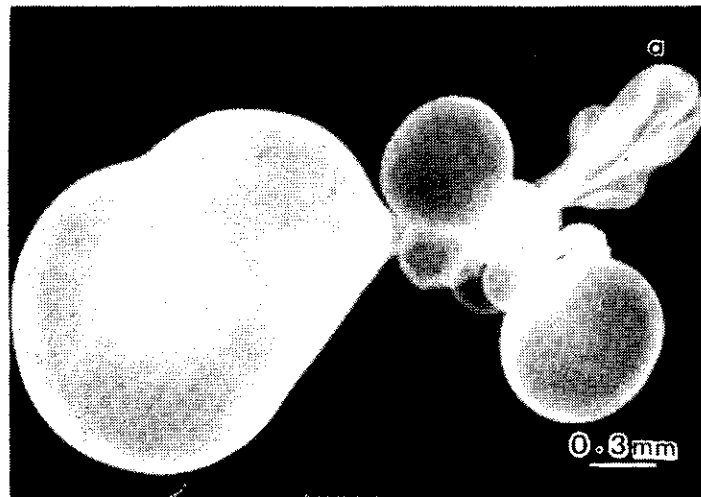


FIG. 7. Formas racemosas del cisticerco de la T. solium, obtenidas de pacientes neurocisticercosos. a) cisticerco con vesícula multilobulada; b) forma celulosa con principios de multilobulización y; c) corte de una forma racemosa en la que se observa claramente el escólex. E: escólex; PV: pared vesicular. Las figuras a y c fueron amablemente aportadas por el Dr. R. Mancilla. La figura b fue tomada de la referencia 16.

c) Inseminación y Fertilización

Se desconoce la fisiología del proceso de inseminación en T. solium, lo cual no es sorprendente si se considera la extrema dificultad para su estudio. No existe información sobre la participación de un sistema endócrino que controle la actividad reproductora de los ténidos. Sin embargo, al menos en algunas especies relacionadas (Schistocephalus solidus) se sabe que la inseminación ocurre tanto por autoimpregnación dentro del mismo proglótido como por impregnación de otro proglótido incluso de diferente estróbilo (18). En ambos casos, los espermatozoides son almacenados en el receptáculo seminífero (Fig. 8). Los óvulos liberados periódicamente por el ovario, pasan a través del oviducto hasta el ootipo en donde ocurre la fecundación. A su vez, las células vitelinas almacenadas en un reservorio migran hasta el ootipo para asociarse con los cigotos. Los cigotos recubiertos por células vitelinas reciben una secreción mucosa y serosa aportada por la glándula de Mehlis, que supuestamente sirve como substrato para la formación del embrioforo. En el útero, los cigotos se convierten en huevecillos maduros e infectantes y permanecen almacenados hasta la liberación de los proglótidos al medio ambiente.

Los ténidos como todos los céstodos, tienen características genéticas que los hacen (al menos teóricamente) susceptibles a la producción de cepas adaptadas a nuevas especies o razas de huéspedes intermediarios y definitivos. Por ejemplo, puesto que son organismos hermafroditas, ya sea que la fertili-

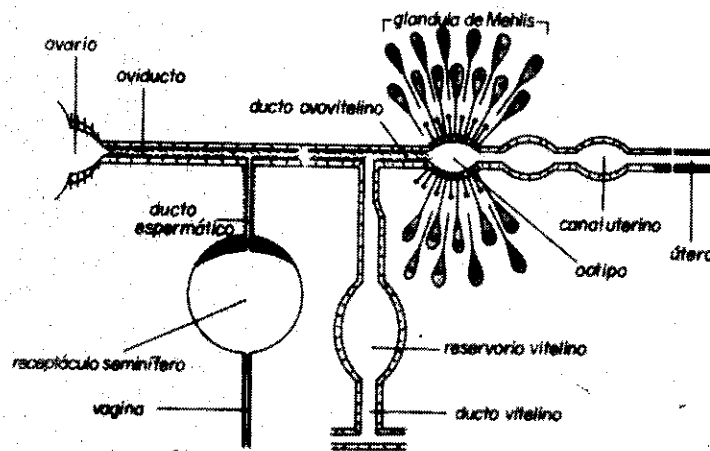


FIG. 8. Representación esquemática del sistema de inseminación de la *T. solium* (ver explicación en el texto). Tomada con modificaciones de la referencia 18.

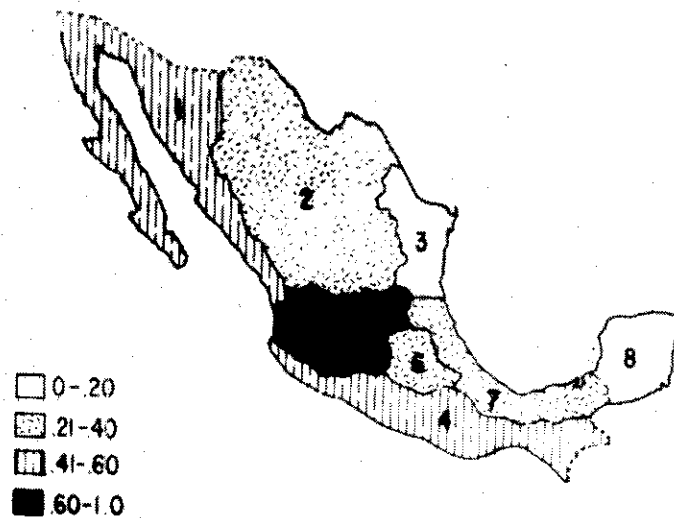


FIG. 9. Mapa geoeconómico de la República Mexicana indicando la frecuencia regional de anticuerpos anticisticercos. El área 5 tiene el porcentaje mayor, seguida por las áreas cercanas al Océano Pacífico. Tomada de la referencia 58.

zación ocurra por autoinseminación de un proglótido o por inseminación cruzada entre proglótidos de distintos gusanos en el mismo huésped (ver arriba), es muy probable que los individuos que se aparean posean genotipos muy similares si no idénticos. En consecuencia, la aparición de una sola mutación recesiva en una generación, podría dar origen a individuos mutantes homocigóticos (en los cuales se expresa la mutación) en la siguiente generación. Desafortunadamente, la posible existencia de "cepas" entre las poblaciones de adultos y metacéstodos de la T. solium ha sido poco explorada. Solo se dispone de un reporte en el que se demuestran diferencias en la composición de antígenos en lotes de cisticercos obtenidos de distintas localidades de México (19).

## 2.- IMPORTANCIA DE LA ENFERMEDAD EN MEXICO

### a) Prevalencia y Distribución Geográfica de la Cisticercosis Humana

Aunque el cisticerco de la T. solium puede alojarse en una gran variedad de órganos y tejidos humanos, las manifestaciones más graves de la enfermedad se producen cuando el parásito afecta al sistema nervioso central (SNC) (ver sección I.3.a.). En consecuencia, la mayoría de los estudios estadísticos disponibles se refieren a esta localización, comunmente conocida como neurocisticercosis.

La prevalencia de la neurocisticercosis ha sido estimada en alrededor del 2% por estudios de autopsias en distintas instituciones hospitalarias (20-31). Este porcentaje debe ser

tomado con cautela puesto que la población hospitalaria no constituye una muestra representativa de la población total. A su vez, estudios seroepidemiológicos han demostrado la presencia de anticuerpos anti-cisticerco en 1-3.8% de la población abierta en México (32-36). Nuevamente, puesto que la presencia de anticuerpos en un suero sólo demuestra que el individuo ha tenido contacto con el parásito y no necesariamente que esté infectado, es posible que la prevalencia real de la enfermedad difiera considerablemente de estos valores. Es claro que no se dispone de estimados inequívocos sobre la presencia de la cisticercosis humana en el país. Para obtenerlos es necesario desarrollar métodos practicables a nivel masivo que detecten la presencia del parásito en los individuos.

En el único de los estudios seroepidemiológicos (34-36) con un aceptable diseño de muestreo, Flisser y cols. reportaron que existe una correlación entre la frecuencia en la positividad de los sueros y las regiones geoeconómicas del país (Fig. 9). La más alta frecuencia de seropositividad fue encontrada en la región #5 constituida por los estados (Guanajuato, Michoacán, Jalisco, etc.) que tradicionalmente son los más importantes porcicultores. Sorprendentemente, no se encontró ningún factor de tipo social, cultural o económico, que tuviera correlación con la frecuencia en la seropositividad. Este hallazgo, propició la hipótesis que propone al viento como un mecanismo poco discriminatorio, para la dispersión de la enfermedad en nuestro país, donde el fecalismo al aire libre ocu-



re comúnmente. Desafortunadamente, la hipótesis anterior no ha sido probada experimentalmente.

b) Prevalencia y Distribución Geográfica de la Cisticercosis Porcina

La inspección sanitaria de los cerdos sacrificados en los rastros del país, generalmente consiste en practicar un corte en los músculos triceps y anconeos derechos, para buscar visualmente la presencia de cisticercos en el tejido expuesto. Cuando un cerdo es encontrado cisticercoso, se hace constar su decomiso en el registro del rastro. De este modo, la información disponible sobre prevalencia y distribución geográfica de la cisticercosis porcina, ha sido obtenida a partir de investigaciones en los registros de los rastros del país.

El estudio más amplio realizado hasta la fecha es el de Aluja (37), quien reunió información de 75 rastros en 22 estados de la república, durante los años 1980-1981 (Tabla I). El promedio nacional resultó ser de 1.55% con un rango que va desde 0.004% (Monterrey, N.L.) hasta 10% (Ocampo, Gto. y La Piedad, Mich.). Sin embargo, al igual que en el caso de la cisticercosis humana, estas cifras no son confiables por las siguientes razones:

- 1) Es bien conocido que un gran número de cerdos son sacrificados sin ser sometidos a inspección sanitaria;
- 2) La inspección de carne en México se lleva a cabo bajo la supervisión de tres autoridades distintas, cada una con sus propios estándares y reglamentos: la Secretaría de

TABLA I. Frecuencia de cisticercosis porcina en 75 rastros de 22 estados en México\*

| Estado y localidad                                       | Frecuencia (%)                         | Año  | Fuente <sup>a</sup> |
|--|--|------|---------------------|
| Aguascalientes   |  |      |                     |
| Aguascalientes   | 0.52                                   | 1980 | SSA                 |
| Campeche   | sin registros disponibles              |      |                     |
| Chihuahua  |  |      |                     |
| Chihuahua TIF <sup>b</sup>                               | 0.49                                   | 1980 | SARH                |
| Chihuahua  | 3.32                                   | 1980 | M                   |
|  | 1.65                                   | 1981 | M                   |
| Colima   |  |      |                     |
| Colima, Villa Alvarez,<br>Coquimatla, Comala             | 2.4                                    | 1980 | M                   |
| Coahuila   |  |      |                     |
| Torreón  | 2.37                                   | 1981 | M                   |
| Distrito Federal   |  |      |                     |
| Ferrería   | 0.13                                   | 1980 | SSA                 |
|  | 0.16                                   | 1981 | SSA                 |
| Durango  |  |      |                     |
| Durango  | 2.21                                   | 1980 | M                   |
| Guanajuato   |  |      |                     |
| Ocampo   | 10.0                                   | 1981 | M                   |
| San Felipe   | 3.0                                    | 1981 | M                   |
| Jalisco  |  |      |                     |
| Guadalajara  | 0.005                                  | 1980 | SSA                 |
| Estado de México   |  |      |                     |
| 39 rastros   | 0.22 (0.09-7.9)                        | 1980 | SSA                 |
| Michoacán  |  |      |                     |
| La Piedad  | 10.0 <sup>c</sup>                      | 1980 | SARH                |
| Morelos  |  |      |                     |
| Cuernavaca   | 0.37                                   | 1980 | SSA                 |
| Jojutla, Zacatepec,<br>Tlalquiltengo, Puente<br>de Ixtla | 1.9                                    | 1980 | M                   |
| Nuevo León   |  |      |                     |
| Monterrey  | 0.004                                  | 1980 | SSA                 |
|  | 0.016                                  | 1981 | SSA                 |
| Querétaro  |  |      |                     |
| Querétaro  | 0.56                                   | 1980 | SSA                 |
|  | 0.74                                   | 1981 | SSA                 |
| San Luis Potosí  |  |      |                     |
| San Luis Potosí  | 0.67                                   | 1980 | SSA                 |
|  | 0.39                                   | 1981 | SSA                 |
| Sonora   |  |      |                     |
| Hermosillo   | 0.07                                   | 1980 | SSA                 |
| Tabasco  |  |      |                     |
| Villahermosa   | no se sacrifican cerdos en este rastro |      |                     |
| Tamaulipas   |  |      |                     |
| Ciudad Victoria  | 0.37                                   | 1980 | SSA                 |

TABLA I. (continuación)

| Estado y localidad | Frecuencia (%) | Año  | Fuente <sup>a</sup> |
|--------------------|----------------|------|---------------------|
| Tlaxcala           |                |      |                     |
| Tlaxcala           | 1.0            | 1981 | M                   |
| Huamantla          | 0.63           | 1980 | M                   |
| Apizaco            | 3.3            | 1980 | M                   |
| Veracruz           |                |      |                     |
| Jalapa             | 0.11           | 1980 | SSA                 |
| Veracruz           | 0.75           | 1980 | SSA                 |
| Tuxpan             | 1.08           | 1980 | SSA                 |
| Yucatán            |                |      |                     |
| Mérida             | 0.04           | 1980 | SSA                 |
| Zacatecas          |                |      |                     |
| Jerez              | 0.75           | 1980 | SSA                 |
| Fresnillo          | 2.10           | 1980 | SSA                 |
| Zacatecas          | 1.26           | 1980 | SSA                 |

a: Datos no publicados obtenidos de: SSA, Secretaría de Salubridad y Asistencia; M, registros en rastros municipales; SARH, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos.

b: TIF, rastros en donde se sacrifican animales destinados a la exportación.

c: Valor estimado.

\*: Tomada de la referencia 37.

Salubridad y Asistencia controla alrededor de 200 rastros en las grandes ciudades; la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos controla los rastros que sacrifican animales para exportación; las autoridades municipales controlan los rastros de las localidades menores; y

- 3) El método descrito de inspección no detecta a todos los cerdos infectados (38). Animales con infecciones ligeras pueden pasar desapercibidos.

Las diferencias entre los estimados de prevalencia de la cisticercosis porcina obtenidos usando dos métodos distintos quedan ejemplificados en la Tabla II, tomada del mismo reporte de Aluja (37). En este estudio, se compararon las frecuencias de infección obtenidas por inspección ante-mortem realizada por la propia investigadora en varias localidades del Edo. de México, con las obtenidas de los registros en los rastros de las mismas localidades. Los resultados muestran que en las tres localidades que tienen rastro, la frecuencia determinada por inspección ante-mortem fue un orden de magnitud mayor (17% vs 1%).

Puesto que una inspección veterinaria eficiente no solo permitiría obtener cifras reales sobre la prevalencia de la cisticercosis porcina, sino que también contribuiría a controlar la dispersión de la enfermedad, es necesario que las autoridades de salud actúen de una manera coordinada para resolver las deficiencias actuales. En este sentido, es indispensable

TABLA II. Frecuencia de cisticercosis determinada por inspección antemortem comparada con la obtenida de los registros en rastros del Edo. de México.\*

| Poblado          | Inspección antemortem           |                   | Registros de rastros |
|------------------|---------------------------------|-------------------|----------------------|
|                  | Número de cerdos inspeccionados | Cisticercosis (%) | Cisticercosis (%)    |
| Ixtlahuaca       |                                 |                   | 1.09                 |
| mercado          | 269                             | 9.66              |                      |
| 2 granjas        | 20                              | 20.00             |                      |
| Almoloya         |                                 |                   | 1.38                 |
| 7 granjas        | 142 <sup>a</sup>                | 7.75              |                      |
| Atlacomulco      |                                 |                   | 0.32                 |
| 3 granjas        | 26 <sup>b</sup>                 | 30.80             |                      |
| San Felipe       |                                 |                   | sin rastro           |
| 3 granjas        | 47                              | 6.38              |                      |
| Varios criadores | 128                             | 15.62             | sin rastro           |

a: Un propietario admitió haber eliminado segmentos blanquecinos en las heces.

b: Dos propietarios admitieron haber eliminado segmentos blanquecinos en las heces.

\*: Tomada de la referencia 37.

que cualquier medida contemple los siguientes aspectos: 1) estandarizar el método de inspección sanitaria usado por todas las autoridades involucradas; 2) investigar la eficiencia de ese método en la detección de cerdos cisticercosos y 3) implementar estrategias que permitan inspeccionar a todo cerdo sacrificado, incluyendo aquellos de comunidades remotas.

c) Impacto Económico de la Cisticercosis

La primera encuesta nacional de paciente neurológicos y psiquiátricos fue llevada a cabo en 1960 por la Secretaría de Salubridad y Asistencia (39). En aquel tiempo, se encontró que alrededor del 1% de los habitantes del país, estaba afectado por algún padecimiento neurológico. Velasco-Suárez y cols. (40), en 1981 realizaron estimaciones para determinar qué proporción de ese 1% correspondía a pacientes con neurocisticercosis. La estimación más conservadora produjo un 6% mientras que la menos conservadora fue de 14%. Es decir que entre un 0.06% (42,000 individuos) y un 0.14% (98,000 individuos) de los 70 millones de habitantes que tenía el país en 1980, estaban afectados por la neurocisticercosis. Nótese que ambos porcentajes son 7-14 veces menores que los estimados seroepidemiológicamente (ver Sección I.2.a). Con base en estos porcentajes, los autores calculan las pérdidas económicas anuales de esos individuos (60,000 pesos/año/enfermo), debidas a una incapacidad para asistir a su trabajo, entre 2,500 y 5,900 millones de pesos (equivalentes a 110-255 millones de dólares).

Cabe hacer notar que los anteriores estimados no incluyen los altos costos que las instituciones hospitalarias oficiales solventan durante la atención y hospitalización de los pacientes neurocisticercosos.

Las pérdidas económicas debidas a cisticercosis porcina durante 1980 han sido calculadas por Acevedo-Hernández (41). De acuerdo al censo nacional ganadero llevado a cabo el mismo año, en 1980 fueron sacrificados alrededor de 17 millones de cerdos en el país. Basándose en la suposición de que el 1.55% de los cerdos sacrificados fueron encontrados cisticercosos durante la inspección sanitaria (ver Sección I.2.b), el autor calcula que las pérdidas de carne porcina debidas a decomiso ascendieron a 1,000 millones de pesos (equivalentes a 43 millones de dólares en ese año).

### 3.- DESCRIPCION DE LA ENFERMEDAD

#### a) Sintomatología de la Cisticercosis Humana

Subyacente al título de la sección está la pregunta de ¿cuáles son los efectos que provoca la presencia de uno o de varios cisticercos en los individuos humanos? La respuesta es que las manifestaciones de la cisticercosis son extremadamente variables, no solo de un individuo a otro, sino también a lo largo del tiempo en un mismo individuo. Desde un punto de vista clínico, los pacientes cisticercosos pueden ser asintomáticos, ligeramente sintomáticos o gravemente sintomáticos. La sintomatología

dependerá primordialmente de la localización del o de los cisticercos en los órganos y tejidos del paciente, así como también, de las circunstancias particulares de cada infección. Es posible encontrar casos de localizaciones similares en individuos diferentes, siendo en algunos causa de enfermedad grave, mientras que en otros pasa desapercibida. Los factores que determinan la presencia o ausencia de sintomatología son parcialmente desconocidos.

En términos generales, la cisticercosis de localización externa al sistema nervioso central, puede considerarse como una enfermedad benigna. Por ejemplo, los escasos reportes de cisticercos localizados en vísceras abdominales, indican que los parásitos son relativamente bien tolerados (42-44). Igualmente, aquéllos localizados en el tejido subcutáneo son caracterizados únicamente por la presencia de nódulos y frecuentemente pasan desapercibidos (42). La presencia de cisticercos en músculo esquelético ha sido determinada en un pequeño número de casos. En infecciones masivas, los síntomas descritos son dolor muscular y debilidad con evolución variable (45). Los cisticercos pulmonares provocan signos y síntomas tan vagos que plantean un problema para su diagnóstico (46,47). La afección del músculo cardíaco en algunos casos puede producir taquicardia, disnea, síncope y ruidos cardíacos anormales (48, 49). Exceptuando a la neurocisticercosis, la cisticercosis ocular es la que puede ocasionar los daños más graves. Los cisticercos pueden estar localizados en cualquiera de los tejidos del ojo (50-52), produciéndose respuestas inflamatorias muy severas, asociadas con la muerte del parásito, en casos de cisticercosis intraocular (51). Esta localización, generalmen-



te interfiere con la visión en la forma de un escotoma que puede ser móvil debido a cambios en la posición del parásito. Si la reacción inflamatoria es severa, el ojo puede atrofiarse y producir la pérdida de la vista.

En el caso de la neurocisticercosis, también es posible encontrar pacientes sintomáticos y asintomáticos. En un estudio de 4250 autopsias de adulto llevadas a cabo entre 1969 y 1974, se encontraron 135 casos de neurocisticercosis equivalentes a una frecuencia de 3.2% (17). De acuerdo a los autores, el 81% de los individuos neurocisticercosos nunca presentó síntomas de alteraciones neurológicas. En cambio, en un estudio similar de 9412 autopsias, un 57% de los neurocisticercosos detectados había mostrado síntomas relacionados con la presencia del parásito (22). Este segundo porcentaje coincide con el obtenido por Lombardo (53), a través de una revisión de pacientes neurológicos con tomografía axial computarizada (TAC). Tomando el porcentaje promedio entre los tres estudios, se tendría que un 45% de los pacientes neurocisticercosos son sintomáticos. En otras palabras, uno de cada dos individuos neurocisticercosos desarrollará manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Con respecto a la gravedad de la enfermedad en los pacientes sintomáticos, la información disponible es todavía más escasa. Es posible que la mayoría de los casos no presenten un deterioro tal que requiera hospitalización (54). Puesto que la atención de los pacientes sintomáticos leves es generalmente extrahospitalaria, no existen estadísticas que describan el grado de afectación que la enfermedad causa en su calidad de vida.

Finalmente, en algunos casos la neurocisticercosis es una enfermedad grave y frecuentemente fatal. Adopta diferentes características nosológicas en relación con el número, localización y estado del parásito y con la aparición de posibles complicaciones. En consecuencia, el tipo de manifestaciones clínicas que se pueden producir es tan extensa y polimórfica como la neurología misma (55). Tabla III. De acuerdo con los estudios de autopsia mencionados arriba (17,22), la neurocisticercosis fue la causa de muerte en el 0.6-1.3% de pacientes hospitalizados y autopsiados.

#### b) Sintomatología de la Cisticercosis Porcina

Las manifestaciones clínicas de la cisticercosis porcina prácticamente no han sido estudiadas, aunque se han referido casos en que los cerdos presentan disnea, ataxia, caquexia y algunos otros disturbios nerviosos (56,57). En general la sintomatología es relativamente leve. A este respecto, es frecuente que cerdos masivamente infectados seas diagnosticados como cisticercosos sólo a través de inspección sanitaria (ver Sección I.2.b). En algunos casos, la infección es tal que una proporción considerable de la masa muscular está invadida por decenas de miles de parásitos. Lo anterior sugiere que en la cisticercosis porcina la coexistencia huésped-parásito se mantiene en equilibrio sin perjuicios graves para ninguno de los organismos.

Cabe destacar, que los métodos actuales para la explotación de los cerdos impiden que los animales vivan más allá de los 9 meses. Por lo tanto, la cisticercosis porcina, a diferencia de la humana,

TABLA III. Síntomas y signos de la neurocisticercosis (186 casos).\*

|                                     |     |
|-------------------------------------|-----|
| Síndrome craneohipertensivo         | 124 |
| Signos cerebelosos                  | 68  |
| Signos piramidales                  | 68  |
| Deterioro mental                    | 49  |
| Epilepsia centroencefálica          | 45  |
| Epilepsia focal                     | 44  |
| Confusión mental                    | 16  |
| Vértigo (alucinación de movimiento) | 16  |
| Signos del tronco cerebral          | 15  |
| Cefalalgia sin craneohipertensión   | 14  |
| Acúfenos                            | 14  |
| Crisis de inconciencia              | 13  |
| Signos extrapiramidales             | 8   |
| Hemihipoalgesia                     | 8   |
| Síndrome de Parinaud                | 7   |
| Hemianopsia bitemporal              | 5   |
| Disartria                           | 5   |
| Fosfenos                            | 5   |
| Rigidez de nuca                     | 5   |
| Anósmia                             | 4   |
| Nistagmus vestibular                | 4   |
| Cuadro infeccioso inicial           | 4   |
| Afasia                              | 3   |
| Estado de coma inicial              | 3   |
| Hemianopsia homónima                | 2   |
| Amaurosis episódica                 | 2   |
| Pérdida súbita de fuerza            | 2   |
| Síndrome de Horner                  | 2   |
| Propulsión                          | 2   |
| Vómito sin craneohipertensión       | 2   |
| Debilidad muscular sin paresia      | 2   |
| Disociación de movimientos oculares | 1   |
| Lipotimias                          | 1   |
| Mioclonias faciales                 | 1   |
| Exoftalmos                          | 1   |
| Afección de pares craneales         | 1   |
| I                                   | 3   |
| III                                 | 1   |
| IV                                  | 3   |
| V                                   | 7   |
| VI                                  | 11  |
| VIII                                | 1   |
| XII                                 | 1   |

\*: Tomada de la referencia 55.

puede considerarse como una infección relativamente joven. Es posible que los síntomas severos de la enfermedad, equiparables a los observados en pacientes, sólo aparezcan en cerdos con infecciones más prolongadas.

## II. ANTECEDENTES

El hecho de que la evidencia clínica de adquisición de inmunidad en muchas parasitosis es dudosa, durante algún tiempo motivó la creencia de que los parásitos eran poco inmunogénicos. En la actualidad, se sabe que esta creencia es errónea, puesto que en todas las infecciones parasitarias estudiadas adecuadamente, se han encontrado anticuerpos y (o) células específicas. En muchos ejemplos, los niveles de anticuerpos y células tienen poca o ninguna relación con el estado inmunológico y clínico del huésped, lo que indica que su respuesta inmune no lo está protegiendo. En el caso general de la cisticercosis (por T. solium y por otros ténidos) se puede afirmar que los parásitos efectivamente sensibilizan a sus huéspedes correspondientes, y sin embargo, sobreviven por largos periodos. El entendimiento de los mecanismos que toman parte en la relación huésped-cisticerco, claramente se conseguirá a través del estudio de factores que por parte del huésped y del parásito participan para mantener ese delicado equilibrio entre los dos organismos. En este capítulo, se resumen inicialmente los conocimientos sobre la respuesta inmunológica del huésped cisticercoso, detectable a nivel sistémico. Más adelante, se describe la información disponible sobre los componentes y eventos que ocurren en la interfase huésped-cisticerco.

## 1.- RESPUESTA INMUNOLOGICA DEL HUESPED

### a) Cisticercosis por T. solium

En México, desde 1948 Nieto reportó un método de fijación de complemento que permite detectar anticuerpos en el líquido cefalorraquídeo de pacientes neurocisticercosos (58) A partir de estos esfuerzos iniciales, se han desarrollado una serie de métodos diagnósticos con sensibilidades y especificidades variables, que han demostrado la presencia de una respuesta inmune tanto en suero como en líquido cefalorraquídeo de los pacientes (59-66). Sin embargo, el conocimiento de los factores involucrados por parte del parásito y del huésped en la cisticercosis humana y porcina, es todavía muy pobre como se podrá observar a continuación.

#### i) Antígenos

La composición antigénica del cisticerco de la T. solium ha sido estudiada por inmunoelectroforesis (IEF) en la que reacciona un extracto crudo parasitario con sueros de pacientes neurocisticercosos. Este procedimiento que es de fácil realización tiene como principal limitante su baja sensibilidad. En consecuencia, la IEF solo permite detectar anticuerpos en alrededor del 50% de los sueros de pacientes neurocisticercosos confirmados. A pesar de lo anterior, la IEF permitió establecer una clasificación de los antígenos detectados de acuerdo a su movilidad electroforética (34-36). De este modo se han definido ocho antígenos del cisticerco, a los cuales se les denominó con las primeras letras del alfabeto. El antígeno isoeléctrico deno-

minado como "B", resultó ser el más frecuentemente reconocido (84%) por los sueros de pacientes que tuvieron niveles de anticuerpos detectables por IEF, seguido por los antígenos A (47%), E (35%), C (30%), etc. (34-36).

ii) Anticuerpos

La respuesta inmune humoral de los pacientes neurocisticercosos en contra de los ocho antígenos, es muy heterogénea. La heterogeneidad no solo incluye al número de antígenos que cada suero reconoce sino también al tipo de antígenos. Por ejemplo, el 77% de los sueros contienen anticuerpos en contra de 1-3 antígenos, mientras que sólo el 1% contiene anticuerpos en contra de todos los antígenos. Con respecto a las clases de inmunoglobulina que constituyen los anticuerpos anticisticercos, se encontró IgG en el 98% de los sueros, IgM en el 80%, IgE en el 37%, IgA en el 29% e IgD en el 24% (34-36,67-69).

iii) Células

En un intento por evaluar la participación de la respuesta inmune celular en la cisticercosis humana, se han realizado estudios de formación de rosetas por linfocitos T y B; transformación blastoide por Concavalina A y un extracto crudo de cisticercos; y reactividad en piel al PPD (67,69). Los resultados mostraron que los niveles circulates de linfocitos T y B en los pacientes cisticercosos son normales. Asimismo, no hubo diferencias significativas entre la respuesta a mitógenos de las células de pacientes cisticercosos y las de individuos sanos. En cambio, la respuesta al PPD que en la población abierta de México es notable-

mente alta (64%), se encuentra significativamente disminuida en los pacientes cisticercosos (17%), sugiriendo una depresión en la funcionalidad de los linfocitos T. Este resultado está de acuerdo con fenómenos de inmunosupresión reportados en ratones infectados por T. crassiceps (70-72).

Los resultados presentados arriba, además de escasos, aportan muy poca información acerca de la respuesta del huésped en la vecindad del parásito. Por ejemplo, los niveles y las especificidades de los anticuerpos circulantes pueden no tener relación con los que ocurren en la interfase huésped-parásito; la visión obtenida de la respuesta inmune del humano es estática, en contraste con las circunstancias cambiantes a lo largo del desarrollo de cisticercos de otras especies en sus respectivos huéspedes intermediarios (70,71,73-78). Además, por razones inherentes a la investigación en humanos, en esta clase de estudios no es posible controlar parámetros tales como dosis parasitaria, estadio de desarrollo y localización del o de los parásitos, etc. Es clara la necesidad de futuras investigaciones en un modelo animal (cerdo, perro, etc.) para completar la información sobre la respuesta inmune del huésped infectado por T. solium.

#### b) Cisticercosis por otros Ténidos

Los estudios de caracterización antigénica en otras especies de ténidos han estado dirigidos principalmente a la búsqueda de antígenos con valor diagnóstico para humanos, e inmunoproláctico en el caso de animales. A su vez, el estudio de la respuesta



específica inmune del huésped ha tenido un doble objetivo. Por un lado, se ha intentado correlacionar la respuesta inmune con el estado clínico del huésped durante las distintas etapas de la enfermedad. Por otro lado, se han estudiado los componentes protectores de la respuesta (anticuerpos, células) que sirvan de referencia para el diseño de métodos inmunoproliféricos.

i) Antígenos

Los estudios de comparación antigénica entre los distintos miembros de la familia de los ténidos fueron iniciados por Biguet et al., (79) y Capron et al., (80). Utilizando un suero hiperinmune contra T. saginata, demostraron que 16 de los 23 antígenos encontrados en este parásito estaban también presentes en otros seis géneros de cestodos. Adicionalmente, entre dos y cinco componentes de T. saginata fueron detectados en varias especies de tremátodos y nemátodos. Sin embargo, ellos identificaron un antígeno con aparente especificidad de especie en E. granulosus al cual designaron como arco 5. Este antígeno ha sido desde entonces el foco de un intenso análisis inmunológico y bioquímico (81-89). A pesar de que actualmente se sabe que está presente en T. solium, T. hydatigena, T. ovis y E. multilocularis (90-95), el arco 5 es sin lugar a dudas el antígeno mejor caracterizado de los miembros de la familia de los ténidos. El arco 5 es una lipoproteína con actividad  $\alpha$  y  $\beta$  carboxilesterasa y peso molecular (PM) de 400,000. Parece estar compuesto por varias subunidades unidas no-covalentemente. Cada subunidad tiene un PM de 67,000 y migran juntas, como una sola banda en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). A su vez, esta banda se disocia

en dos subunidades de 47,000 d y 20,000 d en presencia de 2-mercapto-etanol (2-ME). El arco 5 que es relativamente estable a 56°C y en un rango de pH entre 4 y 7, ha sido localizado en las células subtegumentales del protoescólex, de la membrana germinal y de la pared vesicular del equinococo (87-89). Menores cantidades han sido detectadas en las paredes de los ductos colectores y de las células flama. Estas observaciones sugieren que el arco 5 acumulado en el fluido hidatídico es el producto de la excreción del protoescólex y de la secreción de la membrana germinal y pared vesicular (87,89).

Otro antígeno del fluido hidatídico que ha sido bien caracterizado es el llamado antígeno B (82,96-98). El antígeno B es una proteína termoestable a 100°C que tiene un PM de 150,000. Está formado por tres tipos de subunidades unidas no-covalentemente, con PMs entre 10,500 y 20,000. El antígeno B ha sido localizado en los tejidos de E. granulosus y E. multilocularis (87,89). En el protoescólex se encuentra principalmente en la región del tegumento cercana a las ventosas, así como en los corpúsculos calcáreos. Además, ha sido localizado en las células subtegumentales de la membrana germinal y de la pared vesicular, por lo que se piensa que las células subtegumentales son las encargadas de sintetizarlo (87,89).

Se dispone además de información menos completa sobre las características de algunos antígenos de otras especies de ténidos. Campbell (99) ha reportado la obtención de fracciones proteicas, nucleoproteicas y polisacarídicas de T. taeniaeformis, que confieren inmunidad a ratas al ser inyectadas subcutáneamente.

Leid y Williams (100) han logrado purificar a homogeneidad un alergeno de T. taeniaeformis con PM de 50,000 y carga neta negativa. También Kwa y Liew (101) han purificado una proteína de T. taeniaeformis con PM de 140,000 que induce altos niveles de inmunidad en ratas. Una protección absoluta contra infección por T. taeniaeformis puede ser inducida en ratones con una fracción lipoprotéica de alto peso molecular obtenida de oncosferas (102).

En el caso de la T. pisiformis, Rickard y Katiyar (103) describieron la purificación parcial de dos proteínas secretadas por los metacéstodos al medio de cultivo, que inducen una marcada reacción anafiláctica en conejos infectados. Con respecto a la T. saginata se sabe que al menos siete antígenos del gusano adulto presentan poca reacción cruzada con otros ténidos (104). Tres de estos antígenos tienen algún valor en el diagnóstico de la cisticercosis bovina. Finalmente, se ha reportado la purificación parcial de dos fracciones antigénicas con posible utilidad diagnóstica, a partir de extractos crudos de proglótidos de T. saginata (105,106).

La información disponible acerca del papel que juegan los antígenos parasitarios en el mantenimiento de una relación estable con el huésped es prácticamente nula (ver Sección II.2).

#### ii) Anticuerpos

Sin lugar a dudas el modelo animal de cisticercosis más estudiado es el de rata o ratón infectados por T. taeniaeformis. Asimismo, se dispone de un conocimiento muy detallado sobre las características de la respuesta inmune de ambos huéspedes. En consecuencia, la siguiente revisión está limitada casi exclusiva-

mente a la cisticercosis de roedores. Es posible que muchas de las observaciones sean relevantes y aplicables a otras relaciones huésped-cisticerco, incluyendo la humana.

En ratas y ratones infectados, la respuesta de anticuerpos protectores aparece rápidamente (100,107-110). Al final de la segunda semana después de una infección primaria, un sistema efector mediado por anticuerpos, es capaz de proteger al huésped en contra de un reto por huevecillos. Durante la cuarta semana los niveles de anticuerpos son tan altos, que 0.25-0.5 ml del suero de un animal infectado confieren una resistencia casi absoluta a los receptores normales. Las inmunoglobulinas involucradas en esta notable respuesta son principalmente  $IgG_{2A}$  en la rata (100,107) e  $IgG_1$  e  $IgG_2$  en el ratón (110,111). Sin embargo, en infecciones prolongadas se ha involucrado la participación de otros isotipos (75).

La resistencia pasiva es dependiente de complemento. El abatimiento de los niveles circulantes de complemento, utilizando el factor del veneno de cobra, produce la pérdida de resistencia al reto en las ratas (75) y ratones (110) receptores del suero inmune. Los parásitos adquieren rápidamente la capacidad para evadir este mecanismo de ataque humoral, puesto que muchos cisticercos son capaces de sobrevivir, a pesar de que los huéspedes sean inmunizados pasivamente con anticuerpos protectores siete días después de la infección (75,108,110). Este fenómeno ha llevado a proponer la hipótesis de que la estabilidad de la relación huésped-cisticerco depende de la velocidad relativa con la que por un lado, el huésped monta una respuesta de anticuerpos protectores y

por el otro, el parásito adquiere sus propios mecanismos de evasión (112). El inicio de la capacidad evasora coincide con un cambio drástico en las características morfológicas de la superficie parasitaria (ver Sección II.2.b). Es posible que este cambio morfológico correlacione con alteraciones abruptas en el mosaico antigénico de la superficie parasitaria (74,113).

Simultáneamente con la aparición de anticuerpos protectores de la clase IgG en el suero de animales infectados, se producen otras respuestas humorales. Por ejemplo, anticuerpos de clase IgG son detectados tempranamente en el suero de ratas y ratones infectados con T. taeniaeformis (111,114) y de conejos infectados con T. pisiformis (115). A pesar de que no hay evidencias a favor de un efecto directo de los anticuerpos IgE sobre las larvas de ténidos, se ha demostrado que las ratas protegidas por transferencia de anticuerpos IgG<sub>2A</sub> destruyen más eficientemente a las oncosferas cuando se les induce previamente una respuesta específica por IgE (116). Se ha sugerido que este efecto se debe a eventos alérgicos locales en la cercanía de los parásitos, los cuales facilitan la llegada de anticuerpos protectores y de complemento provenientes del compartimiento vascular.

Anticuerpos de la clase IgA son también producidos en ratas y ratones infectados por T. taeniaeformis (117,118). Es posible que estos anticuerpos participen en la transferencia pasiva de inmunidad de las madres a las crías vía calostro y leche.

### iii) Células

Además de los eventos celulares que suceden en las cercanías del metacéstodo en desarrollo (ver Sección II.2.b), algunos cam-

bios fisiopatológicos ocurren a nivel sistémico. En el caso de ratas infectadas con T. taeniaeformis, el número de células plasmáticas se incrementa no sólo en el tejido hepático, sino también en los nódulos linfáticos del hígado y bazo, así como en la lámina propia del intestino (119,120). Las células cebadas también se incrementan en la lámina propia a partir del décimo día de infección y permanecen aumentadas durante varios meses (121). Las células cebadas poseen IgE no solo en su membrana sino también intracitoplásmicamente (113). A su vez, los números de eosinófilos intestinales se incrementan a partir del día 7 post-infección (121). El patrón subsecuente de eosinofilia intestinal tiene una conducta paralela con la eosinofilia en sangre periférica: los valores máximos se alcanzan entre los días 30 y 40 post-infección y después disminuyen hasta valores normales (122).

Se dispone de muy poca información que sugiera la participación de linfocitos T en alguna clase de inmunidad en cisticercosis. Ratones atímicos (deficientes en células T) pueden ser protegidos al reto con oncosferas de T. taeniaeformis, por transferencia de suero de animales infectados (110). Esto indica que los mecanismos efectores en los ratones receptores del suero inmune no dependen de la participación de linfocitos T. Sin embargo, la transferencia adoptiva de linfocitos T y B (obtenidos de nódulos linfáticos del hígado) de ratas infectadas a ratas normales produce una ligera disminución en el número de oncosferas viables durante las primeras 12 horas post-infección (113). En consecuencia, aunque la participación de mecanismos efectores mediados celularmente no puede ser descartada, su relevancia para entender

los mecanismos inmunológicos del huésped cisticercoso parece mínima.

## 2.- INTERFASE HUESPED-PARASITO

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.

### a) Superficie parasitaria

La superficie que el cisticerco presenta a su huésped humano o porcino, es un tegumento citoplásmico sincicial y continuo en toda la cara externa de la pared vesicular. Puesto que los céstodos carecen de tracto digestivo, obtienen sus nutrientes y excretan sus deshechos a través de la superficie tegumental (123). En congruencia con su función de absorción, la superficie externa del tegumento aparece aumentada por proyecciones digitiformes (Fig. 10) a las que Rothman designó como microtricas (124-126). Estas proyecciones son similares a las microvellosidades que constituyen los ribetes de cepillo en diversos epitelios de vertebrados e invertebrados (127,128).

A diferencia de los parásitos nemátodos que poseen láminas o cutículas fibrosas (123), la superficie del cisticerco en contacto con el huésped es una membrana plasmática que como tal debería ser susceptible al daño por los diversos mecanismos de defensa del huésped, vgr.: complemento, células efectoras, compuestos tóxicos, etc. Sin embargo, a pesar de que el huésped desa-

rrrolla una respuesta inflamatoria específica (ver Sección II.2. b), la superficie del parásito no sufre daño aparente (73,74, 129-131), al menos durante ciertos períodos.

Distintos estudios indican que la membrana plasmática tegumental posee un rico glicocálix (Fig. 10) formado por glicolípidos y glicoproteínas (123,130-132). Algunas glicoproteínas aparentemente están involucradas en fenómenos de transporte de solutos (123,133), mientras que otras pudieran jugar papeles protectores. A este respecto, se ha demostrado que una glicoproteína que se lava fácilmente de la superficie de los metacéstodos de T. taeniaeformis, tiene la capacidad de inhibir la cascada de coagulación y de consumir complemento (134,135). Adicionalmente, se ha encontrado que esta misma glicoproteína (que posee abundante residuos de azúcares polisulfatados) impide la unión de leucocitos a la superficie del cisticerco (136). Con base en lo anterior, se ha propuesto que la continua secreción de estas moléculas glicoprotéicas genera una barrera contra el ataque celular y humoral del huésped (135,136).

En el caso del Echinococcus granulosus el limitado conocimiento de los componentes de superficie proviene de un continuado esfuerzo de caracterización antigénica del fluido vesicular (81-86). Este énfasis es comprensible si se considera que la mayor parte de los componentes antigénicos reconocidos por sueros de humano y ovinos infectados, están presentes en el fluido vesicular. Al menos uno de los antígenos del fluido, es una glicoproteína también expuesta en la superficie externa del quiste hidatídico: Antígeno B (87-89).



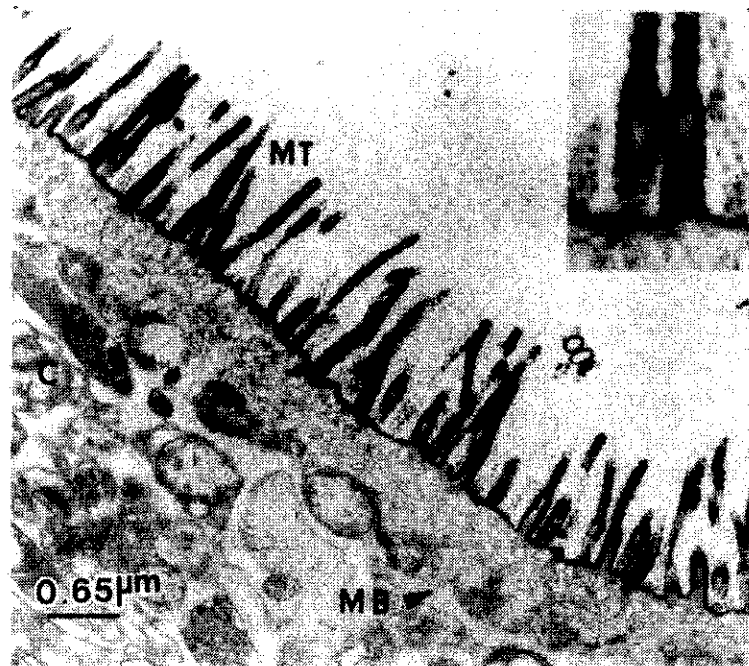


FIG. 10. Micrografía electrónica de transmisión de un corte de la pared vesicular del cisticerco de la *T. solium*. C: canales citoplásmicos; M: músculo; MB: membrana basal; MT: microtricas. El inserto presenta un detalle de la superficie externa del tegumento. El tejido fue post-fijado en presencia de rojo de rutenio para evidenciar al glicocalix.

Oaks y Lumsden (137) han aportado evidencia directa sobre la elaboración de los componentes carbohidratos de superficie en H. diminuta y L. tenuis. Los gusanos incubados con azúcares tritidos, incorporan cantidades importantes de radiactividad en una fracción protéica asociada a membrana. Estudios autoradiográficos mostraron que las células subtegumentales son el principal sitio de incorporación de las hexosas radiactivas. Posteriormente, las glicoproteínas radiactivas son transportadas hasta el tegumento. Similarmente, estudios autoradiográficos con aminoácidos radiactivos, indican que las proteínas son sintetizadas también en las células subtegumentales y subsecuentemente transportadas a la superficie (138,139). Se ha sugerido por lo tanto, que los componentes de superficie son sintetizados en el retículo endoplásmico de las células subtegumentales, incorporados a vesículas en el aparato de Golgi y transferidos hasta el tegumento, a través de los puentes citoplásmicos existentes entre ambos (137,138). Por consiguiente, la formación del glicocálix de los céstodos es similar a la demostrada en otros sistemas como la mucosa intestinal (140) y hepatocitos (141). Además al igual que el glicocálix de muchas células animales (142), el de los céstodos es una estructura dinámica. A este respecto, se ha calculado que el tiempo medio de recambio de los componentes carbohidratos del glicocálix de H. diminuta, es de seis horas (137).

Sin embargo, no todos los componentes de la superficie tegumental de los céstodos son sintetizados por el parásito. Se ha demostrado la presencia de inmunoglobulinas del huésped sobre la superficie de los metacéstodos de T. solium (143), T. taeniaefor-

mis (144), T. crassiceps (107), Hymenolepis diminuta y H. microstoma (145,146), y de Mesocestoides corti (147,148). Algunos estudios indican que IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 están presentes en la superficie de cisticercos de T. crassiceps, aunque IgG1 e IgM se encuentran en mayor cantidad (107). Asimismo, Mitchel y cols. (147) encontraron todas las clases y subclases anteriores a excepción de IgA en M. corti, aunque nuevamente IgG1 e IgM eran las más abundantes. Befus (145,146) encontró IgM, IgA, IgG1 e IgG2 sobre la superficie de H. microstoma y H. diminuta. Finalmente, en el caso de T. solium y T. taeniaeformis, solo se investigó la presencia de IgG (143,144). Es posible que las inmunoglobulinas en la superficie tengan un papel protector (144), sin embargo, la presencia del recubrimiento de superficie por inmunoglobulinas del huésped, no es suficiente para proteger totalmente al parásito contra el ataque por anticuerpos del huésped. Una gran proporción de cisticercos de T. crassiceps obtenidos de ratones con infecciones prolongadas, sufren daño inmunológico tanto in vivo como in vitro (71,149-151).

Las inmunoglobulinas no son los únicos componentes inmunológicos del huésped presentes en la superficie de los metacéstodos. Se ha demostrado la presencia del factor C3 del complemento en la superficie de cisticercos de T. solium obtenidos de humano (152) y de cerdo (153), así como de T. taeniaeformis obtenidos de rata (136). En el caso de la T. taeniaeformis, la cantidad de C3 sobre la superficie guarda una relación inversa con la abundancia de azúcares sulfatatos en el glicocálix. Cabe hacer notar que las inmunoglobulinas siempre se han observado distribuidas uni-

formemente sobre la superficie de los metacéstodos.

Además de las funciones absorptiva y secretora del tegumento, recientemente se ha demostrado una capacidad pinocítica notable (154,155) en plerócercoides de Schistocephalus solidus y Lingula intestinalis (Céstodos, Pseudofílidos). En estos organismos, los pinosomas son transportados de la superficie hasta la membrana basal del tegumento. Posteriormente, pueden ser descargados hacia el tejido intersticial subyacente o acarreados hasta las células subtegumentales, en donde se fusionan con lisosomas. El transporte o movimiento de los pinosomas, desde la superficie externa hasta la membrana basal del tegumento, ocurre en alrededor de seis minutos. Este potencial endocítico puede tener dos posibles funciones que no se excluyen entre sí. La primera puede estar relacionada con requerimientos nutricionales no cubiertos por el transporte activo de solutos, mientras que la segunda función puede ser protectora. El proceso de pinocitosis acoplado al de catabolismo lisosomal, bien pudiera servir para reciclar regiones de la membrana externa que han sido dañadas o bloqueadas. Tal mecanismo tiene un obvio valor para la sobrevivencia del parásito en contacto con el sistema inmune del huésped, puesto que la superficie estaría expuesta solo durante períodos muy cortos. Incluso se ha propuesto que la superficie parasitaria podría actuar como un "pozo" consumidor de anticuerpos (156).

En resumen, se dispone de información razonablemente buena acerca de la ultraestructura y fisiología del tegumento de los metacéstodos. Sin embargo, poco se ha hecho para definir los constituyentes de la superficie en términos moleculares, así como

la(s) función(es) que cada uno desempeña. Es claro que los estudios dirigidos en este sentido, pueden aportar información valiosa que aumente nuestro entendimiento sobre los mecanismos finos que modulan la compleja interacción huésped-cisticerco.

b) Respuesta Inflamatoria del Huésped

La presencia del cisticerco en los tejidos del huésped intermediario provoca la formación de una respuesta inflamatoria. Estudios ultraestructurales de metacéstodos alojados en tejidos de mamíferos, muestran que la interacción huésped-parásito ocurre a través de un contacto íntimo entre las microtricas tegumentales del cisticerco y las células y fluidos tisulares del huésped.

Willms y Merchant (129) han descrito la reacción inflamatoria que rodea a los cisticercos de la T. solium localizados en músculo esquelético de cerdo. Todos los parásitos se encuentran rodeados por una cápsula fibrosa que se les desprende fácilmente. El infiltrado inflamatorio, que es más abundante frente a los polos y escólex del cisticerco, presenta un gran número de eosinófilos asociados íntimamente a la superficie parasitaria. En otras regiones del tegumento, las células predominantes son los macrófagos y las células epitelioides. Finalmente, a mayor distancia del parásito se encuentran linfocitos y células plasmáticas, así como macrófagos, células epitelioides, células gigantes, células cebadas y fibroblastos. Estas observaciones son similares a las descritas por otros autores para cisticercos en el parénquima cerebral de cerdos (57). Adicionalmente, se ha demostrado una síntesis activa de anticuerpos (dirigidos en contra del cisticerco)

por las células plasmáticas de la reacción inflamatoria (131, 153). En cambio, la presencia y (o) participación de células T en el infiltrado no ha sido investigada. Por lo descrito anteriormente, la reacción inflamatoria que rodea al cisticerco de la T. solium en el músculo de cerdo, puede considerarse como un granuloma, en el que al menos están presentes elementos inmunológicos humorales. Cabe hacer notar que solo excepcionalmente es posible detectar indicios de daño en las estructuras del cisticerco en contacto con el granuloma (129,131). Esto indica que el parásito está adaptado para sobrevivir en un ambiente claramente hostil.

En el caso de otras especies de ténidos, se tiene un conocimiento adicional sobre la evolución de la respuesta inflamatoria durante el desarrollo del parásito en su huésped intermediario. Por ejemplo, el metacéstodo de la T. taeniaeformis se aloja principalmente en el tejido hepático de la rata. Durante los primeros siete días del desarrollo presenta una gran cantidad de microvellosidades en su superficie (73), que son substituídas abruptamente por microtrícas al octavo día (74). Inicialmente (1-2 días), solo se observa un halo de restos celulares alrededor de la oncosfera (157-160). Entre los dos y los cinco días post-infección, ocurre una destrucción masiva de las células del huésped en vecindad con el parásito, que produce un mayor reclutamiento de células inflamatorias durante el sexto y séptimo día (73). Los eosinófilos comienzan a aparecer durante el sexto día, mientras que para el día siete el granuloma presenta varios tipos de leucocitos polimorfonucleares, así como macrófagos y fibroblastos. A partir del

día ocho post-infección, las microtricas han sustituido a las microvellosidades de los estadios tempranos (74) Para ese tiempo, las células fagocíticas del huésped emiten procesos citoplásmicos que se interdigitan con las microtricas sin producir ninguna señal de daño en el parásito. En cambio, las células del huésped aparecen dañadas y sus contenidos citoplásmicos vaciados hacia el espacio intersticial. Alrededor del día 18 post-infección, la actividad fibroblástica ha producido una cápsula fibrosa que rodea al cisticerco, en la que persiste un abundante infiltrado de varias capas celulares de espesor. La composición celular del granuloma en ese tiempo incluye un gran número de macrófagos, polimorfonucleares (eosinófilos y neutrófilos) y células cebadas, además de los fibroblastos. Las células fagocíticas cercanas al parásito, aunque mantienen un estrecho contacto con las puntas de las microtricas, ya no presentan pseudópodos interdigitados con ellas. Nuevamente, no se observan señales de daño en el parásito, mientras que las células más cercanas del huésped presentan discontinuidades en la membrana plasmática, fragmentación nuclear, vacuolización citoplásmica y pérdida de la integridad de sus organelos (74). En contraste con la aparente invulnerabilidad de los cisticercos a la respuesta primaria del huésped, se ha demostrado la presencia de anticuerpos protectores en el suero de las ratas a partir de la segunda semana post-infección (100,144) (ver también Sección II.1.b).

En el caso de la cisticercosis murina por Taenia crassiceps, se dispone además de información sobre los eventos inflamatorios que producen la destrucción del parásito en ratones previamente

inmunizados (70,149,161). Inicialmente, las larvas son encapsuladas principalmente por macrófagos y eosinófilos. En los estadios tempranos del encapsulamiento, ambos tipos celulares muestran severos cambios degenerativos incluyendo alteraciones en sus membranas. Al mismo tiempo, la superficie tegumental del parásito no presenta evidencias de daño. Más tarde, algunas células cebadas aparecen en la cápsula. Después de que las células cebadas concurren en grandes números, los demás tipos celulares aparecen normales, mientras que comienzan a observarse señales de daño en el parásito. Finalmente, la interacción de los macrófagos, eosinófilos y células cebadas provoca la muerte del cisticerco encapsulado. De acuerdo con los autores, el papel efector de los linfocitos parece secundario (161), mientras que los macrófagos y los eosinófilos son las principales células efectoras. La acción de las células cebadas es crítica aunque no directa sobre los cisticercos. Es posible que estas células protejan de algún modo a los macrófagos y eosinófilos. La protección de las células cebadas podría deberse a la inactivación de sustancias tóxicas liberadas por el parásito, o, a que algunos de sus productos modifiquen la naturaleza de las secreciones de los macrófagos y eosinófilos (161). A este respecto, se sabe que los productos de las células cebadas ejercen una acción reguladora de la función linfocítica (162).

Otro hallazgo que ilustra la naturaleza dinámica de la interacción huésped-cisticerco, ha sido descrito en el modelo murino. En animales infectados con metacéstodos de T. crassiceps, el crecimiento parasitario presenta una conducta bifásica (70). Durante



las primeras tres semanas los metacéstodos se reproducen aceleradamente. En cambio, entre la cuarta y quinta semana, el número de parásitos no solo no se incrementa sino que se destruyen la mayor parte de ellos (~80%). La velocidad reproductiva inicial solo se recupera a partir de la sexta semana. Estos resultados sugieren que al comienzo de la infección, los parásitos no tienen restricción para su crecimiento en ausencia de una respuesta inmune. Hay un periodo crítico (quinta y sexta semanas), a partir del cual el huésped solo permite el desarrollo de los parásitos adaptados para sobrevivir en presencia de una respuesta inmune bien montada. En el caso de metacéstodos transplantados a ratones previamente infectados, la respuesta inmune preexistente parece sobrepasar la capacidad adaptativa del parásito (70).

Tratando de plantear generalizaciones a partir de la información presentada anteriormente, es claro que las principales células efectoras en parasitosis por metacéstodos son los eosinófilos y los macrófagos. Esta generalización parece razonable puesto que ambos tipos han sido involucrados como principales células efectoras en otras helmintiasis (163,164). Sin embargo, tanto los eosinófilos como los macrófagos solo pueden desarrollar una acción efectora eficiente, en huéspedes inmunizados por una infección previa. Al menos en el caso del Schistosoma mansoni la adhesión de ambas células a la superficie del parásito es principalmente debida a los anticuerpos IgG e IgE (163-165). Adicionalmente, puesto que los huéspedes cisticercosos son resistentes a una reinfección a pesar de su incapacidad para destruir a los parásitos ya establecidos, parece razonable suponer que los anticuerpos protectores

deben estar dirigidos en contra de antígenos presentes en los estadios tempranos del desarrollo parasitario. Esta suposición es apoyada por el hecho de que los antígenos "no vivos" que confieren una mayor protección al huésped, son los obtenidos de las oncosferas (102,166-168). Además, el cambio en la estructura de superficie que ocurre entre el séptimo y el octavo día del desarrollo oncosferal, sugiere fuertemente un cambio concomitante en el mosaico antigénico expuesto (74). Aunque sólo se puede elucubrar acerca de los mecanismos por los que los estadios más avanzados evitan el ataque inmune (135), la aplicación de técnicas inmunoelectromicroscópicas para la demostración de variaciones antigénicas, o de la presencia de factores de superficie con actividad fijadora de complemento, pudieran aportar alguna luz sobre el fenómeno.

### 3.- OBJETIVOS Y DESARROLLO DEL TRABAJO

El objetivo primordial de la presente tesis, fue el de contribuir al entendimiento del papel que juegan algunos componentes moleculares del cisticerco de la *T. solium* en la relación huésped-parásito.

Para varios sistemas de cisticercosis animal, se dispone de una visión panorámica sobre los efectos que ocurren a nivel local y sistémico durante la invasión de un huésped mamífero por un metacéstodo (ver Secciones anteriores del Capítulo II). Se ha logrado caracterizar cualitativa y dinámicamente la respuesta inmunológica del huésped. De este modo, es claro que el huésped infectado es resistente a una subsecuente infección, y sin embargo,

no es capaz de resistir a los cisticercos ya establecidos. Aunque al respecto de la cisticercosis por T. solium no se dispone de información en este sentido, dada la coincidencia de resultados para otras especies de ténidos, es muy posible que éste sea también el caso.

El avance hacia la caracterización de algunos antígenos de metacéstodos es considerable. Sin embargo, puesto que estos estudios han sido casi totalmente dirigidos hacia el desarrollo de métodos diagnósticos e (o) inmunoprolifácticos, se ha obtenido muy poca información acerca del papel que cada antígeno juega en la relación huésped-metacésto. En este sentido, los ejemplos del arco 5 y del antígeno B del quiste hidatídico son muy ilustrativos. En ambos casos, se conocen sus características físico-químicas y su localización en los tejidos del parásito. Al respecto del arco 5, aunque se han propuesto mecanismos que parecen razonables para explicar su presencia en el fluido hidatídico (ver Sección II.1.b), no se entiende cómo es que este antígeno es liberado por el parásito para entrar en contacto con el aparato inmune del huésped. Similarmente, se dispone de evidencia ultramicroscópica que demuestra la presencia del antígeno B en la superficie del E. granulosus. Se sabe además, que la mayor parte de humanos y animales infectados presentan altos niveles de anticuerpos anti-B. Sin embargo, hasta donde alcanza mi conocimiento de la literatura, no es posible responder una pregunta sorprendentemente elemental: ¿Porqué no se produce daño mediado humoralmente si el antígeno B está presente en la superficie del quiste hidatídico? Es contrastante la profundidad de conocimien-

tos sobre los aspectos fisicoquímicos de estos antígenos con el entendimiento de su participación en la relación huésped-parásito. Cabe hacer notar que el gran énfasis que había sido dirigido hacia estudios básicos de ambas proteínas, desapareció a raíz del descubrimiento de su falta de especificidad como herramientas diagnósticas.

Por lo descrito anteriormente, el objetivo planteado al comienzo de esta Sección parecía razonable. La estrategia general consistiría en purificar antígenos parasitarios, para la obtención de anticuerpos específicos que serían utilizados en diversos ensayos.

La metodología se describe en el siguiente capítulo bajo tres rubros principales: Métodos bioquímicos, métodos inmunológicos y métodos microscópicos. Los procedimientos medulares para el desarrollo del proyecto, se describen con gran detalle. En cambio, algunos métodos de referencia son presentados en forma abreviada.

En el Capítulo IV se presentan los resultados de los estudios dirigidos a entender la participación del antígeno B (ver Sección II.1.a) del cisticerco de la T. solium, en el mantenimiento de la relación huésped-parásito. La purificación del antígeno B, que es el antígeno más frecuentemente reconocido por sueros de pacientes neurocisticercosos, fue lograda por razones relativamente azarosas. Inicialmente se intentaba aislar una proteína del cisticerco que tenía la propiedad de polimerizar en presencia de ATP. Cuando se logró purificarla, se obtuvieron los anticuerpos correspondientes en conejos. Inesperadamente, al lle-

var a cabo las primeras inmunolectroforesis, se encontró que la proteína purificada presentaba un bandeo idéntico al del antígeno B en el extracto crudo. Posteriormente, al enfrentar la proteína con sueros de pacientes cisticercosos se encontró que correspondía con el antígeno B del cisticerco. Aunque el método empleado para purificar a este antígeno fue modificado y mejorado a lo largo del estudio, en esta tesis sólo se describe la versión final. Es necesario señalar que el antígeno B del cisticerco es una entidad distinta al antígeno B de E. granulosus y a otros antígenos reportados anteriormente.

Los anticuerpos anti-B se utilizaron para estudios de localización en la superficie y en el tejido del cisticerco. Los resultados de estos estudios aunados al hallazgo de propiedades tipo fibronectina en el antígeno B (169,170), permitieron proponer una hipótesis que pretende explicar el papel de este antígeno en la relación huésped-cisticerco.

En la parte final del Capítulo IV, se describen estudios para caracterizar adicionalmente las propiedades de fibronectina del antígeno B. Es interesante mencionar que estos estudios han resultado en un método rápido de purificación, que aprovecha una de sus propiedades de fibronectina.

En el Capítulo V se presenta la purificación y caracterización de otros componentes de la superficie parasitaria. En este caso, la estrategia inicial consistió en la purificación de glicoproteínas. Como es bien conocido, casi todas las proteínas de superficie en 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 (171,172). En consecuencia, al intentar obtener glicoproteínas del cisticerco, se tenía como segundo objetivo el perseguir componentes de superficie o de secreción.

Para ese entonces, se habían realizado varios esfuerzos para purificar otros antígenos, que desafortunadamente habían tenido poco éxito. La razón aparente para explicar la notable dificultad en la purificación de componentes parasitarios, parecía deberse al menos en parte, a la complejidad de los extractos crudos iniciales. El cisticerco posee un tejido constituido por al menos seis tipos celulares (173). Debido a la naturaleza sincicial del tejido de los céstodos, no ha sido posible aislar y cultivar líneas celulares definidas. Esto hace que el extracto crudo a partir del cual se inician los intentos de purificación, sea de una complejidad extrema, que impide que las metodologías bioquímicas tradicionales sean de utilidad. Lo anterior sugirió que una alternativa metodológica eran los modernos métodos de purificación por afinidad. Puesto que no se disponía de anticuerpos contra cada uno de los componentes parasitarios, se decidió el uso de una lectina como factor de especificidad para el aislamiento de proteínas con residuos carbohidratos (glicoproteínas). La canavalina A (Con-A) resultó seleccionada por estar bien caracterizada, ser disponible comercialmente, así como por su especificidad hacia grupos carbohidrato muy comunes en las glicoproteínas (174). De este modo, el uso de Con-A garantizaba el atrapamiento

de un buen número de glicoproteínas del cisticerco, lo que a su vez permitía su posterior purificación.

En resumen, el procedimiento consistió en utilizar una columna de Con-A sefarosa 4B para la obtención de fracciones enriquecidas en glicoproteínas. La purificación de cinco glicoproteínas a partir de la fracción enriquecida se llevó a cabo siguiendo un método de electroelusión de las bandas correspondientes en geles de poliacrilamida. Las glicoproteínas electroeluídas permitieron la obtención de anticuerpos con los cuales se realizaron estudios de caracterización inmunológica y de localización en el tejido del cisticerco.

En el Capítulo VI se discuten conjuntamente los resultados incluídos en esta tesis. Asimismo, se plantean y analizan los proyectos resultantes del presente trabajo, hacia los cuales se planea dirigir los esfuerzos futuros.

### III. MATERIALES Y METODOS

#### 1.- MATERIALES

##### a) Metacéstodos

Los cisticercos fueron obtenidos del músculo esquelético de cerdos altamente infectados, provenientes de canales decomisadas en varios rastros oficiales de la Ciudad de México. Para los experimentos de extracción de antígenos, el fluido vesicular era eliminado por punción de la vesícula y las larvas se almacenaban a  $-75^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso. Para los experimentos de yodinación, se seleccionaban los cisticercos con vesículas intactas y se lavaban tres veces en una solución de cloruro de sodio 0.15 M, fosfatos 0.01 M, pH 7.2 (PBS), antes de ser usados. Para los experimentos de inmunocitoquímica, los cisticercos intactos eran lavados o no como se describió arriba y fijados en 2% de paraformaldehído, 0.25% de glutaraldehído en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.2, durante 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los grupos aldehído reactivos en el tejido, fueron bloqueados incubando los cisticercos en una solución de glicina 0.1 M en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.3, durante 1 h a  $4^{\circ}\text{C}$ .

##### b) Reactivos Químicos y Biológicos

La albúmina sérica bovina (BSA), la agarosa Tipo III, el ácido etilén-diamino tetraacético (EDTA), el alfa-metil-manósido ( $\alpha\text{mm}$ ), la concanavalina A (Con-A) y la sefarosa 4B activada con



bromuro de cianógeno fueron obtenidos de Sigma Chemical Company. Todos los reactivos para electroforesis en gel de poliacrilamida fueron obtenidos de Bio-Rad Laboratories. La sefarosa-4B, el sefadex G-200 y la dietilaminoetil-celulosa (DEAE-celulosa), de Pharmacia Fine Company. El reactivo de Bolton-Hunter ( $I^{125}$ ) y el yoduro de sodio ( $I^{125}$ ), de Amersham International. Los adyuvantes completo (ACF) e incompleto (AIF) de Freund, se obtuvieron de Difco Laboratories. La emulsión fotográfica NTB2 y las placas para rayos X de Kodak. La emulsión L4 de Ilford. Todos los demás reactivos usados fueron de grado analítico así como los demás materiales fueron de la mejor calidad disponible comercialmente. El origen de algunos anticuerpos comerciales se indicará al describir su uso. Los sueros de los pacientes con neurocisticercosis fueron amablemente aportados por la Dra. Ana Flisser del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Asimismo, la colágena de piel de cobayo fué amablemente aportada por el Dr. Alfonso Torre Blanco del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias, UNAM.

## 2.- METODOS

### a) Bioquímicos

#### i) Obtención de los extractos crudos de cisticercos (EC)

1) El EC a partir del cual se purificaron el antígeno B (AgB) y las glicoproteínas del cisticerco, se obtuvo por el procedimiento siguiente: Los cisticercos recién descongelados

fueron homogeneizados en 0.45 M de NaCl (5ml/g de larvas húmedas) conteniendo 2.5 mM de EDTA, 0.04% (p/v) de p-hidroximercuriobenzoato (PHMB) 0.006% (p/v) de fenil-dimetil-sulfonilfluoruro (PMSF), y 0.001 M de fosfatos en un homogeneizador Polytron (Brinkmann Instruments), a máxima velocidad, durante 1-2 min a 4°C. El homogenado, que era una suspensión blanquecina, fué aclarado por centrifugación a 100,000 g durante 35 min a 4°C y dializado exhaustivamente contra PBS a 4°C. 2) El EC a partir del cual se purificó al AgB por cromatografía de afinidad, fué obtenido por homogeneización de los cisticercos recién descongelados en PBS, utilizando las mismas condiciones, instrumento y relación (volumen de solución extractora/g de tejido húmedo). La centrifugación en este caso se llevó a cabo a 150,000 g durante 120 min a 4°C. 3) Para algunos ensayos de inmunoelectrotransferencia, los cisticercos eran homogeneizados directamente en la solución de muestra para electroforesis en geles de poli-acrilamida con SDS que contenía: Dodecil sulfato de sodio al 1% (p/v), mercaptoetanol al 1% (v/v), EDTA al 0.075% (p/v), glicerol al 10% y trazas de azul de bromofenol, en tris-HCl 0.05 M, pH 6.8.

ii) Purificación de proteínas parasitarias

-Purificación del antígeno B (175). Un resumen del procedimiento de purificación del AgB se presenta en la Fig. 11. El extracto crudo obtenido como se describió anteriormente, era dializado contra ácido acético 0.5 M, pH 2.5, usando una membrana estándar de celulosa (peso molecular de exclusión menor

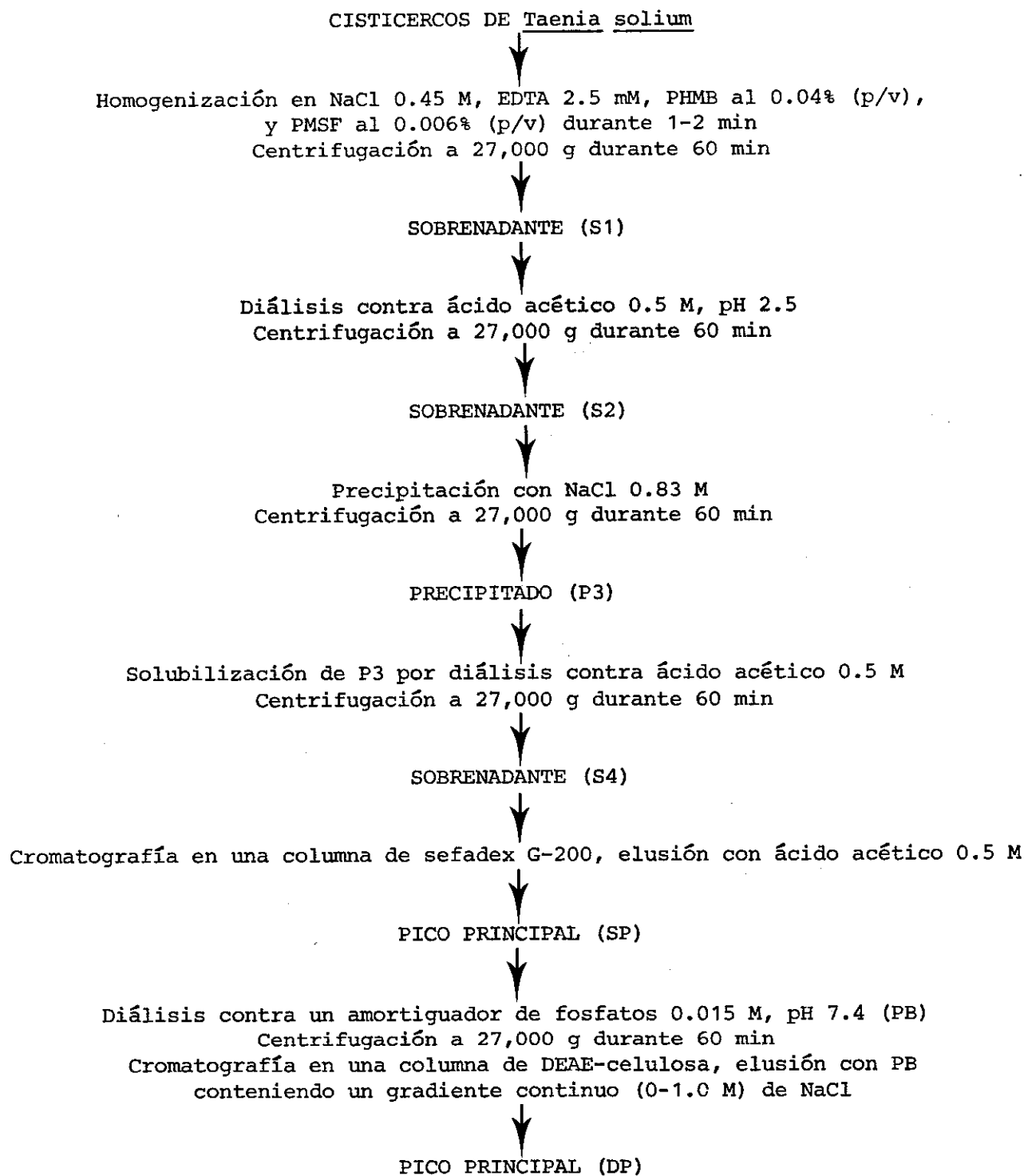


FIG. 11. Resumen del protocolo para la purificación del antígeno B a partir de cisticercos de la Taenia solium. Todos los procedimientos se llevaron a cabo a 4°C. Una explicación detallada se presenta en el texto.

a 12.000-14,000). La emulsión turbia obtenida de la diálisis, era centrifugada a 27,000 g por 60 min a 4°C, y el sobrenadante claro (S2), era diluído hasta una concentración de proteína de 0.5 mg/ml, en 0.5 M de ácido acético.

Posteriormente, S2 era precipitado por sales adicionándole gota a gota una solución concentrada de NaCl manteniendo una agitación continua, hasta alcanzar una concentración de 0.83 M de NaCl. La mezcla era agitada durante 2 h a 4°C y centrifugada a 27,000 g por 60 min a 4°C. El sobrenadante era descartado y el precipitado (P3) resuspendido por diálisis contra 0.5 M de ácido acético. El material insoluble era eliminado por centrifugación como arriba, y el sobrenadante claro (S4) era cromatografiado a través de una columna de sefadex G-200 (40 x 2.6 cm) e-luída con 0.5 M de ácido acético (velocidad de flujo: 5 ml/cm<sup>2</sup>/h). Se colectaban fracciones de 2.5 ml y se determinaba su absorbancia a 230 nm utilizando un espectrofotómetro Zeiss PMQII. La absorbancia a 230 nm fue seleccionada en lugar de 280 nm, con el objeto de aumentar la sensibilidad de la detección. En una cromatografía típica, se aplicaban a la columna 10 ml de S4 con una concentración de proteína de 0.5 mg/ml. Las proteínas recuperadas en el pico mayor (Fig. 12) constituían un 45-50% de la cantidad de muestra aplicada a la columna. Los otros picos constituían apenas un 15-25%. Por lo tanto, la recuperación cuantitativa de esta cromatografía era de aproximadamente 70%.

Las fracciones correspondientes al pico mayor eran mezcladas y concentradas 4-5 veces utilizando unidades sumergibles de

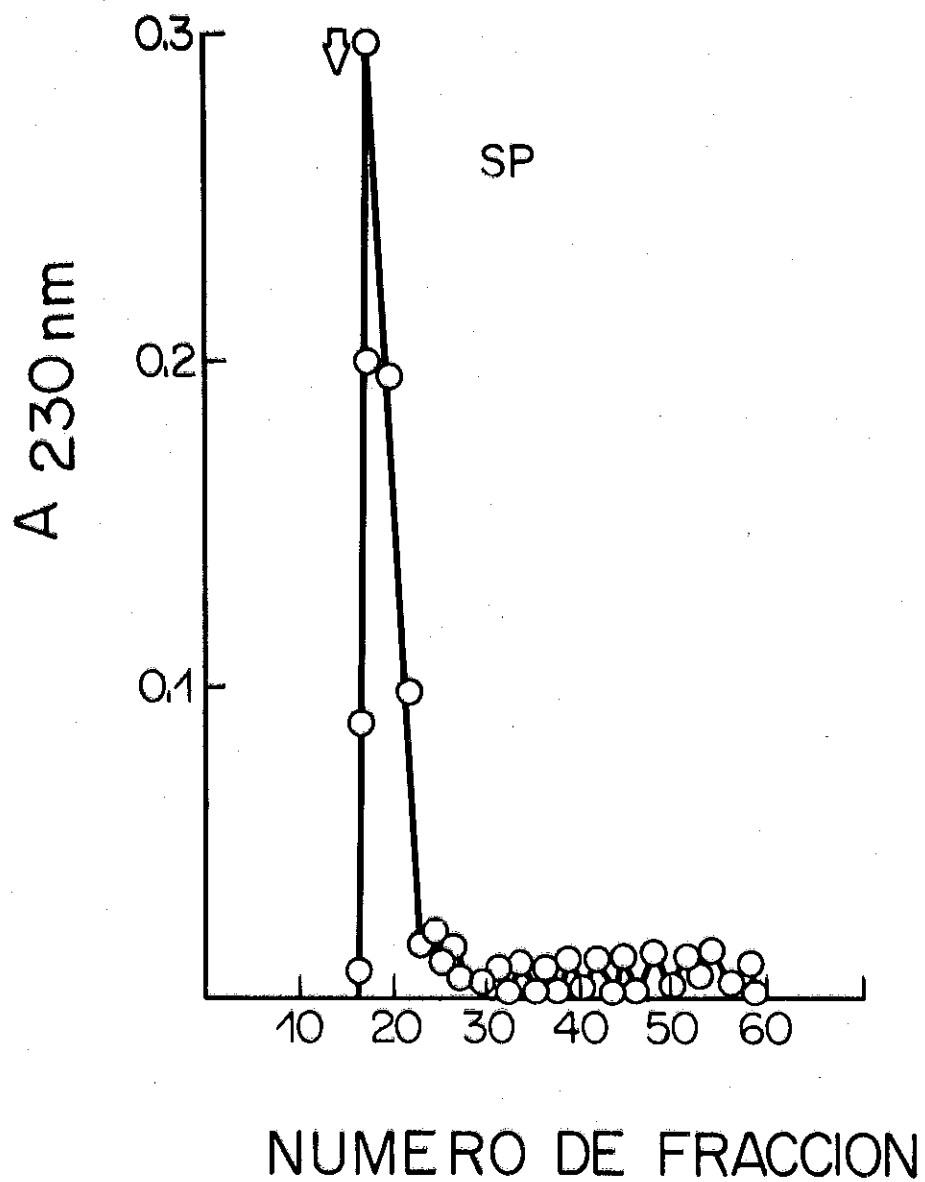


FIG. 12. Perfil de elusión de S4 a través de una columna de sefadex G-200. La cromatografía se llevo a cabo utilizando ácido acético 0.5 M como eluente.

ultrafiltración CX-10 (Millipore Corp.). Esta fracción designada como SP, era dializada contra 0.015 M de amortiguador de fosfatos, pH 7.4. Después de una centrifugación a 27,000 g por 60 min a 4°C, el sobrenadante era pasado a través de una columna de DEAE-celulosa (volumen de cama: 10-15 ml) y eluído con un amortiguador de 0.015 M de fosfatos, pH 7.4. Comúnmente, se aplicaban 5-15 ml de SP (0.5 mg de proteína/ml) con una velocidad de flujo de 25 ml/h. Después del cargado de la columna, las proteínas que no se habían unido a la resina eran eluídas pasando 10-15 ml del amortiguador de fosfatos. Las proteínas retenidas eran eluídas de la columna con un amortiguador de fosfatos que contenía un gradiente continuo de NaCl (0-1.0 M). Se colectaban fracciones de 2.5 ml y se determinaba su absorbancia a 230 nm. Las fracciones incluidas en el único pico obtenido por el gradiente (Fig. 13), eran mezcladas y concentradas 2-3 veces. El material resultante era designado como fracción DP. La concentración de proteínas y de carbohidratos en muestras de cada paso del procedimiento de purificación, era determinada usando el método de Lowry, modificado por Hartree (176) y el de fenol-sulfúrico (177), respectivamente.

- Purificación de AgB por cromatografía de afinidad: El antígeno B fue parcialmente purificado a partir de EC utilizando una columna de sefarosa-4B-colágena (ver Sección III.2. a.ix) equilibrada en PBS. La columna tenía un volumen de cama de 12 ml de sefarosa 4B conteniendo ~100 mg de colágena

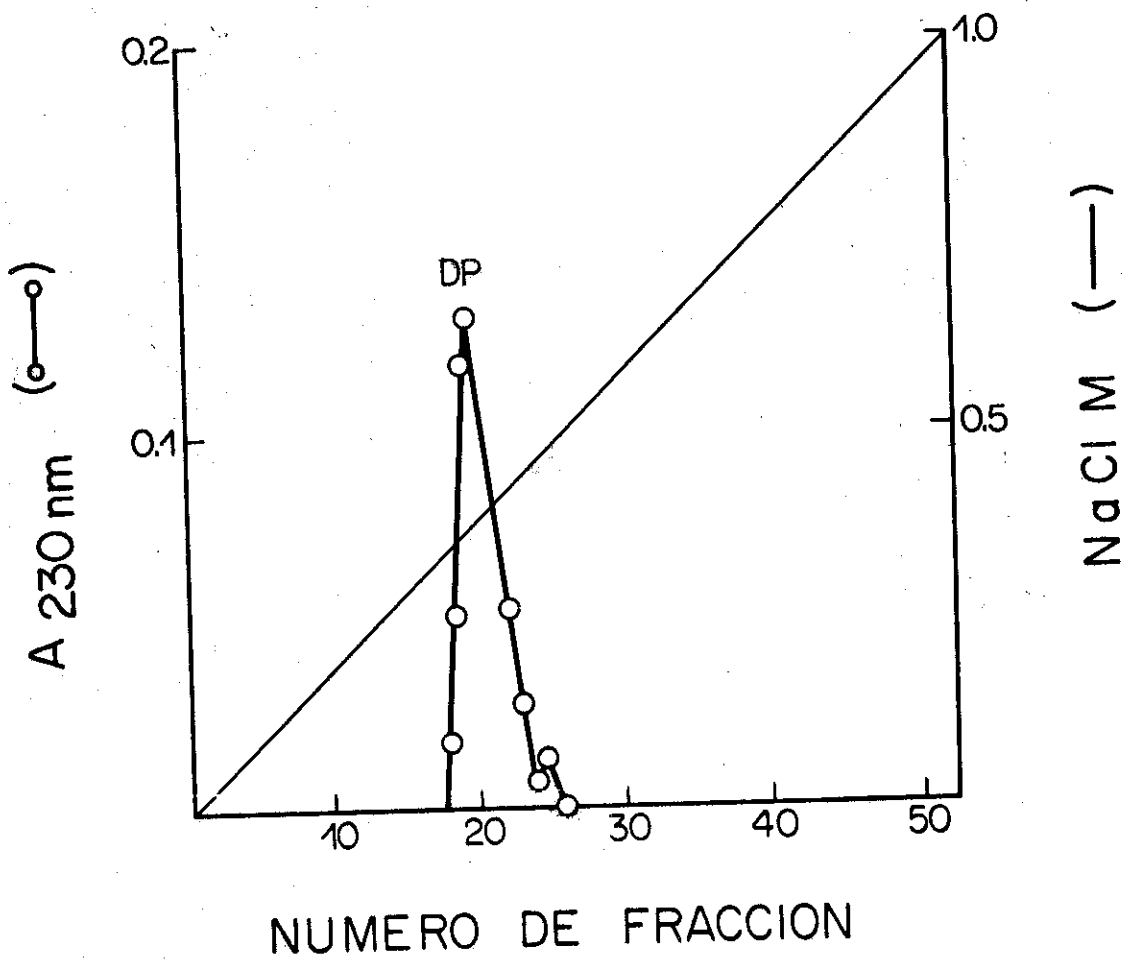


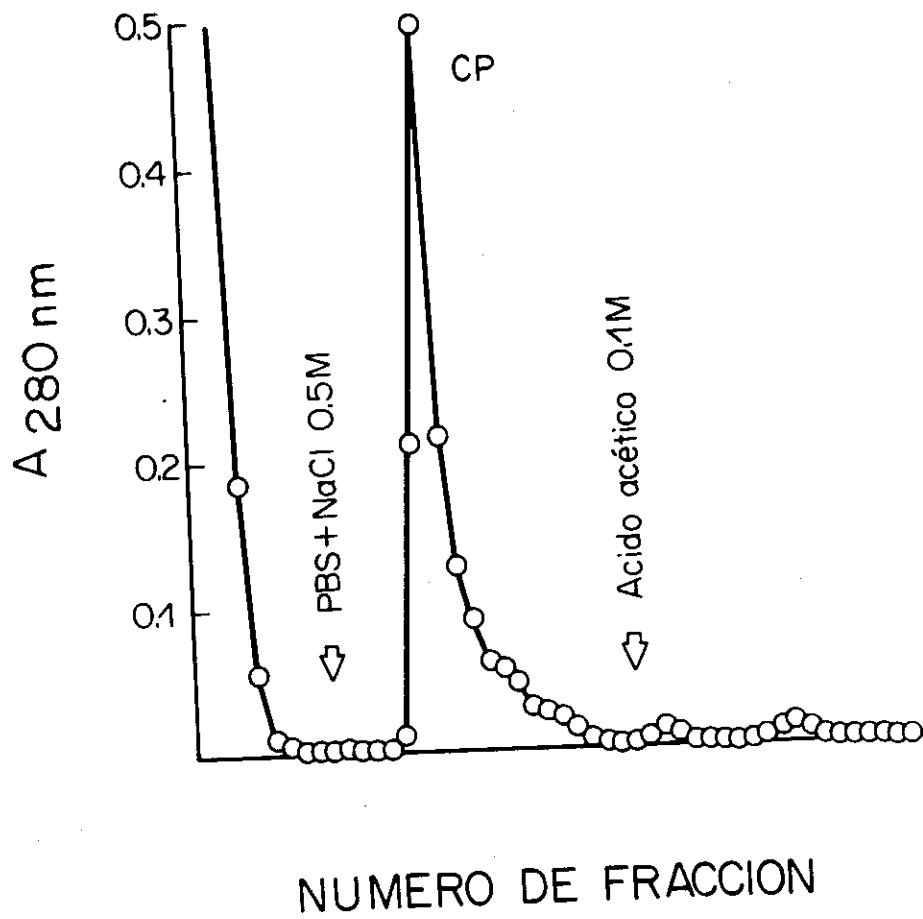
FIG. 13. Perfil de elusión de SP a través de una columna de DEAE-celulosa. La proteína retenida fué eluída con un amortiguador de fosfatos que contenía un gradiente continuo (0-1.0 M) de NaCl.

acoplada. Generalmente, se aplicaban 30 ml de EC con una concentración de proteínas de 3-4 mg/ml. La cromatografía se llevaba a cabo a temperatura ambiente manteniendo una velocidad de flujo de 30 ml/h. El material no unido a la columna era eluido con PBS hasta que la absorbancia a 280 nm de las fracciones colectadas disminuía a un valor cercano a cero ( $<0.005$ ). A su vez, el material unido era eluido de la columna aplicando un pulso de PBS al que se le incrementó la concentración de NaCl hasta 0.65 M. Se colectaban fracciones de 3 ml a las cuales se les determinaba absorbancia a 280 nm. Las fracciones obtenidas en el único pico (Fig. 14), eran mezcladas y dialisadas exhaustivamente contra PBS, y concentradas rápidamente en una cámara de Amicon hasta 1 mg de proteína/ml.

También se realizaron cromatografías de EC utilizando columnas de agarosa-gelatina y de sefarosa 4B-heparina. Todas las condiciones utilizadas en ambos casos fueron idénticas a las descritas anteriormente.

- Purificación de las glicoproteínas: El primer procedimiento para la purificación de glicoproteínas a partir del EC, consistió en una cromatografía de afinidad usando una columna de sefarosa-4B-ConA. El objetivo de esta cromatografía era el de obtener una fracción enriquecida en glicoproteínas. La columna consistía en una jeringa de plástico de 20 ml conteniendo 17.5 ml de sefarosa-4B con 80 mg de ConA acoplada (ver Sección III.2. viii), equilibrada con PBS. Generalmente, se aplicaban 40 ml de EC con una concentración de proteínas de 3-4 mg/ml en PBS.





La cromatografía se llevaba a cabo a temperatura ambiente, manteniendo una velocidad de flujo de 30 ml/h con una bomba peristáltica (1200 Varioperpex, LKB). Al terminar de eluir el material que no se unía a la columna, se pasaban 40-60 ml de PBS. El material unido con alta afinidad, era despegado aplicando 45 ml de NaCl 0.5 M en PBS. Finalmente, el material unido con alta afinidad era eluido pasando 45 ml de amm 0.1 M, o glucosa 0.5 M en PBS. Se colectaban fracciones de 3 ml a las cuales se determinaba absorbancia a 280 nm. Las fracciones incluidas en el único pico obtenido (Fig. 15), eran mezcladas y dialisadas exhaustivamente contra PBS, y concentradas utilizando unidades sumergibles de ultrafiltración, hasta 6-7 mg de proteína/ml. Esta fracción, era designada como Emm.

Al analizar al EC por SDS-PAGE usando la tinción de ácido peryódico de Schiff se encontró que contenía seis glicoproteínas (GP1, PM = 180,000; GP2, PM = 103,000; GP3, PM = 96,000; GP4, PM = 66,000; GP5, PM = 56,000; GP6, PM = 45,000) en mayor cantidad que otras (ver Capítulo V). Se procedió a purificarlas siguiendo un método de electroelución invertida (178). Sin embargo, este método no permitió una separación clara entre GP2 y GP3, por lo que se decidió electroeluir las juntas.

Inicialmente, las glicoproteínas y otras proteínas presentes en la fracción Emm, eran separadas por SDS-PAGE (ver Sección III.2.a.iv) llevada a cabo a nivel preparativo. Se utilizaron geles discontinuos de 3 mm de espesor que contenían 5% de acrilamida en el gel superior y 10% en el gel inferior. Rutinaria-

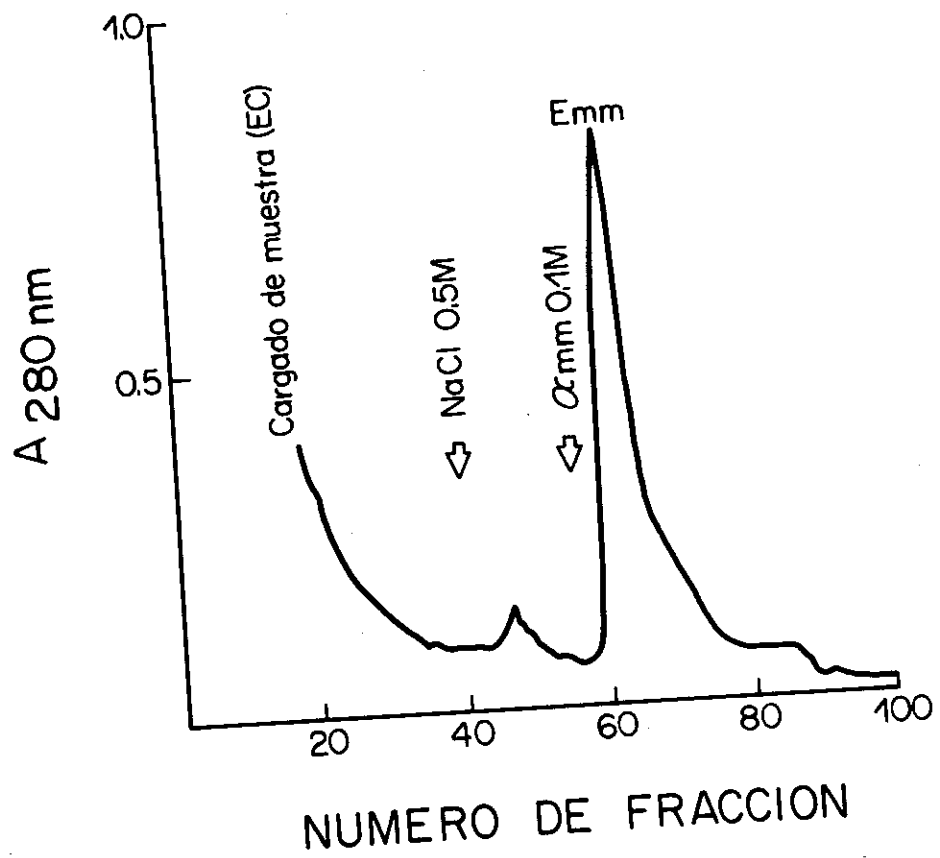


FIG. 15. Perfil de elusión de un extracto crudo de cisticercos a través de una columna de sefarosa 4B-Con-A. El material retenido por la columna fué eluído con PBS que contenía  $\alpha$ -metil-manósido 0.1 M.

mente, se aplicaban 1-2 ml de Emm sobre el gel superior; cantidad equivalente a 10-12 mg de proteína. Al final de la electroforesis, el gel era levemente teñido usando una solución de azul brillante de Coomasie al 1% disuelto en agua bidestilada, hasta que las bandas más prominentes eran observadas con claridad. El colorante para la tinción era disuelto en agua (en lugar de ácido acético al 10%), para evitar la precipitación de las bandas proteicas en el gel.

Las bandas de las glicoproteínas seleccionadas (GP1, GP2-3, GP4, GP5 y GP6), eran recortadas con un bisturí. Posteriormente, las bandas eran montadas por separado en cámaras de electroforesis, a las que previamente se les había formado un gel de 5 cm de altura y de 6% de acrilamida. Después de alinear cuidadosamente la banda recortada sobre la superficie superior del gel preformado, se adicionaba un tercer gel de 3% de acrilamida hasta alcanzar una altura de 3 cm. La electroforesis se llevaba a cabo aplicando una corriente de 20-40 mA, invirtiendo la polaridad del potencial (electrodo positivo en el compartimiento superior y negativo en el inferior), hasta que la banda proteica, que se observaba por birrefringencia, alcanzaba el borde superior del tercer gel. En ese momento, se suspendía la electroforesis y se aplicaba una capa de 1 cm de altura de una solución de glicerol al 30% en Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8. Se restablecía la corriente hasta que la banda birrefringente salía del gel y era atrapada en la solución viscosa de glicerol. La banda proteica así obtenida, era dializada exhaustivamente contra agua bidestilada para

eliminar los demás componentes de la solución (glicerol, SDS, etc.), y liofilizada para ser almacenada en seco a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Cabe hacer notar que la cantidad de cada glicoproteína obtenida por gel era de 1 a 2 mg, aproximadamente.

iii) Yodinación de cisticercos intactos

- Yodinación con el reactivo de Bolton-Hunter (179: El reactivo de Bolton-Hunter (N-Succinimidil 3-(4-hidroxi, 5- $^{125}\text{I}$  yodofenil) propionato), se obtiene comercialmente en viales de 1mCi, (actividad específica  $\sim 2000$  ci/mmol), en una solución de benceno que contiene 0.2% de dimetil-formamida. En consecuencia, es necesario evaporar el solvente orgánico antes de utilizar el reactivo. La evaporación del solvente se llevó a cabo haciendo circular nitrógeno en el mismo vial hasta que el reactivo adherido a las paredes, se secaba por completo. Una vez seco, el reactivo era disuelto en 30 ml de amortiguador de boratos 0.1 M, pH 8.3. Por otro lado, 10 cisticercos que habían sido lavados tres veces en PBS, eran enjuagados en boratos y escurridos en una coladera. Los cisticercos eran incubados durante 10 min a temperatura ambiente en el reactivo de Bolton-Hunter. Al final de la incubación, eran transferidos a una solución de glicina 0.2 M en boratos durante 15 min. Posteriormente, los cisticercos eran lavados tres veces en PBS. Un cisticerco de cada diez, elegido al azar, era fijado en Karnovsky y procesado para autoradiografía en microscopía óptica y electrónica (ver Secciones III.2.c.iii y iv). La autoradiografía tenía por objeto el determinar si la yodinación había ocurrido sola-

mente sobre la superficie externa del parásito. Finalmente, los demás cisticercos eran homogeneizados después de eliminar el fluido vesicular, como se describió antes para la obtención de un extracto crudo.

- Yodinación con Lactoperoxidasa (180): El  $\text{NaI}^{125}$  se obtuvo comercialmente en viales que contenían 5 mCi, en 50  $\mu\text{l}$  de NaOH 0.1 N, pH 7-11. Inicialmente, se transferían 25  $\mu\text{l}$  (2.5 mCi) de esta solución a un frasco pequeño de vidrio y se equilibraban con 25 ml de HCl 0.1 N. Se adicionaban 40  $\mu\text{l}$  de una solución de lactoperoxidasa (2 mg/ml en PBS). Diez cisticercos que habían sido lavados tres veces en PBS, eran escurridos en una coladera y depositados en un frasco. La reacción se iniciaba al adicionar 30  $\mu\text{l}$  de una solución recién preparada  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0.03% en PBS. Después de incubar por 5 min a temperatura ambiente, se adicionaban otros 30  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y se dejaba incubar 5 min más. Durante las incubaciones, el frasco era tapado herméticamente, introducido en una camisa de plomo y agitado manualmente. La reacción se detenía, lavando los cisticercos en una solución de KI 5 mM en PBS. Posteriormente, los cisticercos eran lavados tres veces en PBS. Un cisticerco de cada diez, elegido al azar, era fijado en Karnovsky y procesado para autoradiografía en microscopía óptica y electrónica (ver Secciones III.2.c.iii y iv). La autoradiografía tenía por objeto el determinar si la yodinación había ocurrido solamente sobre la superficie externa del parásito. Los demás cisticercos eran homogeneizados después de eliminar el fluido vesicular, como se describió antes para la obtención de un extracto crudo.

Es importante mencionar, que todos los ensayos de yodinación se realizaron en una campana de extracción, que tenía hacia el frente una barrera de ladrillos de plomo. Asimismo, se utilizaron guantes desechables de cirujano, bata de protección y mandil de plomo. Para el manejo de los desechos radiactivos se siguieron los lineamientos descritos en el manual para el uso de radioisótopos.

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

La composición polipeptídica de las fracciones obtenidas durante la purificación del AgB, fue determinada en geles cilíndricos continuos (70 x 6 mm) de poliacrilamida al 7.5% (p/v), con 1% de SDS, siguiendo el método descrito por Payne (181). Las restantes fracciones fueron analizadas en geles discontinuos de placa cuyo gel inferior contenía 10% de acrilamida (181). Los geles eran teñidos alternativamente con azul brillante de Coomassie que tiñe proteínas, o siguiendo la técnica del ácido peryódico de Schiff (181) para glicoproteínas. Para la determinación de los pesos moleculares se utilizaron proteínas globulares como marcadores. En algunos casos se realizó densitometría de los geles para determinar la cantidad relativa de proteína en bandas de interés.

v) Autoradiografía de los geles

Los geles de SDS-PAGE teñidos con azul brillante de Coomassie, conteniendo proteínas marcadas con  $I^{125}$ , fueron secados y puestos en contacto con una placa de rayos X (Kodak) utilizando un cassette metálico. El cassette era envuelto en papel aluminio y mante-

nido a  $-75^{\circ}\text{C}$  durante 6-24 h. Las placas se revelaron durante 2 min en revelador D-19 (Kodak) diluído 1:1 con agua destilada, y se fijaron durante 10 min en fijador rápido Kodak. Ambos procedimientos se llevaron a cabo en la oscuridad y a temperatura ambiente.

vi) Isoelectroenfoque

El punto isoeléctrico del AgB se determinó siguiendo la técnica del isoelectroenfoque en geles cilíndricos (70 x 6 mm) de poliacrilamida al 5% (p/v), que contenían 2% (p/v) de anfólitos (Bio-Lyte de Bio-Rad) con un rango de pH entre 3 y 10 (182,183). El gradiente de pH establecido al final de la corrida, fue determinado recortando discos de 5 mm a lo largo del gel; cada disco era suspendido en 1 ml de agua bidestilada durante 2 h, y el pH era medido con un microelectrodo. La tinción de los geles se llevó a cabo como se describió anteriormente.

vii) Yodinación de la Concanavalina A (Con-A)

Se yodinaron 300 mg de Con-A usando el reactivo de Bolton-Hunter ( $\text{I}^{125}$ ) (179), siguiendo un método análogo al descrito anteriormente para la yodinación de cisticercos enteros. La separación del yodo no unido a la Con-A, se llevó a cabo filtrando la muestra en una columna de sefadex G-75. Después de lavar la radiactividad libre, la Con-A ( $\text{I}^{125}$ ) unida a la columna, fue eluída aplicando un pulso de  $\text{Ca}^{++}$  0.1 M en PBS, pH 7.2 (174). Se recuperaron de la columna, alrededor de 150  $\mu\text{g}$  de Con-A ( $\text{I}^{125}$ ) con una actividad específica de  $1.35 \times 10^6$  cpm/ $\mu\text{g}$ .



viii) Acoplamiento de la Concanavalina A a la sefarosa 4B

La sefarosa 4B fué activada, suspendiendo 17.5 ml de la resina húmeda en 17.5 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 M y 10.5 ml de agua destilada. La mezcla se enfrió a 5-7°C y se le añadieron 0.7 g de bromuro de cianógeno disuelto en  $\text{NaHCO}_3$  0.1 M, agitando durante 10 min a la misma temperatura. Posteriormente, la sefarosa 4B se lavó con agua destilada y  $\text{NaHCO}_3$  0.1 M (184).

El acoplamiento de la Con-A se llevó a cabo disolviendo 100 mg de la lectina en 50 ml de  $\text{NaHCO}_3$  0.1 M,  $\text{NaCl}$  0.5 M y glucosa 0.1 M. A la solución anterior, se adicionaron los 17.5 ml de la sefarosa 4B previamente activada y se mantuvo la mezcla durante 2 h con agitación suave a temperatura ambiente. Después del acoplamiento, se bloquearon los sitios activos remanentes, adicionando una solución de glicilglicina 0.5 M. Habitualmente, la eficiencia del acoplamiento oscilaba entre el 80 y el 90%. El acoplamiento de la Con-A ( $\text{I}^{125}$ ) a la sefarosa 4B se llevó a cabo similarmente, usando una mezcla de 100 mg de Con-A fría y 40  $\mu\text{g}$  de Con-A ( $\text{I}^{125}$ ).

ix) Acoplamiento de colágena a la sefarosa 4B

150 mg de colágena de piel de cobayo, fueron disueltos en 75 ml de 0.5 M de ácido acético, manteniendo la mezcla a 4°C, durante 24-36 h, con agitación constante. La solución de colágena fue dializada exhaustivamente contra PBS a 4°C, y clarificada por centrifugación a 25,000 g, durante una hora a la misma temperatura. Paralelamente se incubaron 4 g de sefarosa 4B, activada comercialmente, en 300 ml de  $\text{HCl}$  1mM, durante 15 min a temperatura

ambiente. Se filtró la resina para retirar la solución y se lavó con 300 ml de agua destilada. La resina húmeda fué transferida a un recipiente que contenía la solución de colágena y se incubó durante 2 h a la temperatura ambiente, con agitación continua. Los sitios activos remanentes en la resina, fueron bloqueados adicionando una solución de glicilglicina 0.5 M. Posteriormente, la sefarosa 4B-colágena fué equilibrada en PBS pH 7.2. Para definir la cantidad de colágena acoplada a la sefarosa, se realizaron determinaciones de hidroxiprolina en muestras de la resina (185). En estas condiciones, la eficiencia del acoplamiento fué cercana al 65%.

x) Análisis de aminoácidos

La composición de aminoácidos del AgB fué determinada usando una muestra de la fracción DP, obtenida de la cromatografía con DEAE-celulosa (Fig. 10) (Ver Sección III.2.a.ii). La muestra fué hidrolizada en HCl 6 M, a 105°C durante 24 h. Los aminoácidos fueron resueltos en un analizador Beckman Spinco, Modelo 120. No se determinó el contenido de triptofano y de cisteína.

b) Inmunológicos

i) Obtención de sueros hiperinmunes

- Antígeno B: La fracción DP, obtenida de la cromatografía en sefadex G-200 fué sometida a SDS-PAGE (Ver Sección III.2.a. iv) y los geles correspondientes eran congelados. En estas condiciones, las bandas superior (UB) e inferior (LB) del antígeno

B aparecían como discos blanquecinos en el gel. Las dos bandas fueron recortadas cuidadosamente y homogeneizadas por separado, mezclándolas con 1 ml de PBS y 1 ml de adyuvante. Se inmunizaron conejos, variedad Nueva Zelanda, por inyecciones subcutáneas de acuerdo al siguiente protocolo: Una dosis sensibilizante de adyuvante completo de Freund (ACF) fue administrada el día cero; seguida por tres dosis amplificadoras en adyuvante incompleto (AI), los días 15, 30 y 45. Un conejo fue inyectado cada vez con 330 µg de las proteínas presentes en SP, mientras que otros dos conejos recibieron dosis de aproximadamente 120 µg de proteína, de UB o LB. Todos los conejos fueron sangrados a blanco, 7 días después de la última inmunización. Los sueros (anti-SP, anti-UB y anti-LB) fueron preparados por centrifugación de la sangre coagulada y almacenados a -20°C, hasta su uso.

- Glicoproteínas: Cuatro sueros hiperinmunes dirigidos en contra de las glicoproteínas electroeluidas, fueron obtenidos por inmunización subcutánea de conejos Nueva Zelanda, siguiendo un protocolo idéntico al descrito anteriormente. Las proteínas liofilizadas fueron resuspendidas en 1 ml de PBS y homogeneizadas con 1 ml de adyuvante. Una dosis sensibilizante de 500 µg de cada glicoproteína con ACF fue administrada el día cero, seguida de tres dosis amplificadoras de 300 µg de cada glicoproteína con AI los días 15, 30 y 45. Los cuatro conejos fueron sangrados a blanco 7 días después de la última inmunización; los sueros (anti-GP1, anti-GP2-3, anti-GP5 y anti-GP6) fueron separados por centrifugación de la sangre coagulada y almacenados a -20°C hasta su uso.

Cabe hacer notar que no se intentó la producción de suero anti-GP4 debido a que la cantidad de proteína obtenida del proceso de electroelusión no fue suficiente.

ii) Purificación de los anticuerpos a partir de los sueros hiperinmunes

La fracción IgG de cada uno de los sueros hiperinmunes fue obtenida por una triple precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (186), seguida por una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa (187). La pureza de las inmunoglobulinas fue determinada por SDS-PAGE; observándose una banda de 150,000 d en condiciones no-reductoras y dos bandas de 57,000 y 25,000 d en condiciones reductoras. Todos los ensayos inmunológicos fueron realizados utilizando las fracciones de IgG de los sueros hiperinmunes.

iii) Dobleinmunodifusión (DID) e inmunolectroforesis (IEF)

Los ensayos de DID e IEF fueron llevados a cabo en laminillas recubiertas con un gel de agarosa al 1% (p/v) disuelta en una solución de barbital 0.05 N, pH 8.6 de acuerdo al método descrito por Ouchterlony (188). En el caso de la IEF, la electroforesis de los antígenos (EC, AgB, Emm y glicoproteínas) adicionados a los pozos, se corría aplicando 1.2-2 mA por laminilla, durante 90 min. Posteriormente, los anticuerpos fueron adicionados a los canales y se dejaron difundir en una cámara húmeda durante 48 h, a temperatura ambiente. Las laminillas fueron lavadas exhaustivamente con NaCl 0.5 M y secadas con un ventilador. Finalmente, las laminillas de DID e IEF fue-

ron teñidas con negro de amido al 0.1% (p/v) disuelto en ácido acético al 10%, y aclaradas en ácido acético al 10%, hasta que las bandas de precipitación se observan teñidas sobre un fondo transparente.

iv) Inmunolectrotransferencia (IET)

La técnica IET se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Tsang y cols. (189). Inicialmente, se llevaba a cabo una SDS-PAGE (ver Sección III.2.a.iv) de las fracciones por transferir: EC, suero de cerdo, etc. La cantidad de proteína aplicada en cada carril del gel era variable dependiendo de la naturaleza de la fracción: en el caso de fracciones complejas se aplicaban 100 µg de proteína; en el caso de antígenos purificados se aplicaban 10-20 µg. Al finalizar la electroforesis, el gel era puesto en contacto con una hoja de papel de nitrocelulosa (PNC) con diámetro de poro de 0.45 µ (Schleicher and Schuell) y la electrotransferencia se realizaba en una cámara ad hoc (Hoeffer Instruments). Generalmente se aplicaban 250 mA durante 2 h o 1 A durante 1 h a 4°C. Después de la transferencia, la hoja de PNC se retiraba de la cámara. Para corroborar la transferencia de las proteínas al papel, uno de los carriles era recorrido y teñido con solución de negro de amido al 0.1% (p/v) en 45% de metanol, 10% de ácido acético y 45% de agua destilada, durante 5 min. El exceso de colorante era eliminado con 90% de metanol, 2% de ácido acético y 8% de agua destilada, durante 5 min.

Para los ensayos inmunoenzimáticos, el PNC transferido, fue incubado en 3% (p/v) de BSA en PBS (BSA-PBS) durante 2 h, o toda

la noche a 4°C, con el fin de bloquear los sitios libres en el papel. Posteriormente, se lavaba durante 20 min en PBS a temperatura ambiente, con agitación suave y se recortaban los carriles de acuerdo al esquema de ensayos por realizar. Los carriles de PNC eran incubados con el primer anticuerpo (anti-GP1, anti-GP2-3, anti-GP5, anti-GP6, etc.) diluido 1:500-1:1000 en BSA-PBS, durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación suave. Posteriormente, eran lavados dos veces con BSA-PBS adicionado con 0.3% de tween-20 y una vez más con PBS solo. Después del lavado, los carriles de PNC eran incubados con un anticuerpo caprino anti-IgG conejo acoplado a peroxidasa (Zymed Labs.), diluido 1:1000-1:2000 en BSA-PBS, en idénticas condiciones que el primer anticuerpo. Al finalizar la incubación, se repetía el ciclo de lavados descrito anteriormente, antes de revelar los carriles en una solución que contenía 100 mg de 3,3'diaminobencidina o 4-cloro-naftol, 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en 100 ml de PBS, incubando durante 2-10 min a temperatura ambiente y con agitación suave. La reacción de revelado era detenida lavando varias veces los carriles de PNC en agua destilada.

v) Inmunofluorescencia indirecta

Los estudios de localización del AgB en cortes de cisticerco (Ver Sección III.2.c.ii) se llevaron a cabo siguiendo el método de inmunofluorescencia indirecta descrito por Weller y Coons (190), en la versión revisada por Thompson (191). Los cortes se incubaron inicialmente con anticuerpos anti-B (0.1-0.5 mg/ml), durante 60 min a temperatura ambiente en una cámara húmeda y se

lavaron en PBS con agitación continua, durante 1 h haciendo cambios cada 15 min. Posteriormente, los cortes fueron incubados con IgG de cabra anti-IgG de conejo fluoresceinada (Miles Labs.), diluída 1:20 en PBS, en idénticas condiciones que el primer anticuerpo. Después de otro ciclo de lavado idéntico al descrito antes, los cortes se montaron en una mezcla de glicerol: PBS (9:1), y se observaron y fotografiaron en un microscópio de epifluorescencia. Como controles se utilizaron cortes incubados con inmunoglobulinas de conejos no inmunes como primer anticuerpo.

vi) Inmunoperoxidasa indirecta

Los estudios de localización del AgB y de las glicoproteínas purificadas en la superficie externa de la pared vesicular de cisticercos, fueron llevados a cabo siguiendo el método de inmunoperoxidasa indirecta descrito por Nakane y Pierce (192), revisado por Thompson (191). En estos seis años se utilizaron fragmentos de pared vesicular provenientes de cisticercos que habían sido fijados levemente (ver Sección III.1.a). Los fragmentos de pared fueron incubados en tubos de ensayo que contenían 0.5 ml de una solución de anticuerpos (anti-B, anti-GP1, anti-GP2-3, anti-GP5 o anti-GP6) en PBS con una concentración de 0.1-0.5 mg de proteína/ml durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente, los fragmentos eran lavados exhaustivamente (5 veces en PBS) para ser incubados con IgG de cabra anti-IgG de conejo acoplada a peroxidasa (Zymed Labs.), diluída 1:20 en PBS, en idénticas condiciones que el primer anticuerpo. Después de otro ciclo de lavado igual al descrito antes, los fragmentos eran incubados

durante 10-15 min en un solución que contenía 25 mg de 3.3'diaminobencidina y 50  $\mu$ l de  $H_2O_2$  al 3% en 50 ml de PBS. Esta incubación era mantenida en la obscuridad y con agitación suave. Finalmente, los fragmentos de pared vesicular fueron post-fijados y procesados para microscopía electrónica, siguiendo los métodos descritos en la Sección III.2.c.i. Los cortes finos de los fragmentos fueron revisados y fotografiados en un microscopio electrónico Jeol 100-B.

c) Microscópicos

i) Procesamiento del tejido para microscopía electrónica

Los cisticercos que habían sido yodinados fueron fijados utilizando una ligera modificación del método descrito por Karnovsky (193). Los cisticercos eran incubados en 2% (p/v) de paraformaldehído, 2.5% (v/v) de glutaraldehído en amortiguador de cacodilatos 0.1 M, pH 7.3, durante 1 h a 4°C. Después de varios lavados en el amortiguador de cacodilatos, estos cisticercos y los usados en ensayos de inmunoperoxidasa, fueron post-fijados con  $OSO_4$  al 1% en cacodilatos durante 1 h a 4°C. Posteriormente, los cisticercos se cortaron en fragmentos pequeños y se deshidrataron incubándolos en soluciones de etanol al 70, 80 y 90%, durante 10 min seguido por tres cambios de 20 min cada uno en etanol absoluto. El embebimiento de los tejidos se inició con una doble incubación de 30 min en óxido de propileno, para después transferirlos a una mezcla de epon-812:óxido de propileno (1:1) donde se dejaban penetrar durante 12 h. El epon



estaba formado por 70% de la mezcla A, 30% de la mezcla B y 15% de DMP-30. Finalmente, se transfirieron al epon, en donde se mantenían 12 h más; se incluían en moldes planos; y se dejaban polimerizar durante 12 h a 60°C en una atmósfera seca. Cortes finos y semifinos de los cisticercos que habían sido yodinados, fueron procesados para autoradiografía como se describe en las secciones III.2.c.iii y iv, respectivamente. Los cortes de pared vesicular de cisticercos a los que se les había realizado un ensayo de inmunoperoxidasa, fueron recogidos en rejillas de cobre y observados al microscopio electrónico sin una tinción subsiguiente.

ii) Obtención de los cortes para inmunofluorescencia

Fragmentos de cisticercos que habían sido fijados levemente (Ver Sección III.1.a), fueron transferidos a una solución de gelatina al 10% (p/v) en PBS, mantenida a 37°C. Posteriormente, se dejaba gelificar la solución a temperatura ambiente y se recortaban bloques de gelatina con los fragmentos incluidos. Los bloques eran fijados en el portamuestra de un vibratomo (Lancer, vibratome 1000), utilizando un pegamento acrílico (Kola-loka, resistol). Después de confirmar la adecuada fijación del bloque, el recipiente del instrumento se llenaba con PBS a 4°C. De este modo, el bloque de gelatina se mantenía sumergido en la solución durante el proceso de corte. Los cortes de 4-8  $\mu$  de grosor, eran recogidos en laminillas recubiertas con gelatina, marcando su posición con un lápiz de diamante. Finalmente, los grupos aldehído reactivos en el tejido, fueron bloqueados incu-

bando los cortes en una solución de glicina 0.1 M en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.3, durante 1 h a 4°C.

iii) Autoradiografía de cortes finos

Estos ensayos se llevaron a cabo siguiendo la técnica descrita por Caro y Tubergen (194,195). Cortes finos (50-100 nm de grosor) de cisticercos que habían sido yodinados, fueron recogidos sobre rejillas de níquel recubiertas con formvar y carbón; teñidos con acetato de uranilo al 5% (p/v) en agua bidestilada y con citrato de plomo al 0.25% (p/v) en NaOH a 0.1 N (196). Las rejillas eran montadas sobre tapones pequeños de corcho usando una cinta adhesiva por ambas caras. En un cuarto oscuro iluminado por una lámpara con filtro No. 2 (Kodak) la emulsión fotográfica L4 era diluída a partes iguales (p/v) en agua tridestilada mantenida a 45°C, agitando manualmente durante 10 min y enfriada en hielo durante 1.5-3 min. Posteriormente, se introducían aros de platino (2 cm de diámetro) a la emulsión, para formar membranas y se dejaban secar durante 15 min. Las rejillas eran recubiertas con la emulsión, haciendo pasar los corchos a través de la región púrpura de las membranas secas en los aros (197). Los corchos recubiertos se guardaban en cajas, protegiendo las rejillas con tubos de plástico y utilizando sílicagel como desecador. La emulsión se dejaba exponer a 4°C y se revelaba con tiosulfato de sodio al 25% (p/v) en agua tridestilada durante 4 min a 20°C. Después de dos lavados en agua tridestilada la fijación se llevaba a cabo en ácido acético al 3% (v/v), se lavaba nuevamente, y se dejaba secar antes de observar al microscopio electrónico.

iv) Autoradiografía de cortes semifinos (198)

Cortes semifinos de 1  $\mu$  de grosor eran depositados sobre laminillas limpias recubiertas por gelatina, evaporando en una plancha caliente el agua que arrastraban los cortes. En un cuarto oscuro iluminado por una lámpara con un filtro No. 2 (Kodak), la emulsión fotográfica NTB2 era diluída a partes iguales (p/v) en agua tridestilada mantenida a 45°C, agitando manualmente durante 10 min. El recubrimiento de los cortes se llevaba a cabo sumergiendo verticalmente las laminillas en la emulsión fotográfica. Posteriormente, se dejaban secar manteniéndolas en posición vertical durante 30-45 min en la oscuridad. Las laminillas se guardaban en cajas con sílica-gel como desecador y se dejaban exponer a 4°C durante tiempos variables. La emulsión fue revelada con revelador D11 (Kodak) diluído 1:8 (filtrado por millipore), a 20°C durante 4 min. Después de dos lavados en agua tridestilada, se mantenían en fijador rápido (Kodak) durante 4 min; se lavaban nuevamente y se dejaban secar. Los cortes eran teñidos aplicándoles una gota de una solución con azur II al 1% (p/v) y azul de metileno al 1% (p/v), introduciendo las laminillas a la flama durante algunos segundos. Finalmente, se hacía el montaje de los cortes en aceite de cargille y se observaban al microscopio óptico.

v) Tinción negativa

Una gota (50  $\mu$ l) de SP (0.22 mg de proteína/ml) fue depositada sobre una rejilla cubierta con formyar y carbón; seguida por una segunda gota de ATP 60  $\mu$ M en ácido acético 0.25 M (con-

centración final de ATP = 30  $\mu$ M); y se dejaba durante 15-30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la rejilla era lavada exhaustivamente con agua filtrada, para después adicionarle una gota de acetato de uranilo al 1% (p/v) que se dejaba durante 2-3 min. La rejilla era lavada nuevamente con agua destilada, secada, y examinada al microscopio electrónico. Las muestras control eran tratadas similarmente, exceptuando el hecho de que la solución del ácido acético no contenía ATP.

#### IV. RESULTADOS: EL ANTIGENO B

##### 1.- PURIFICACION DE AgB

La Figura 16 ilustra el patrón de bandeo en SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en cada paso del procedimiento de purificación. El material extraído en el primer sobrenadante (S1), obtenido después de la homogeneización de los cisticercos, era muy heterogéneo a juzgar por el número de bandas protéicas encontrado en SDS-PAGE. La diálisis en contra de ácido acético 0.5 M eliminaba varias de las proteínas de mediano peso molecular en la fracción S2. Las proteínas de bajo peso molecular fueron excluidas selectivamente del sobrenadante S4 obtenido por precipitación con sales (salting-out) de S2 y diálisis de P3. Consecuentemente, la fracción S4 mostró un considerable enriquecimiento en dos proteínas de mediano peso molecular. El pico principal que se obtuvo de la cromatografía en sefadex G-200 (SP) y que era eluído en el volumen de exclusión de la columna (Fig. 12), contenía las dos proteínas de alto peso molecular como lo demuestra la SDS-PAGE de esta fracción. Estudios densitométricos de los geles, mostraron que esas dos bandas protéicas incluían el 85% del contenido protéico de SP. La cantidad de proteína recuperada en cada paso del procedimiento de purificación se muestra en la Tabla IV.

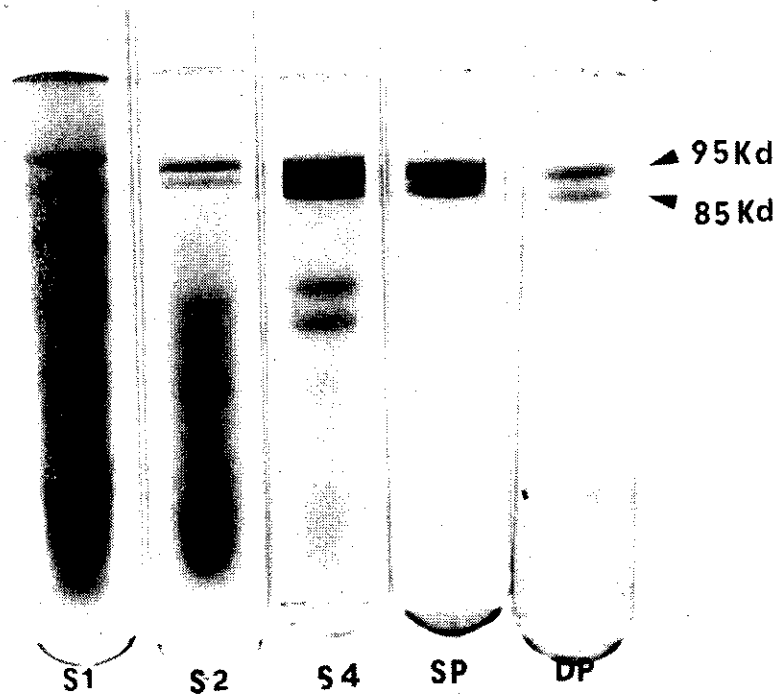


FIG. 16. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas durante la purificación del AgB del cisticerco (ver Fig. 11). Las flechas indican la posición de la banda superior (95 kd) e inferior (85 kd) (UB y LB, respectivamente). Por densitometría de los geles, se determinó que UB + LB constituyen el 85% y el 95% de la proteína total en las fracciones SP y DP, respectivamente. Tomada de la referencia 166.

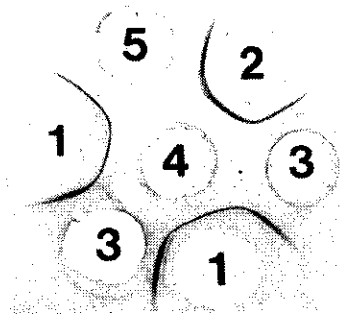


FIG. 17. Patrones de doble inmunodifusión de SP(1) y de EC(2) contra los sueros anti-SP (3), anti-UB (4) y anti-LB (5). El suero anti-SP reconoce una sola proteína en ambas fracciones antigénicas. El arco de precipitación formado entre SP y anti-UB y anti-LB muestra identidad completa. Tomada de la referencia 166.

TABLA IV. Proteína recuperada durante la purificación del antígeno B

| Fracción | mg de proteína/10 g de tejido seco <sup>a</sup> |
|----------|---|
| S1       | 1100  |
| S2       | 630   |
| S4       | 30  |
| SP       | 21  |
| DP       | 7.2   |

a: El peso seco del tejido de los cisticercos fué obtenido por desecamiento de las larvas hasta obtener un peso constante. Diez gramos de tejido seco fueron obtenidos de aproximadamente 37 g de larvas húmedas.

TABLA V. Composición de aminoácidos del antígeno B purificado de cisticercos de la Taenia solium.\*

| Residuo de aminoácido | Fracción de Mole (%) |
|-----------------------|----------------------|
| Alanina               | 11.58                |
| Valina                | 3.50                 |
| Leucina               | 12.74                |
| Isoleucina            | 2.70                 |
| Prolina               | 0.0                  |
| Hidroxiprolina        | 0.0                  |
| Fenilalanina          | 0.75                 |
| Metionina             | 2.25                 |
| Glicina               | 2.69                 |
| Serina                | 5.20                 |
| Treonina              | 5.15                 |
| Tirosina              | 0.65                 |
| Acido aspártico       | 12.58                |
| Acido glutámico       | 22.00                |
| Lisina                | 7.20                 |
| Arginina              | 9.65                 |
| Histidina             | 0.72                 |

\*: No se determinó el contenido de Triptofano y de Cisteína.

## 2.- CARACTERIZACION INMUNOLOGICA Y BIOQUIMICA DEL AgB

Ensayos de DID en los que se enfrentó el suero anti-SP con las fracciones EC y SP, produjeron un solo arco de precipitación (Fig. 17), indicando que no se formaron anticuerpos dirigidos en contra de otros antígenos, cuando el conejo fué inmunizado con la fracción SP. En ensayos de IEF, ambos antígenos (EC y SP) produjeron una banda isoeléctrica al ser enfrentados con sueros anti-SP (Fig. 18a) o anti-EC (Fig. 18b). Este resultado indicó que ninguno de los antígenos reconocidos por el suero anti-EC, exceptuando al AgB, estaba presente en la fracción SP en suficiente cantidad para ser detectado. Por otro lado, el AgB (y otras bandas de precipitación) estaba también presente en S1, S2 y S4, en cambio, no fué detectado en los precipitados obtenidos a partir de S1 y S2 (resultados no mostrados).

Puesto que el patrón isoeléctrico de SP sugería que ésta fracción contenía AgB, se realizaron ensayos de IEF en los que se enfrentaron sueros de siete pacientes neurocisticercosos, en contra de SP. Todos los sueros formaron una banda isoeléctrica como se ejemplifica en la Figura 19.

Esos resultados demostraron que SP contenía al AgB en una forma semipurificada. Sin embargo como se mencionó anteriormente, la fracción SP estaba compuesta principalmente por dos proteínas (85%), designadas como banda superior (UB) y banda inferior (LB) en SDS-PAGE (Fig. 16). Con el objeto de determinar cual de las dos bandas correspondía al AgB, se inmunizaron



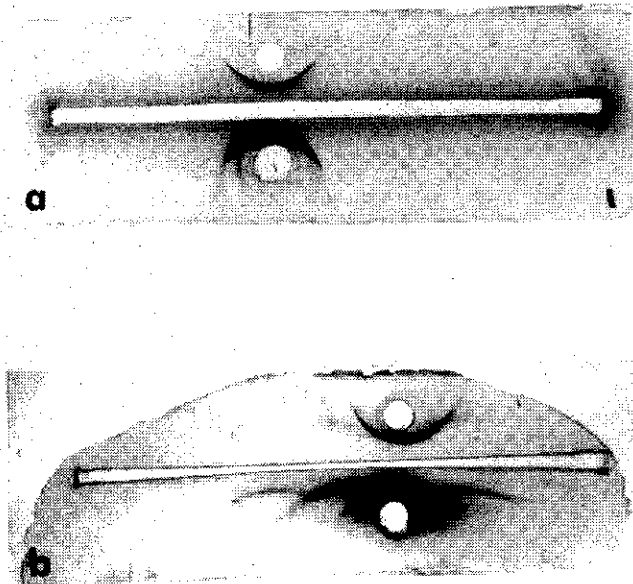


FIG. 18. Patrones inmunolectroforéticos de SP (pozos superiores) y de EC (pozos inferiores) contra sueros anti-SP (a) y anti-EC (b). Tanto el suero anti-SP como el anti-EC reconocen un solo antígeno isoeléctrico en SP. Tomada de la referencia 166.



FIG. 19. Inmunolectroforesis de las fracciones SP (pozo superior) y EC (pozo inferior) contra el suero de un paciente neurocisticercoso. El arco de precipitación característico de AgB puede observarse en ambos sistemas. Tomada de la referencia 166.

conejos con cada una de las bandas. Los sueros hiperinmunes obtenidos, designados como anti-UB y anti-LB, fueron puestos a reaccionar en DID frente a SP. Como se muestra en la Fig. 17, ambos antisueros formaron una banda de precipitación en contra de SP. El hecho de que las bandas formadas por los dos antisueros mostraron identidad total, indicó que ambas proteínas eran antigénicamente idénticas. Experimentos de IET de EC utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos en contra del AgB, permitieron confirmar la identidad antigénica de las dos proteínas (Fig. 20).

Para eliminar otros contaminantes todavía presentes en SP, se realizó una cromatografía de intercambio iónico en la columna de DEAE-celulosa. Como se ilustra en la Fig. 13, se eluyó un solo pico (DP) de esta columna. Análisis de DP en SDS-PAGE (Fig. 16) reveló que esta fracción estaba constituida únicamente por las proteínas UB (PM = 95,000) y LB (PM = 85,000) correspondientes al antígeno B. Adicionalmente, la densitometría de los geles reveló que la sumatoria de ambas bandas (UB + LB) representaba arriba del 95% del contenido protéico de DP. Cuando DP fue puesta a reaccionar en IEF contra anti-SP, anti-UB, o anti LB, se obtuvo el patrón de bandeo isoeléctrico característico del AgB (resultados no mostrados). El análisis de aminoácidos de la fracción DP, mostró un alto contenido de residuos de aminoácidos cargados (Tabla V); aproximadamente, el 31% de los residuos fueron ácidos y el 21 % fueron básicos. Además, se encontraron niveles muy bajos de aminoácidos aromáticos.

Algunas otras características bioquímicas del AgB fueron

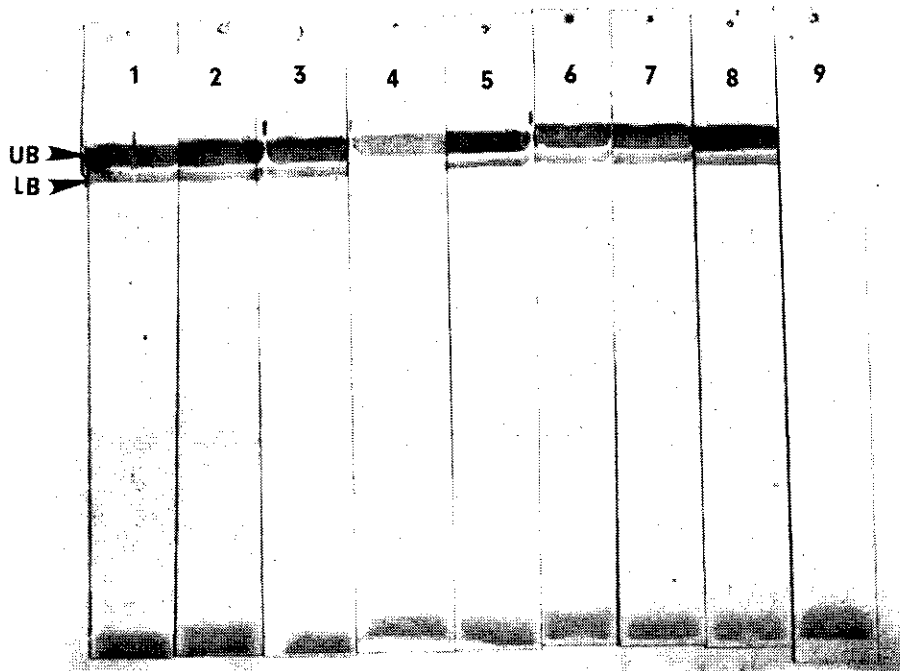


FIG. 20. Inmunoelectrotransferencia de un extracto crudo de cisticercos, enfrentado con varios anticuerpos monoclonales dirigidos en contra del AgB. -- Carriles: 1-8) Fracción de IgG obtenida del líquido de ascitis de ratones -- infectados con varias clonas productoras de anticuerpos y 9) Control: fracción de IgG obtenida del suero de ratones normales. El primer anticuerpo que tenía una concentración de 0.5 mg de proteína/ml fue diluído 2,000 veces. Como segundo anticuerpo se usó IgG (conejo) anti-IgG de ratón acoplada a peroxidasa (Zymed Labs) diluído 3,000 veces. El sustrato usado fue la 3,3'-diaminobenzidina.

determinadas usando la fracción SP (85% pura). El punto isoelectrónico de UB y LB, obtenido por ensayos de isoelectroenfoque en geles con acarreadores anfotéricos, resultó de 5 y 5.3. Asimismo, el contenido de carbohidratos fue de aproximadamente 12%. Como se mencionó en la Sección II.3, una fracción semicruda obtenida de cisticercos tenía la propiedad de precipitar en forma de estructuras fibrosas cuando era incubada en presencia de ATP (199). Con el objeto de determinar si el AgB era el responsable de esta precipitación, la fracción SP fue incubada en presencia del nucleótido. Como se muestra en la Fig. 21, el AgB precipita en forma de fibras cuando se incubaba con ATP a una concentración tan baja como 30  $\mu$ M. Para determinar si la precipitación del AgB era dependiente de hidrólisis del ATP, se realizaron ensayos para detectar liberación de fósforo inducida por SP utilizando el método de Summer (200). Puesto que todos los ensayos resultaron negativos, el proceso de formación de fibras parece no requerir de la hidrólisis del nucleótido.

### 3.- LOCALIZACION DEL AgB EN EL TEJIDO DEL CISTICERCO

La disponibilidad de anticuerpos dirigidos en contra del AgB permitió realizar intentos para localizarlo en el tejido del cisticerco. Para ello se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta de Coons (190). El ensayo consistió en incubar cortes de pared vesicular y de escólex en presencia de la

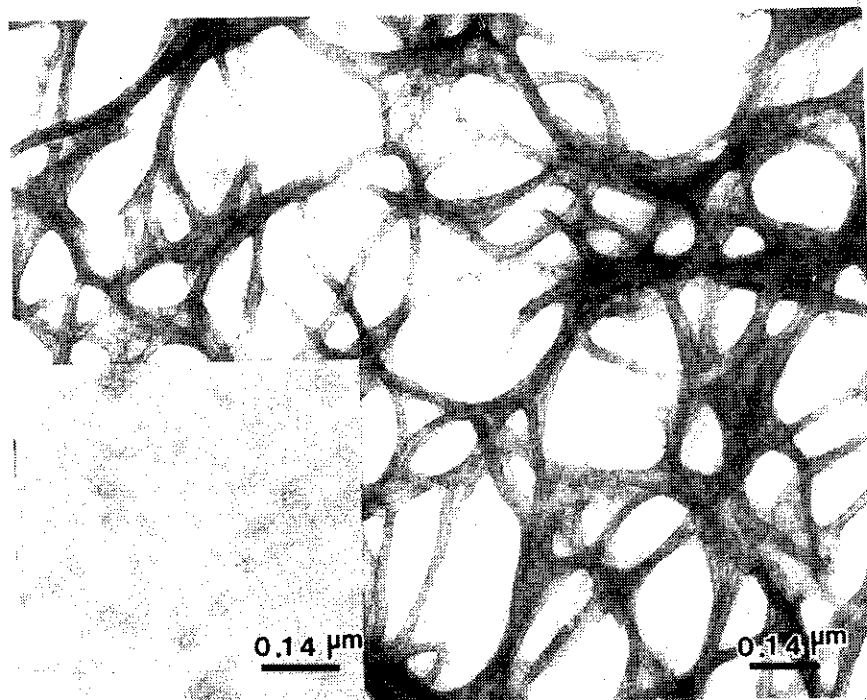


FIG. 21. Micrografía electrónica de una tinción negativa de la fracción SP -- incubada en ausencia (inserto) o presencia de 30  $\mu\text{M}$  de ATP. Esta precipitación en forma de fibras no es dependiente de la hidrólisis del nucleótico.

fracción de IgG de los sueros anti-UB o anti-LB. Para facilitar la presentación, estos anticuerpos serán nombrados en lo sucesivo como anti-B. Como controles, algunos cortes se incubaron en presencia de una concentración equivalente de IgG de conejo normal. Posteriormente, todos los cortes eran incubados con un anticuerpo fluoresceinado dirigido en contra del primero.

Al observar los cortes en el microscopio de epifluorescencia se encontró un patrón difuso en todo el tejido (Fig. 22). Sin embargo, una fluorescencia más intensa estaba asociada con las células subtegumentales de la pared vesicular (Fig. 22 a). Lo anterior sugirió que las células subtegumentales eran las encargadas de sintetizar al AgB. En el caso del escólex, la fluorescencia más intensa se localizaba en la luz del canal espiral, siendo difícil discernir si se encontraba o no asociada a la superficie externa de tegumento. Adicionalmente, la zona correspondiente al tegumento (que en el escólex presenta un grosor varias veces mayor que en la pared vesicular) se observó carente de fluorescencia (Fig. 22 b). Los cortes control de pared vesicular, presentaron una fluorescencia significativamente menor, mientras que los correspondientes de escólex solo mostraron fluorescencia asociada a los corpúsculos calcáreos (Fig. 22 c y d).

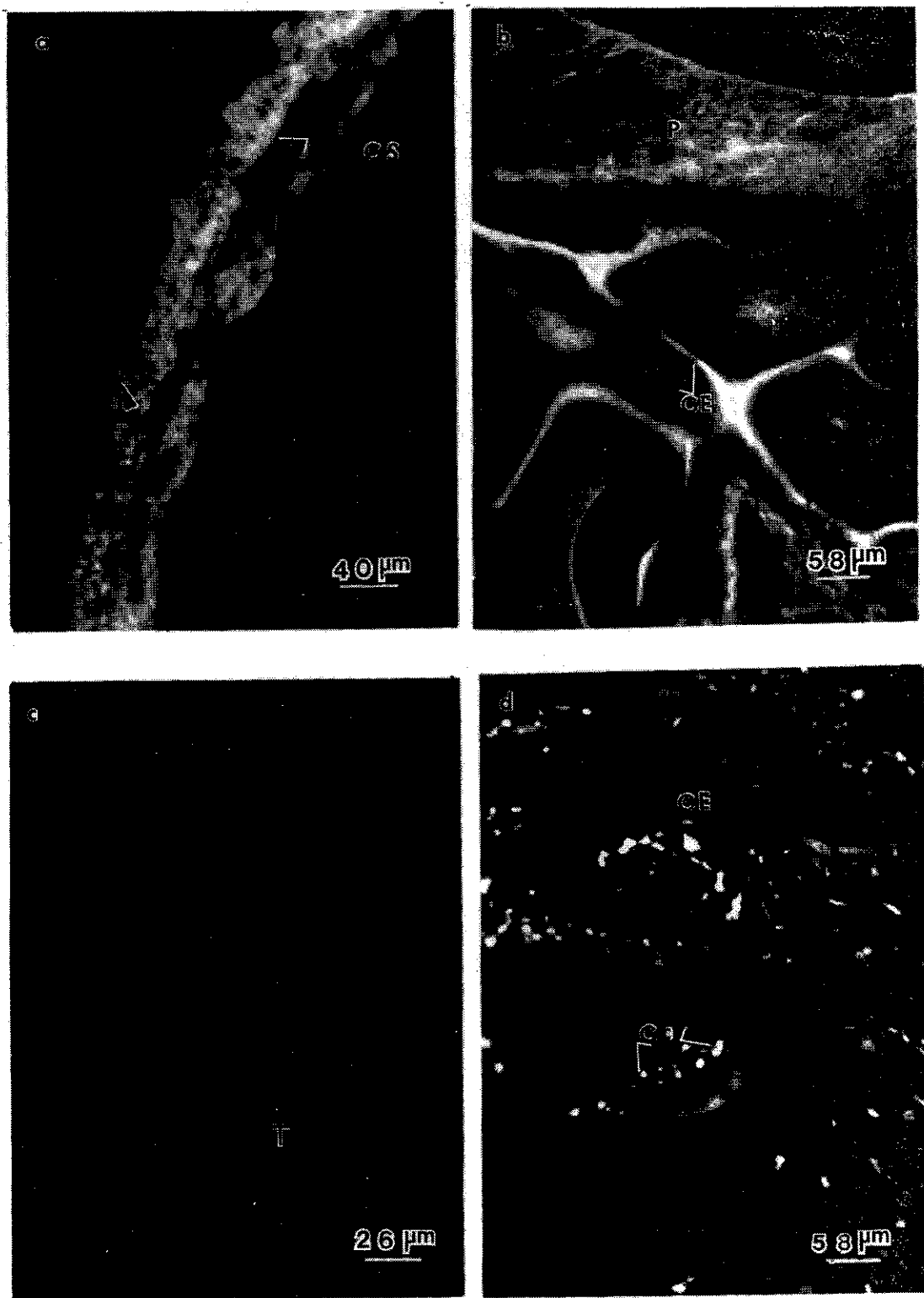


FIG. 22. Inmunofluorescencia indirecta en cortes de pared vesicular (a y c) y de escólex (b y d). Los cortes fueron incubados con la fracción IgG de sueros de conejo anti-B (a y b) o normal (c y d). Cc: corpúsculos calcáreos; CE: canal espiral; CS: células subtegumentales; P: parénquima; T: tegumento.

#### 4.- LOCALIZACION DEL AgB EN LA SUPERFICIE TEGUMENTAL

Los resultados anteriores sugerían que el AgB podría ser sintetizado por las células subtegumentales. Estas células son las encargadas de sintetizar los productos (de superficie y de secreción) que posteriormente son exportados al tegumento (ver Sección II.2.a). El hecho de no haber encontrado al AgB en la superficie de la pared vesicular (que es una superficie expuesta a los lavados), y de encontrarlo aparentemente depositado en la luz del canal espiral (que es una superficie protegida a los lavados), sugirió que se trataba de un producto de secreción cuya interacción con la superficie tegumental era débil. En consecuencia, el estudio de la presencia de AgB en la superficie del cisticerco ameritaba un análisis más detallado. Para ello, se seleccionaron dos estrategias basadas en principios totalmente diferentes. La primera, consistió en realizar yodinationes en la superficie de cisticercos intactos (utilizando  $I^{125}$ ), para posteriormente determinar en extractos crudos si el AgB había sido marcado radioactivamente. Es importante hacer notar que la técnica requiere llevar a cabo numerosos lavados de los parásitos. La segunda estrategia consistió en realizar ensayos inmunoenzimáticos en microscopía electrónica, que estaban específicamente dirigidos a determinar si el AgB podía o no ser demostrado en la superficie tegumental.

A su vez, los experimentos de yodinación se llevaron a cabo usando métodos diferentes: grupos de 10 cisticercos, fueron yo-



dinados usando el reactivo Bolton-Hunter ( $I^{125}$ ) o usando la técnica de lactoperoxidasa y  $NaI^{125}$ . Un punto crítico en estos experimentos, era el determinar si el marcaje había ocurrido exclusivamente sobre la superficie externa del tegumento. Por lo tanto, se realizaron estudios de autoradiografía de cortes de pared vesicular a nivel de microscopía óptica y electrónica. Como se observa en la Fig. 23, la yodinación con el reactivo de Bolton-Hunter no sólo ocurrió sobre la superficie, sino que la radiactividad podía ser localizada en todo el tegumento, e incluso a una distancia considerable por debajo de éste. En cambio, los cisticercos yodinados con lactoperoxidasa presentaron el marcaje radiactivo restringido a la superficie tegumental (Fig. 24). En consecuencia, se decidió sólo utilizar a los cisticercos yodinados enzimáticamente, para el análisis en extractos crudos.

Extractos crudos de cisticercos yodinados con lactoperoxidasa fueron sometidos a SDS-PAGE para posteriormente realizar autoradiografías de los geles secos. Los resultados se muestran en la Fig. 25. Varios componentes parasitarios resultaron prominentemente marcados: una banda amplia que incluye proteínas con pesos moleculares entre 150 y 200,000 así como proteínas de 75,000; 57,000; 45,000 y 20,000 d. Menos prominentemente marcadas resultaron proteínas de 100,000; 65,000 y 35,000 d. La región en el gel, correspondiente al AgB (95,000 y 85,000 d) no apareció importantemente marcada. Sin embargo, dada la cercanía de algunas bandas con alto marcaje, se realizaron IEF del EC

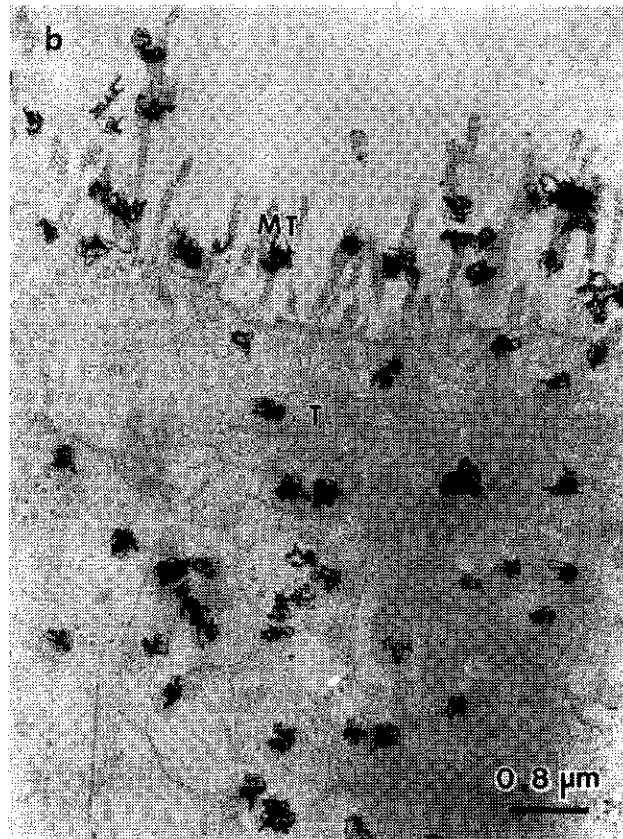
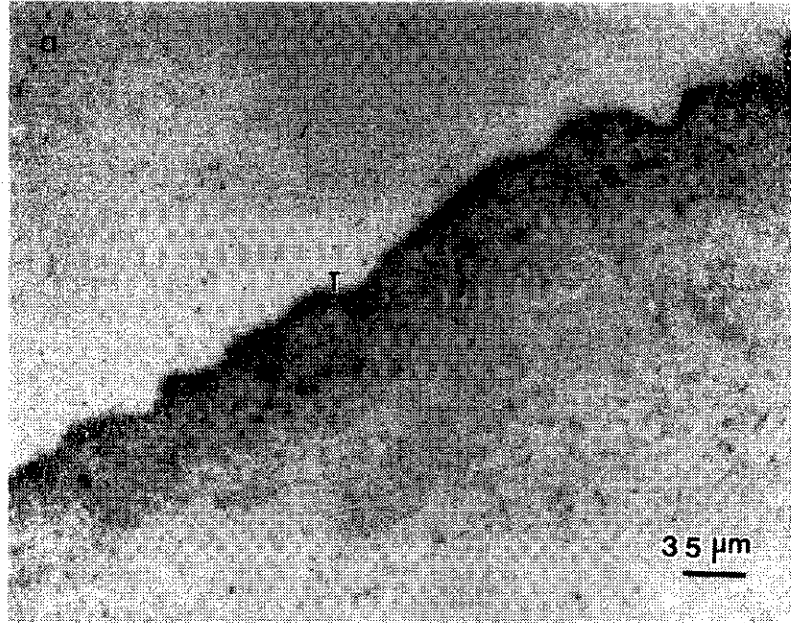


FIG. 23. Autorradiografía en cortes semifinos (a) y finos (b) de pared vesicular obtenida de cisticercos yodizados previamente con el reactivo de Bolton-Hunter ( $I^{125}$ ). MT: microtricas; T: tegumento.

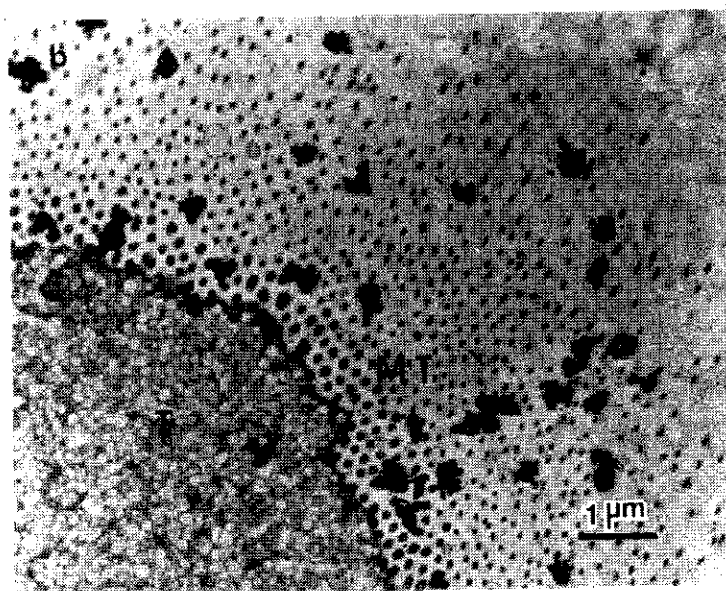
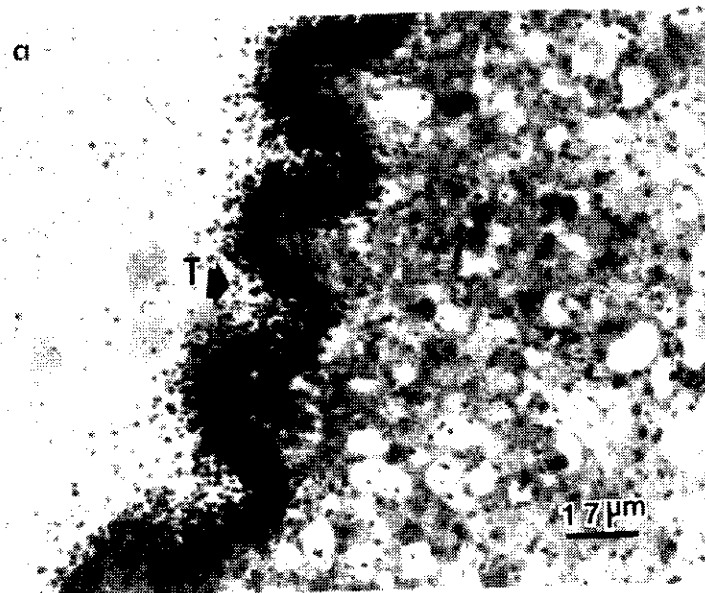


FIG. 24. Autorradiografías en cortes semifinos (a) y finos (b) de pared vesicular, obtenida de cisticercos yodizados previamente con lactoperoxidasa y  $^{125}\text{I}$ -NaI. MT: microtrichias; T: tegumento.

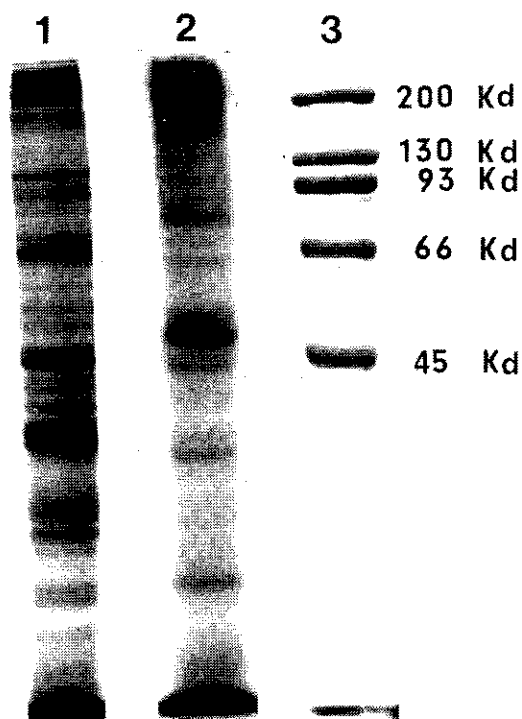


FIG. 25. SDS-PAGE (Carril 1) y autorradiografía (Carril 2) de un extracto crudo obtenido de cisticercos que fueron yodinados radioactivamente. El carril 3 muestra el patrón de bandeo de una mezcla de proteínas marcadoras de alto peso molecular.

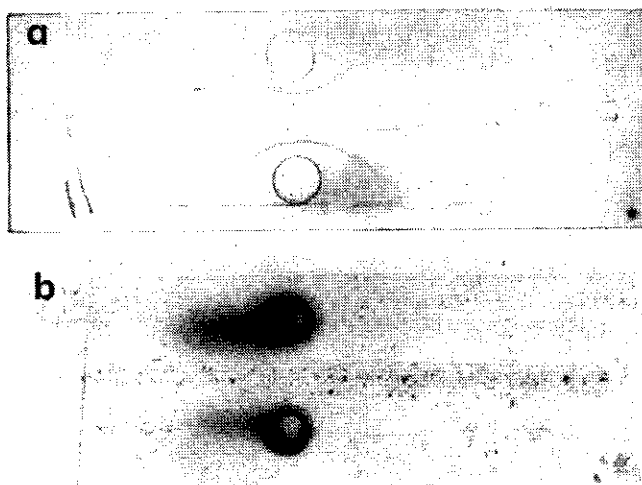


FIG. 26. IEF (a) y autorradiografía (b) de un extracto crudo de cisticercos -- yodinados radioactivamente, enfrentado con anticuerpos anti-B. En el pozo superior se adicionaron 25  $\mu$ l de EC mientras que en el inferior se adicionaron 50  $\mu$ l.

yodinado frente a anticuerpos anti-B. Este ensayo tenía por objeto el concentrar al AgB en una banda de precipitación al mismo tiempo que se eliminaban las demás proteínas yodinadas. Como se muestra en la Fig. 26, aunque la banda de precipitación del AgB apareció claramente definida, la autoradiografía correspondiente no mostró radiactividad asociada al antígeno.

Los resultados anteriores demostraron que el AgB no formaba parte de las proteínas expuestas en la superficie externa del cisticerco. Sin embargo, la posibilidad de que se tratara de un antígeno de secreción que sólo interacciona débilmente con la superficie, no podía ser excluida. Los experimentos subsiguientes de inmunoperoxidasa indirecta en microscopía electrónica fueron diseñados para explorar esta posibilidad.

Por un lado, se utilizaron cisticercos recién extraídos del cerdo a los cuales se sometió a tres lavados con PBS y posteriormente a una fijación leve (en 2% de paraformaldehído y 0.25% de glutaraldehído durante 30 min a 4°C; ver Sección III. 1.a). Por otro lado, se utilizaron cisticercos recién extraídos a los cuales se fijó sin lavado previo. El razonamiento subyacente al experimento, consistía en que si el AgB estaba siendo secretado, la fijación inmediata produciría su atrapamiento en la superficie. Si el razonamiento era correcto, sólo sería posible detectar al AgB en la superficie de los cisticercos fijados sin lavado previo. La Fig. 27 muestra que sólo ocurrió unión de los anticuerpos anti-B en los cisticercos que no fueron lavados antes de la fijación. Los cisticercos lavados e incuba-

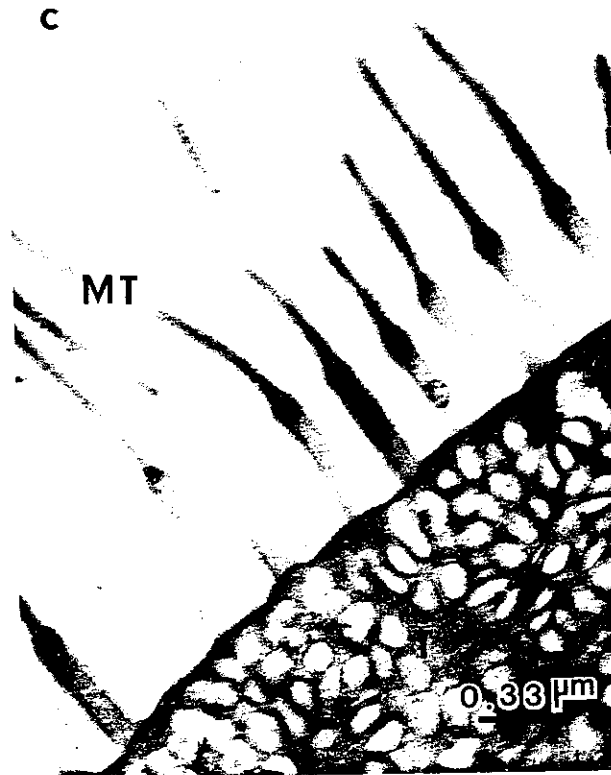
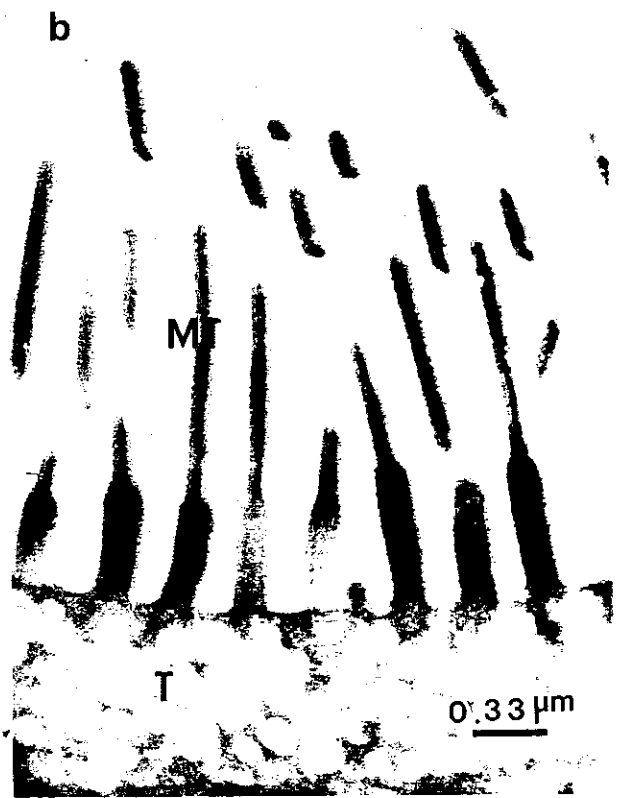


FIG. 27. Micrografías electrónicas de cortes de paredes vesiculares tratadas con la técnica de inmunoperoxidasa indirecta. Los cisticercos fueron lavados (b) o no (a y c) antes de una fijación leve. Fragmentos de pared vesicular fueron incubados con anticuerpos anti-B (a y b), o inmunoglobulinas normales (c). MT: microtrichias; T: tegumento.

dos con anti-B, o los no lavados e incubados con IgG de conejo normal no presentaron ningún producto denso a los electrones en la superficie.

#### 5.- ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE FIBRONECTINA DEL AgB

En forma paralela al desarrollo de este trabajo, Plancarte y cols. (169,170) encontraron que el Agb fluoresceinado posee algunas propiedades semejantes a las descritas para fibronectinas de vertebrados, entre ellas la capacidad de unirse a colágena. En este trabajo se decidió investigar adicionalmente esta propiedad, puesto que un mejor conocimiento de sus propiedades de fibronectina podía redundar en una mejor comprensión de su participación en la interacción huésped-parásito. Además la interacción AgB-colágena tenía una utilidad potencial en el desarrollo de un método rápido para la purificación del antígeno.

La estrategia consistió en realizar cromatografía de EC a través de columnas con resinas que tenían acopladas a colágena, gelatina o heparina como factores de atrapamiento por afinidad. Los tres tipos de columna han sido usados para la purificación de fibronectina plasmática (201,202). En estas cromatografías se utilizó un EC obtenido por homogeneización de los cisticercos en PBS. Después de una ultracentrifugación para eliminar el material insoluble, el EC era aplicado sin mayor procesamiento a las columnas. El material retenido era eluído al aplicar un pulso de PBS al que se le había incrementado la concentración

de NaCl hasta 0.65 M. Como se observa en la Fig. 19, se obtuvo un solo pico (designado como CP) durante la elusión de la columna de colágena-sefarosa 4B. Al analizar por SDS-PAGE la composición de proteínas en la fracción CP, se encontraron dos bandas abundantes con pesos moleculares aparentes de 95,000 y 85,000, además de otras bandas en menores cantidades (Fig. 28). Este patrón electroforético sugirió que se trataba de UB y LB, las cadenas polipeptídicas que forman al AgB. Adicionalmente, ensayos de IEF en los que CP fue enfrentado con anticuerpos anti-B, produjeron la banda isoeléctrica característica del antígeno (Fig. 29). Estudios densitométricos del gel indicaron que UB y LB incluían el 85% del contenido protéico de la fracción. Con respecto a la recuperación cuantitativa de la cromatografía, cabe mencionar que la columna tenía acoplados alrededor de 100 mg de colágena. A partir de una cromatografía en la que se usaron 30 ml de EC, obtenidos al homogeneizar 6 g de cisticercos húmedos, se recuperaron 26 mg de AgB a un 85% de pureza. Los resultados anteriores demostraron que el AgB en el EC interacciona específicamente con colágena, y que esta propiedad permite su rápida y sencilla purificación parcial.

En contraste, en las cromatografías de EC a través de gelatina-agarosa o de heparina-sefarosa 4B, la cantidad de material unido a las columnas fue inapreciable. Para confirmar que el AgB no se unía a la gelatina o a la heparina, se pasó a través de estas columnas la fracción CP obtenida de la cromatografía en colágena-sefarosa 4B y dializada contra PBS para elimi-



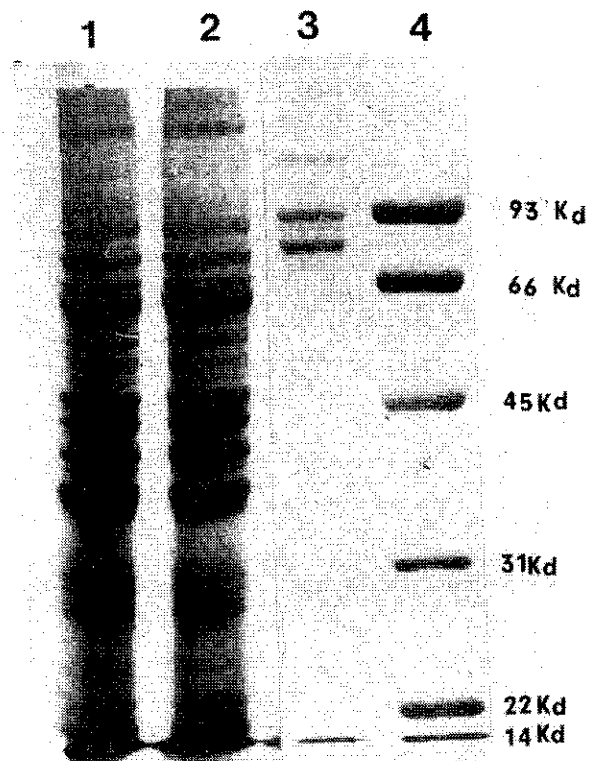


FIG. 28. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en la cromatografía del extracto crudo a través de una columna de Sefarosa 4B-colágena. Carriles: 1) muestra del extracto crudo aplicado a la columna, 2) muestra del material no retenido por la columna, 3) fracción CP (material retenido) y 4) proteínas marcadas de bajo peso molecular.

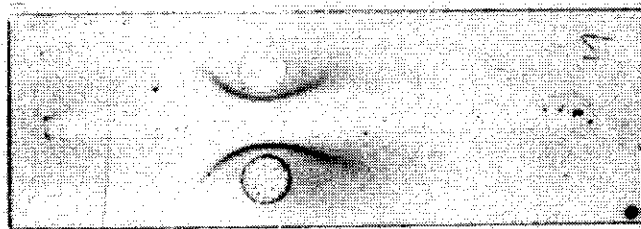


FIG. 29. Inmunoelectroforesis del extracto crudo (pozo superior) y de la fracción DP (pozo inferior) enfrentados con anticuerpos anti-B (canal).

nar el exceso de sal. En ambos casos, la proteína total aplicada (~6 mg) era obtenida en el volumen de filtrado de las columnas, indicando que no había ocurrido retención de las proteínas presentes en CP.



## V. RESULTADOS: GLICOPROTEINAS DEL CISTICERCO

### 1.- OBTENCION DE UNA FRACCION ENRIQUECIDA EN GLICOPROTEINAS DEL CISTICERCO

Para la purificación inicial de glicoproteínas del cisticerco, se seleccionó una preparación comercial de Con-A (ver Sección III.1.b) cuyo patrón de bandeó en SDS-PAGE (Fig. 30) mostró un aceptable grado de pureza. Por ello se decidió utilizarla sin una purificación adicional. El acoplamiento de la Con-A a la sefarosa 4B, se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en la Sección III.2.a.viii. 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.

La Figura 15 muestra el perfil de elución de la fracción EC a través de la columna de Con-A-sefarosa 4B. Al terminar el cargado de la columna, se le hacían pasar 45 ml de PBS al que se le había incrementado la concentración de NaCl hasta 0.65 M, con el objeto de remover de la columna el material unido con baja afinidad. Como se observa en la Figura 15, la cantidad de material unido a la columna con baja afinidad era muy pequeña. Posteriormente, se aplicaban a la columna 45 ml de PBS que contenían amm 0.1 M o glucosa 0.5 M. En ambos casos, se obtuvo de la columna un solo pico asimétrico al que se le denominó como Emm. Los tubos incluidos en el pico eran mezclados y dializados contra PBS para eliminar el exceso de azúcar, y concentrados hasta alcanzar una concentración de proteínas de 6-7 mg/ml. El análisis de Emm en SDS-PAGE tiñiendo los

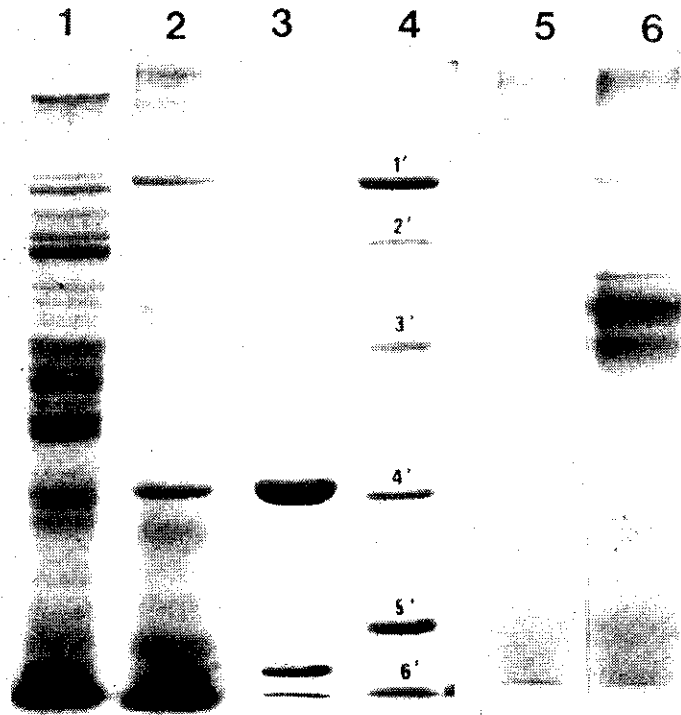


FIG. 30. SDS-PAGE del extracto crudo (carriles 1 y 5) y de la fracción E mm (carriles 2 y 6). En el carril 3 se aplicó una muestra de la Con-A utilizada, mientras que en el carril 4 se aplicó una mezcla de proteínas marcadoras de bajo peso molecular: 1': fosforilasa B (92,500 d); 2': BSA (66,200 d); 3' ovoalbúmina (45,000 d); 4': anhidrasa carbónica (31,000 d); 5': inhibidor de tripsina (21,500 d) y 6': Lisozima (14,400 d). Los carriles 1-4 fueron teñidos con azul brillante de Coomassie. Los carriles 5 y 6 fueron teñidos con ácido peryódico de Schiff.

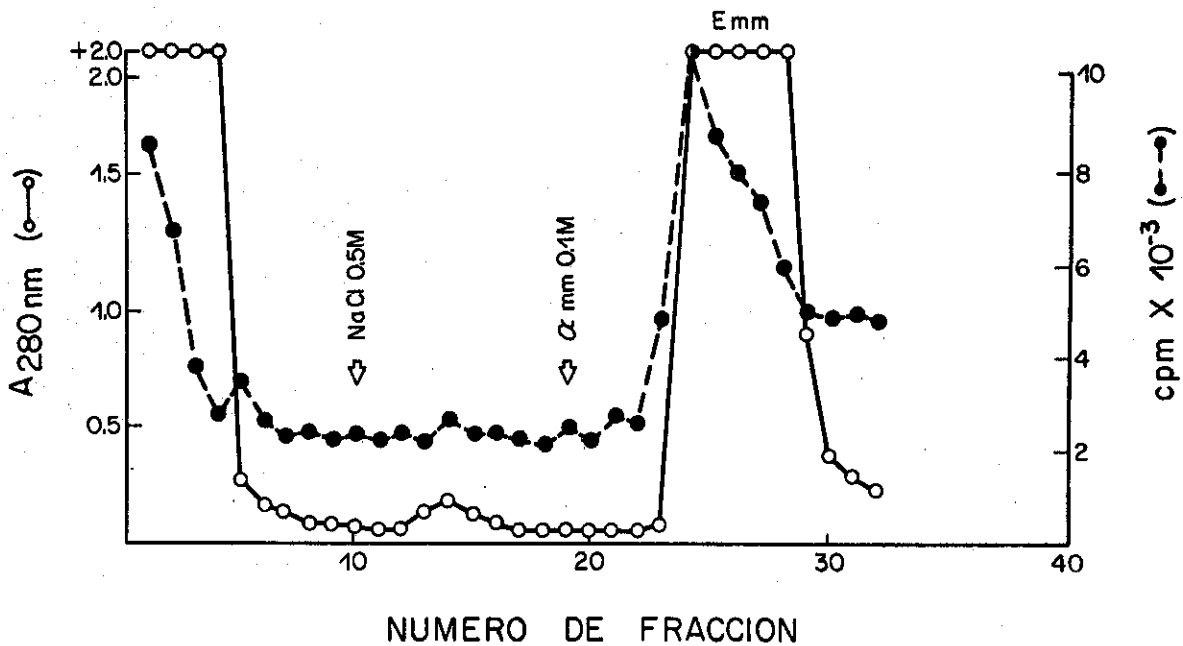


FIG. 31. Perfil de elución del extracto crudo a través de una columna de Sefarosa 4B-Con-A ( $I^{125}$ ).

geles con azul brillante de Coomasie mostró 22 bandas deferentes (Fig. 30), una de las cuales era el frente de la corrida. A su vez, la tinción de los geles con ácido periódico de Schiff (PAS) mostró nueve bandas con pesos moleculares entre 7,200 y 200,000, una de las cuales era el frente del gel (Fig. 30).

En la Figura 30 también se observa que una de las bandas más prominentes en cuanto a su tinción con azul brillante de Coomasie coincide en su movilidad relativa con el monómero de la la Con-A. Asimismo, esta banda no resultó teñida con PAS. Lo anterior hizo surgir la pregunta de si parte de la Con-A acoplada a la sefarosa 4B era desprendida de la columna durante la cromatografía, produciendo la contaminación de Emm. Para responder esta pregunta se preparó otra columna de sefarosa 4B-Con-A en la cual una pequeña cantidad de la Con-A acoplada había sido previamente marcada con  $I^{125}$ . Posteriormente, una muestra de EC se sometió a cromatografía a través de la columna de sefarosa 4B-Con-A ( $I^{125}$ ). A las fracciones colectadas se les determinó absorbancia a 280 nm y radiactividad en un contador de radiaciones gamma. La Figura 31 muestra que la columna desprendió radiactividad desde la etapa de cargado. El pico mayor de liberación de marca resultó superpuesto con el pico Emm. Adicionalmente, la fracción Emm obtenida de la columna radiactiva se sometió a SDS-PAGE, para después de secar el gel y preparar una autoradiografía del mismo. Como se muestra en la Figura 32, la radiactividad se encontró claramente asociada con las bandas correspondientes a la Con-A, demostrando que las bandas de

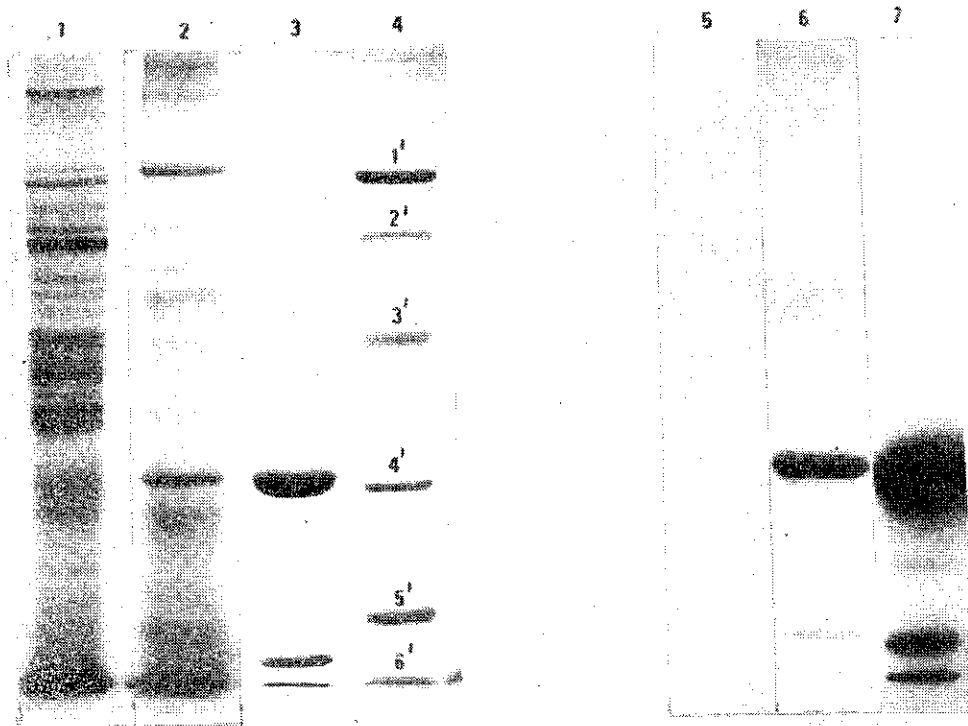


FIG. 32. SDS-PAGE (izquierda) y autoradiografía (derecha) de las fracciones obtenidas en la cromatografía del extracto crudo a través de una columna de sefarosa 4B-Con-A ( $I^{125}$ ). Carriles: 1 y 5) muestra del extracto crudo aplicado a la columna, 2 y 6) fracción Emm, 3 y 7) Con-A ( $I^{125}$ ) y 4) mezcla de proteínas-marcadoras de bajo peso molecular (ver leyenda de la Fig. 30).

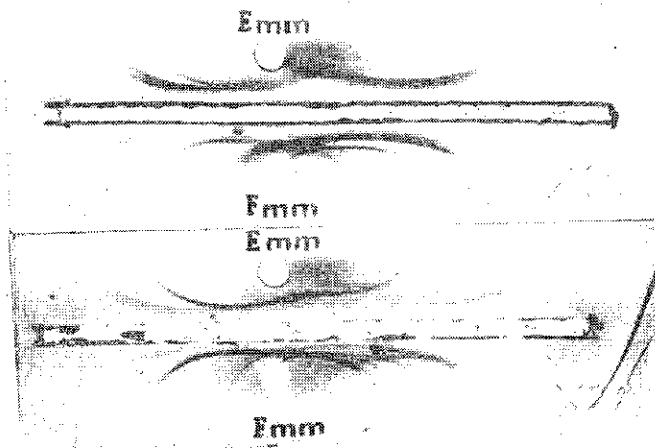


FIG. 33. Inmunoelectroforesis de la fracción Emm enfrentada con sueros de pacientes neurocisticercosos. En los pozos inferiores se aplicó una muestra del-fluido vesicular cromatografiado en la columna de sefarosa 4B-Con-A (Emm).

27,000 y 18,000 d en la fracción Emm, se debían a una contaminación por la lectina desprendida de la columna.

La Tabla VI formada a partir de la SDS-PAGE de Emm, presentada en la Figura 30, resume su composición de bandas proteicas y glicoproteicas. Eliminando las bandas correspondientes a la Con-A (27 y 21,000 d), así como al frente de la corrida, la fracción Emm contenía 19 cadenas polipeptídicas diferenciables por su movilidad cuando el gel era teñido con azul brillante de Coomasie. A su vez, la tinción con PAS mostró la presencia de nueve bandas prominentes una de las cuales correspondía al frente del gel. La de mayor peso molecular, más que una banda era una región del gel que incluía pesos moleculares entre 150 y 200,000 d. Bandas mejor definidas fueron observadas en migraciones relativas correspondientes a 103,000, 96,000, 68,000, 60,000, 55,000, 45,000 y 21,000 d. Nótese que en esta clasificación también se excluye la banda correspondiente al frente del gel. Cabe hacer notar el considerable enriquecimiento de glicoproteínas ocurrido durante la cromatografía a través de la columna de sefarosa 4B-Con-A: La fracción EC sólo mostró dos regiones de tinción moderada con PAS, en la parte superior e inferior del gel (Fig. 30). En contraste, la fracción Emm poseía cantidades importantes de las glicoproteínas descritas anteriormente.

Para determinar si el enriquecimiento en glicoproteínas en la fracción Emm conllevaba un enriquecimiento paralelo en antígenos inmunodominantes en la cisticercosis humana, se realiza-

TABLA VI. Bandas teñidas con azul brillante de Coomasie y con ácido peryódico de Schiff, en la fracción Emm sometida a SDS-PAGE.

| Banda | Tinción de Coomasie | Tinción de Schiff | Peso Molecular |
|-------|---------------------|-------------------|----------------|
| 1     | +                   |                   | 195,000        |
| 2     | +                   | +                 | 182,000        |
| 3     | +                   |                   | 170,000        |
| 4     | +                   |                   | 154,000        |
| 5     | +                   |                   | 125,000        |
| 6     | +                   |                   | 110,000        |
| 7     | +                   | +                 | 103,000        |
| 8     | +                   | +                 | 96,000         |
| 9     | +                   |                   | 81,000         |
| 10    | +                   |                   | 75,000         |
| 11    | +                   | +                 | 68,000         |
| 12    | +                   | +                 | 60,000         |
| 13    | +                   | +                 | 55,000         |
| 14    | +                   |                   | 50,000         |
| 15    | +                   | +                 | 45,000         |
| 16    | +                   |                   | 35,000         |
| 17    | +                   |                   | 27,000*        |
| 18    | +                   |                   | 25,000         |
| 19    | +                   | +                 | 21,000         |
| 20    | +                   |                   | 18,000         |
| 21    | +                   |                   | 14,000         |
| 22    | +                   | +                 | < 7,200'       |

\*: Bandas correspondientes a la Con A.

': Banda correspondiente al frente del gel



ron ensayos de IEF en los que esta fracción fue enfrentada con siete sueros de pacientes cisticercosos. El número y tipo de antígenos reconocidos por cada suero fue variable (Fig. 33), lo cual coincide con los hallazgos reportados por Flisser y cols. (34-36,67-69). En total, los siete sueros reconocieron al menos ocho antígenos, diferenciables por su patrón de bandeo en la IEF. Aunque no fue posible clasificar a los antígenos de acuerdo al esquema propuesto por Flisser (35), se realizó una comparación entre el número de antígenos reconocidos por cada suero en Emm y en E+P (E+P equivale gruesamente a los EC descritos en esta tesis). Como se observa en la Tabla VII, el número de antígenos reconocidos por los sueros en Emm fue casi del doble del obtenido para E+P, a pesar de que la concentración de proteínas en la primera fracción era menor al 50% de la utilizada con la segunda. Lo anterior indicó que había una correlación entre el contenido de glicoproteínas y de antígenos del cisticerco en la fracción Emm. Por lo tanto esta fracción parecía adecuada para iniciar esfuerzos de purificación de glicoproteínas inmunodominantes, relevantes en la interacción huésped-cisticerco.

## 2.- PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE GLICOPROTEINAS DEL CISTICERCO

Para purificar glicoproteínas parasitarias a partir de la fracción Emm, inicialmente se llevaron a cabo varios intentos cromatográficos que desafortunadamente resultaron infructuosos.

TABLA VII. Número de antígenos reconocidos por sueros de pacientes neurocisticercosos cuando se enfrentan en IEF con las fracciones Emm y E+P.\*

| Clave del suero | 1771                         | 1158 | 1411 | 2221 | 2066 | 2955 | 2947 |          |
|-----------------|------------------------------|------|------|------|------|------|------|----------|
|                 | Número de bandas reconocidas |      |      |      |      |      |      | Promedio |
| Muestra         |                              |      |      |      |      |      |      |          |
| Emm             | 4                            | 9    | 8    | 2    | 3    | 7    | 5    | 5.5      |
| E+P**           | 7                            | 4    | 3    | 4    | 2    | 1    | 1    | 3.1      |

\*: El E+P fué utilizado a una concentración de proteínas de 15 mg/ml mientras que la concentración de Emm usada fué de 6-7 mg/ml. E+P corresponde de gruesamente al EC descrito en esta tesis.

\*\* : Los datos que aparecen en el renglón fueron amablemente aportados por el M en C A. Plancarte.

Por ejemplo, al someter a la fracción Emm a una cromatografía de intercambio iónico (usando DE-52), se obtuvieron 4 picos que al ser analizados por SDS-PAGE mostraron patrones de bandeo similares a la fracción inicial (resultados no mostrados). Asimismo, al cromatografiar a Emm a través de sefacryl-S200 se logró purificar a las glicoproteínas de 96 y 103,000 d (resultados no mostrados). Sin embargo, el rendimiento del método era tan bajo que resultó impráctico. Una posible razón parecía ser la presencia de agregados proteícos en la fracción Emm. En consecuencia, se decidió utilizar un método que por sus características rompiera las interacciones que mantenían a los agregados. El método seleccionado resultó la electroelusión de las bandas glicoproteicas de los geles (178) que al ser llevado a cabo en condiciones preparativas, permite la purificación de cantidades de proteínas en el orden de los miligramos.

Puesto que el método de electroelusión es laborioso y prolongado, se decidió purificar sólo a seis de las ocho glicoproteínas descritas anteriormente. Las glicoproteínas seleccionadas fueron aquellas que presentaron mejores propiedades tintoriales, lo cual está en función de su abundancia relativa en la fracción Emm. Además, las glicoproteínas de 96 y 103,000 d fueron eluidas conjuntamente puesto que no fue posible recortar del gel las dos bandas por separado (ver Sección III.2.a.ii). La designación de las glicoproteínas que se electroeluyeron fue como sigue: GP1, PM = 180,000; GP2-3, PM = 103 y 96,000; GP4, PM = 68,000; GP5, PM = 55,000 y GP6, PM = 45,000. Después de la electroelusión, las

glicoproteínas fueron dializadas exhaustivamente para reducir al mínimo la cantidad de SDS asociado y liofilizadas para ser almacenadas a  $-75^{\circ}\text{C}$ . Muestras de las glicoproteínas liofilizadas fueron resuspendidas en PBS y sometidas a SDS-PAGE. Los resultados se presentan en las Figuras 34 y 35, en las que se observa que el patrón de bandeo de cada glicoproteína corresponde precisamente con los patrones correspondientes en la fracción Emm (Fig. 30). En ningún caso, las proteínas electroeluidas a partir de recortes de gel que correspondían a un peso molecular, dieron origen a bandas de un peso molecular distinto. Lo anterior indicó que el procedimiento no produjo modificación o ruptura de las cadenas polipeptídicas.

### 3.- LOCALIZACION DE LAS GLICOPROTEINAS EN LA SUPERFICIE TEGUMENTAL

Una vez purificadas las glicoproteínas, se procedió a obtener anticuerpos que permitieran determinar cuál o cuáles de ellas se encontraban presentes en la superficie parasitaria. Los sueros hiperinmunes fueron obtenidos de conejos siguiendo protocolos convencionales de inmunización (ver Sección III.2.b. i) y designados como anti-GP1, anti-GP2-3, anti-GP5 y anti-GP6. No se inmunizaron conejos con la GP4, puesto que la cantidad de proteína obtenida a través del método de electroelusión resultó insuficiente. Ensayos de IEF en donde los antisueros fueron enfrentados con un extracto crudo parasitario mostraron diversas bandas de precipitación (Fig. 36). Los sueros anti-GP1, anti-

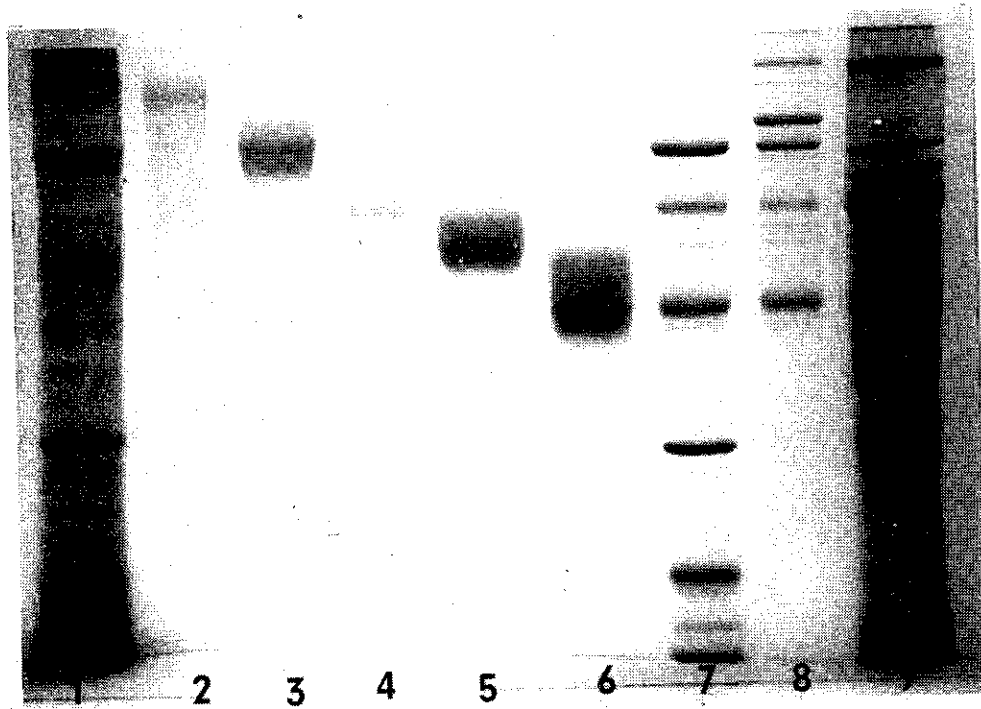


FIG. 34. SDS-PAGE de las glicoproteínas purificadas por electroelusión a partir de la fracción Emm (tinción con azul brillante de coomassie). Carriles: 1) Emm, 2) GP1, 3) GP2-3, 4) GP4, 5) GP5, 6) GP6, 7 y 8) mezclas de proteínas marcadoras de bajo y de alto peso molecular, respectivamente (ver leyendas de las figuras 25 y 30), y 9) EC.

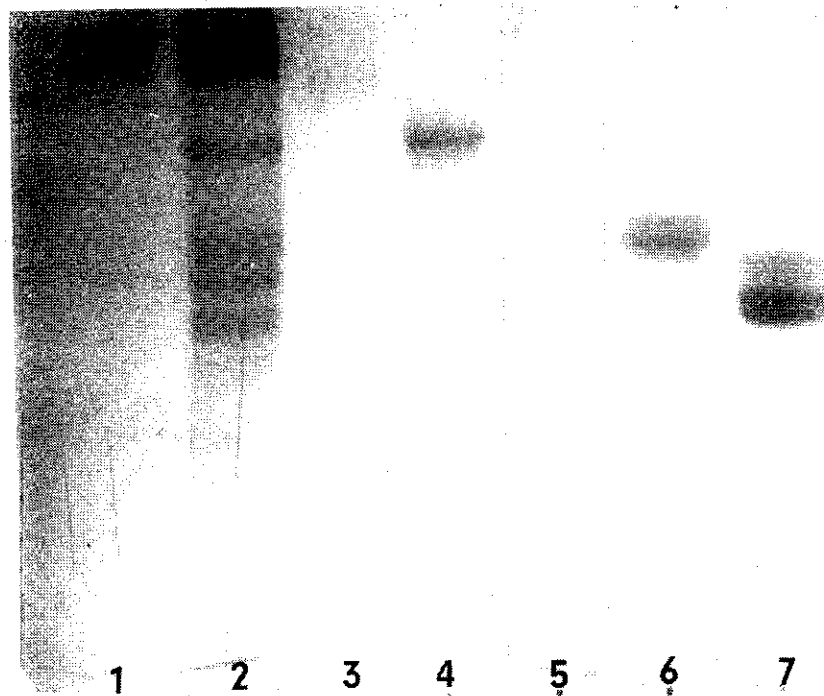


FIG. 35. SDS-PAGE de las glicoproteínas purificadas por electroelusión a partir de la fracción Emm (tinción con ácido peryódico de Schiff). Carriles: 1) - EC, 2) Emm, 3) GP1, 4) GP2-3, 5) GP4, 6) GP5 y 7) GP6.

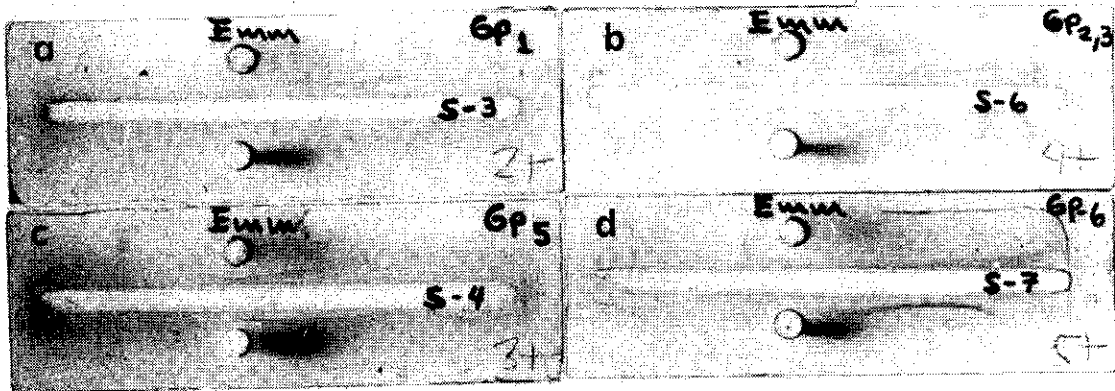


FIG. 36. Inmunoelectroforesis de la fracción Emm enfrentada con los anticuerpos antiglicoproteínas. Canales: a) anti-GP1, b) anti-GP2-3, c) anti-GP5 y d) anti-GP6.

GP2-3 y anti-GP6 formaron bandas catiónicas de precipitación, diferenciables entre sí, por su forma, longitud y migración relativa. En cambio, el suero anti-GP5 formó una banda isoeléctrica de precipitación semejante a la banda del AgB. Sin embargo, diversos ensayos de IEF y DID en los que se utilizó AgB puro así como anticuerpos anti-B y anti-GP5, demostraron que no existía identidad inmunológica entre GP5 y el AgB. Ensayos similares se llevaron a cabo para los restantes antisueros obteniéndose resultados idénticos. Por lo tanto, parecía disponerse de cuatro antisueros dirigidos en contra de un número igual de componentes parasitarios distintos del AgB.

La fracción de IgG de los cuatro antisueros fue obtenida por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y cromatografía de intercambio iónico. La pureza de las inmunoglobulinas fue determinada por SDS-PAGE. En todos los ensayos que se describen a continuación, se utilizó la fracción de IgG de cada uno de los antisueros. Para los experimentos de localización de las glicoproteínas en la superficie tegumental del cisticerco, se utilizó la técnica de inmunoperoxidasa indirecta en fragmentos de pared vesicular. Los fragmentos fueron incubados inicialmente en presencia de alguno de los anticuerpos (anti-GP1, anti-GP2-3, anti-GP5 o anti-GP6) o de una concentración igual de IgG de conejo normal (como control). Posteriormente, los fragmentos se incubaron en presencia de un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa. La Figura 37 muestra imágenes representativas de los resultados obtenidos. Como se puede observar, los anticuerpos evidenciaron la presencia

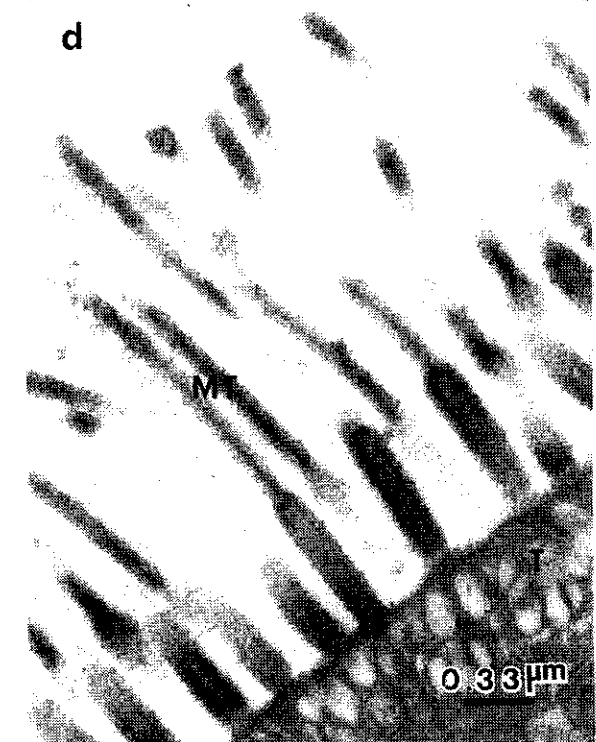
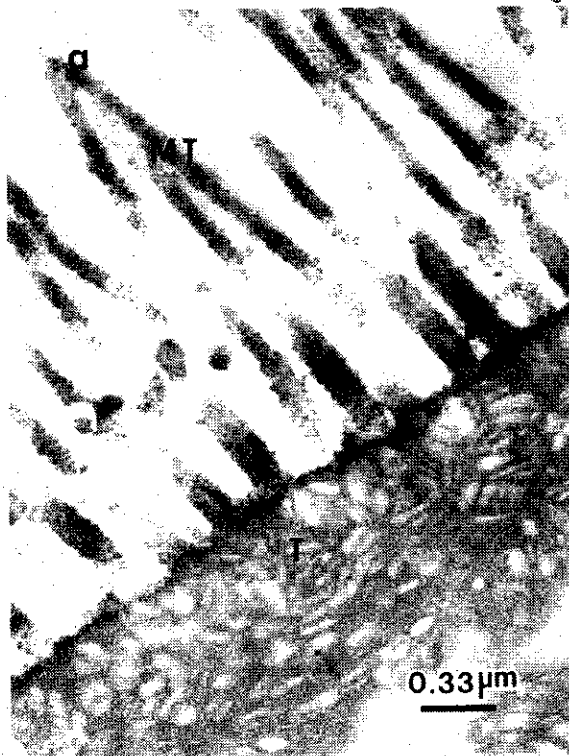


FIG. 37. Micrografías electrónicas de cortes de paredes vesiculares tratadas con la técnica de inmunoperoxidasa indirecta. Los fragmentos de pared vesicular fueron incubados con anticuerpos anti-GPI (a), anti-GP2-3 (b), anti-GP5 (c) y anti-GP6 (d). Los fragmentos incubados con inmunoglobulinas normales mostraron resultados análogos a los presentados en la Fig. 27c. MT: microtriacas; T: tegumento.



de todas las glicoproteínas en la superficie tegumental. Los fragmentos controles incubados con IgG de conejo normal produjeron resultados iguales a los mostrados en la Figura 27c. Es posible que las diferencias en la intensidad de la reacción de la peroxidasa, observables en las micrografías de pared vesicular (fig. 37), estén relacionadas con la abundancia de cada glicoproteína en la superficie.

Cabe hacer notar que con base en la experiencia tenida en los ensayos equivalentes con el antígeno B, en este caso se utilizaron también fragmentos de pared vesicular proveniente de cisticercos lavados o no, antes de efectuar una fijación leve del tejido (ver Sección IV.4). Sin embargo, a diferencia del AgB los resultados de inmunoperoxidasa fueron iguales en ambos casos, indicando que la interacción glicoproteína-superficie era resistente al lavado. Por lo tanto, las glicoproteínas se encuentran unidas a la superficie parasitaria a través de interacciones relativamente fuertes.

Como se describió en la Sección II.2.a., la superficie de los metacéstodos ténidos posee algunos componentes séricos del huésped, además de los propios. Por lo tanto se hizo necesario determinar si alguna(s) de las glicoproteínas purificadas provenía del huésped. Esta posibilidad fue analizada en experimentos de IET en los que el suero de un cerdo normal fue sometido a SDS-PAGE y las proteínas resueltas en los geles fueron electrotransferidas a papel de nitrocelulosa. Las proteínas séricas adsorbidas al papel, se incubaron con los distintos anticuerpos antigli-

coproteínas (anti-GP1, anti-GP2-3, anti-GP5 o anti-GP6) y posteriormente, con un segundo anticuerpo acoplados a peroxidasa. Los resultados mostraron que los anticuerpos anti-GP5 reconocían un componente sérico del huésped (Fig. 38). La migración relativa y la forma de la banda reconocida por anti-GP5, resultó idéntica a la banda de cadenas pesadas de IgG reconocida por anticuerpos anti-IgG porcina, usados como referencia (Fig. 38). Los restantes anticuerpos anti-glicoproteínas no reconocieron a ninguna proteína del huésped.

Finalmente, se decidió caracterizar de manera adicional la especificidad de los anticuerpos obtenidos utilizando un método altamente sensible. Para ello, se realizaron experimentos de IET, semejantes a los descritos anteriormente, en los que un extracto crudo de cisticercos fue enfrentado con los anticuerpos anti-glicoproteínas. Los resultados mostraron que los anticuerpos obtenidos reconocieron a una variedad de componentes del EC (la excepción de anti-GP5), algunos de los cuales parecían comunes a dos o más antisueros (Fig. 39). En el caso de anti GP5, el componente reconocido nuevamente coincidió en migración relativa y forma de bandeo con las cadenas pesadas de la IgG porcina.

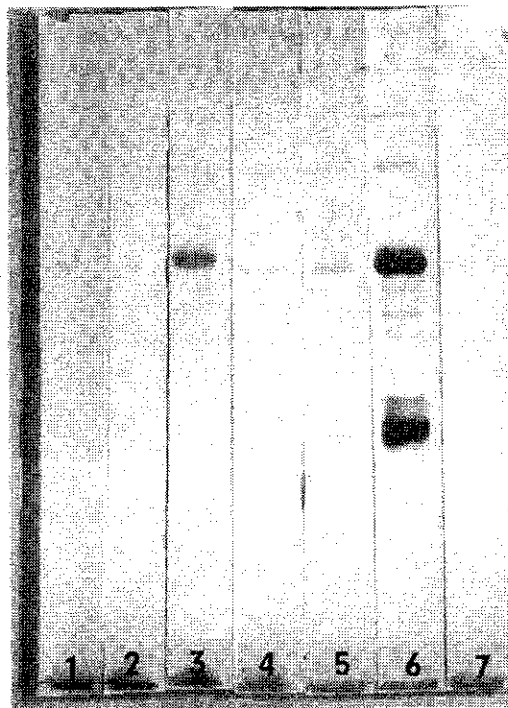


FIG. 38. Inmunoelectrotransferencia de un suero de cerdo normal, enfrentado con las fracciones IgG de los sueros anti-glicoproteínas. Carriles: 1) anti-GP1, 2) anti-GP2-3, 3) anti-GP5, 4) anti-GP6, 5) fracción IgG del suero de un conejo normal, 6) fracción IgG de un suero anti-IgG porcina y 7) solo segundo anti-cuerpo. Todos los carriles se incubaron con un segundo anticuerpo (IgG (chivo), anti-IgG de conejo, acoplada a peroxidasa. Se utilizó  $\alpha$ -cloro naftol como sustrato.



FIG. 39. Inmunoelectrotransferencia de un extracto crudo de cisticercos, enfrentado con las fracciones IgG de los sueros anti-glicoproteínas. Carriles: 1) anti-GP1, 2) anti-GP2-3, 3) anti-GP5, 4) anti-GP6, 5) fracción IgG de un suero anti-IgG porcina y 6) fracción IgG del suero de un conejo normal. Todos los carriles se incubaron con un segundo anticuerpo (IgG (chivo), anti-IgG de conejo, acoplada a peroxidasa). Se utilizó  $\alpha$ -cloro-naftol como sustrato.

## VI. DISCUSION

### 1.- CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS E INMUNOLOGICAS DEL AgB

El AgB del cisticerco de la T. solium es el antígeno del extracto crudo, más frecuentemente reconocido por sueros de pacientes cisticercosos. En la presente tesis, se describe un método que permite aislarlo hasta en un 95% de pureza. La conclusión de que el AgB es el principal componente en las fracciones SP y DP, obtenidas en los dos últimos pasos del procedimiento de purificación, se basó en su patrón de precipitación inmuno-electroforética frente a sueros de pacientes cisticercosos. El AgB en la fracción SP mostró identidad total con un componente del extracto crudo, indicando que sus características antigénicas son conservadas durante el procedimiento de purificación.

La disponibilidad del AgB en forma pura ha permitido su utilización en el diseño de métodos inmunodiagnósticos para neurocisticercosis. Resultados preliminares de ELISA (enzyme-linked immuno-sorbent assay) mostraron que el uso de este antígeno permitía detectar anticuerpos en el 73% y 85% de los sueros y líquidos cefaloraquídeos de pacientes neurocisticercosos, respectivamente (64). Ensayos recientes, realizados después de optimizar el método, detectan anticuerpos en el 80% y 88% de los sueros y líquidos cefaloraquídeos de pacientes (Espinoza, B., comunicación personal). Es interesante destacar, que se obtienen porcentajes semejantes cuando se usa un extracto crudo en lugar

del AgB puro. Es decir, que prácticamente todos los pacientes que producen anticuerpos en contra del cisticerco (detectables por este método), forman anticuerpos anti-B.

Como se describió en la Sección IV.1, 85% del contenido proteico de SP está constituido por dos proteínas, UB y LB, con pesos moleculares de 95,000 y 85,000 respectivamente. Cuando se enfrentaron los sueros anti-UB y anti-LB con la fracción SP en un sistema de DID, se obtuvo identidad total, indicando que el antígeno B purificado está formado por dos proteínas o subunidades. Este hallazgo se confirmó con los anticuerpos monoclonales anti-B (específicos hacia un solo determinante antigénico) que reconocen a UB y LB en los ensayos de IET. Lo anterior sugiere al menos dos posibilidades: 1) El parásito sintetiza dos proteínas antigénicamente idénticas, con una diferencia de 10,000 en su peso molecular; o, 2) La proteína de 85,000 d es un producto de hidrólisis de la proteína de 95,000 d, originada ya sea por un proceso postraducciona natural en el parásito, o como un artefacto durante el procedimiento de purificación. Sin embargo, puesto que la homogeneización de los cisticercos se llevó a cabo en 1-2 min y usando varios inhibidores de actividad proteolítica altamente efectivos, parece más probable que ambas proteínas (UB y LB) están presentes en los tejidos del parásito vivo. El hecho de que el AgB purificado por cromatografía de afinidad (a través de una columna de sefarosa 4B-colágena) presenta las dos cadenas polipeptídicas, excluye al menos la posibilidad de que LB se produzca artefactualmente durante un paso del procedimiento de puri-

ficación, posterior a la obtención de EC. Es clara la necesidad de una investigación adicional, dirigida a examinar las anteriores alternativas.

Puesto que las dos proteínas del AgB presentan identidad antigénica y puesto que no fue posible separarlas, el análisis de aminoácidos se llevó a cabo en la fracción DP. En consecuencia, los valores obtenidos representan el contenido promedio de residuos de ambas proteínas (UB y LB). Este análisis, mostró que el AgB está compuesto por proteínas poco comunes con respecto a su composición de aminoácidos (203). Las fracciones molares correspondientes a Lis, Arg, Glu y Asp, representan 52% del contenido total, sugiriendo que aproximadamente la mitad de los residuos pueden estar cargados. Esta alta densidad de carga podría explicar algunas propiedades peculiares del AgB: 1) El AgB constituido por proteínas de 85,000 y 95,000 d, aparece en el volumen de exclusión de una columna de sefadex G-200 (Fig. 12). Es bien conocido que el peso molecular de exclusión (para proteínas globulares) de esta resina es superior a los 500,000 (204); 2) El AgB no migra en el sistema de IEF llevado a cabo a pH 8.6 (Figs. 17 y 18), a pesar de que su punto isoeléctrico, determinado por isoelectroenfoque, es de 5-5.3; 3) El AgB precipita en forma de estructuras fibrosas cuando es incubado con ATP a concentraciones tan bajas como 30  $\mu$ M (Fig. 20).

Estas propiedades pueden ser el resultado del gran número de residuos cargados con ambas polaridades en la proteína, que permitirían el establecimiento de una

gran variedad de interacciones iónicas con otras moléculas cargadas, así como consigo mismo. Si el AgB a pH 2.5 interacciona consigo mismo, podría formar agregados que serían excluidos del sefadex G-200. Es posible que a pH 8.6 se formen diferentes tipos de agregados que, por su peso molecular o por que el promedio de su carga de superficie resulta neutro, serían isoeléctricos en la IEF (205). Con respecto a la precipitación inducida por ATP, puesto que no fué dependiente de la hidrólisis del nucleótido, es probable que el ATP simplemente actúe como un polianión para inducir la precipitación.

## 2.- PAPEL DEL AgB EN LA RELACION HUESPED-CISTICERCO

Los resultados de los experimentos de inmunofluorescencia muestran que el AgB tiene una amplia distribución en los tejidos del cisticerco. Adicionalmente, la fluorescencia más intensa observada en las células subtegumentales indica que éstas células son las responsables de su síntesis. En consecuencia, el hallazgo del AgB en las células subtegumentales sugirió que se trataba de un antígeno de superficie o de secreción. Los resultados de los experimentos de yodinación de superficie y de inmunoperoxidasa en microscopía electrónica apoyaron la segunda alternativa.

La secreción del AgB es congruente con el hecho de que sea el antígeno más frecuentemente reconocido por los sueros de pacientes cisticercosos (34,35). Un antígeno de secreción

claramente entraría en contacto con el sistema inmune del huésped. Asimismo, la liberación del AgB hacia la respuesta inflamatoria que rodea al cisticerco, es también congruente con el hecho de que las células plasmáticas del granuloma sintetizan principalmente anticuerpos anti-B (131,153). Finalmente, ensayos de inmunofluorescencia han permitido detectar al AgB en la respuesta inflamatoria que rodea al parásito (Plancarte, A., comunicación personal).

Una vez secretado, el AgB estimula al sistema inmune del huésped, que monta una respuesta específica tanto a nivel local (en la respuesta inflamatoria) como a nivel sistémico. Sin embargo, las propiedades de fibronectina del AgB, en los términos en que han sido descritas (169,170), pudieran indicar que su participación en la relación huésped-parásito no termina con su secreción. En vista de la importancia de las propiedades de fibronectina del AgB, los resultados en que se sustentan merecen una atención especial.

Plancarte y cols. (169,170) describieron varias propiedades del AgB como características de las fibronectinas de vertebrados: 1) Unión con colágena, 2) Alineamiento de fibroblastos murinos (células L) en cultivo y 3) Aglutinación de eritrocitos de varias especies. Aunque los autores no lo mencionan, estas propiedades implican que el AgB posee sitios de interacción (reconocimiento) para colágena por un lado, y para superficies celulares por el otro. Cabe hacer notar que la información actual sobre fibronectinas, sugiere que estas glicoproteínas (formadas por



dos subunidades de 200-250,000 d cada una) están compuestas por varios dominios funcionales separados por regiones poco ordenadas (206). Incluso se ha logrado purificar y caracterizar tales dominios (201,207-210). De este modo, se sabe que las fibronectinas poseen en cada subunidad, un dominio que interacciona con colágena, gelatina, fibrina, fibrinógeno y actina. Otro dominio (diferente al primero) que interacciona con superficies celulares; y al menos dos dominios más que interaccionan con heparina, DNA, ácido hialurónico, estafilococos, etc. Nuestros resultados de la cromatografía del EC a través de la columna de sefarosa 4B-colágena, comprueban que el AgB posee sitio(s) de interacción con la colágena. Sin embargo, los resultados de las cromatografías a través de agarosa-gelatina y de sefarosa 4B-heparina, indican que estos sitios de interacción no están presentes en el AgB. Puesto que las fibronectinas interaccionan con colágena y gelatina por medio del mismo sitio, parece claro que el sitio de interacción con colágena en el AgB es cualitativamente distinto. La única posibilidad es que el AgB se una a la colágena en una región diferente a la descrita para las fibronectinas (207).

Los datos que llevaron a la proposición de la interacción AgB-superficie celular requieren una discusión aparte. En primer lugar, es necesario señalar que estos experimentos se llevaron a cabo utilizando AgB fluoresceinado, y purificado a través de un procedimiento altamente desnaturalizante. En consecuencia, es difícil saber si el AgB utilizado poseía las mismas propieda-

des que el AgB nativo. En segundo lugar, los ensayos realizados no están entre los comúnmente empleados para demostrar propiedades de las fibronectinas (210-224). Sería de gran interés saber qué ocurre cuando el AgB se aplica en ensayos clásicos. Por ejemplo, ha sido claramente demostrado que células en cultivo requieren de fibronectina para unirse a colágena y a otros substratos (216-220). Incluso se ha encontrado que la morfología de células transformadas (con una capacidad reducida para producir fibronectina) puede ser parcialmente revertida por acción de fibronectina al medio de cultivo (221-224). Finalmente, las figuras presentadas en los reportes (Fig. 4 de la referencia 169 y Fig. 5 de la referencia 170), muestran una morfología claramente anormal en la mayor parte de las células L incubadas en presencia de AgB. En contraste, las células control (sin AgB), muestran la forma aplanada característica de estos fibroblastos (225). Parece claro que el AgB tuvo más bien un efecto deletereo sobre las células en cultivo, efecto que los propios autores señalan que ocurre con mayores concentraciones de antígeno.

En relación con la aglutinación de eritrocitos inducida por el AgB, aunque existe un reporte (226) en el que se demuestra que las fibronectinas son también capaces de inducirla, dada la peculiaridad de los eritrocitos, es difícil considerar a esta evidencia como claramente indicativa de que el AgB posee sitios específicos de interacción con superficies celulares. Esta propiedad también puede ser explicada como el resultado de in-

teracciones electrostáticas inespecíficas, debidas a la gran riqueza de residuos cargados en la molécula del AgB (ver Sección VI.1).

Lo anterior no tiene por objeto, el descartar la posibilidad de que el AgB posea otras propiedades de fibronectina, además de su interacción con colágena. Más bien, pretende señalar la necesidad de mayor investigación al respecto. Sin embargo, la discusión que sigue estará limitada a revisar las evidencias en favor de las especulaciones avanzadas por Plancarte y cols. (169, 170), basadas en la propiedad del AgB de unirse con la colágena.

Si el AgB es secretado por el cisticerco, cabría esperar que se fije en el tejido conjuntivo de la reacción inflamatoria que lo rodea. De este modo, los anticuerpos anti-B se fijan al tejido conjuntivo del huésped en lugar de fijarse al parásito. Las evidencias que apoyan esta hipótesis son las siguientes: 1) Como se mencionó arriba, es posible demostrar inmunoquímicamente la presencia del AgB asociado a la respuesta inflamatoria en las cercanías del cisticerco y 2) Ensayos de inmunofluorescencia indican que el factor C3b (C3 en su forma activa), se localiza también en la reacción inflamatoria, en íntima asociación con el tejido conjuntivo (153). Una posible interpretación de estas observaciones, es que la activación del sistema del complemento está siendo inducida por complejos AgB-anticuerpos, asociados al tejido conjuntivo.

Cabe señalar que la segunda evidencia parece no apoyar a la tercera especulación propuesta por Plancarte y cols. (169,170),

que sugiere que el AgB podría inhibir la vía clásica del complemento al reaccionar con C1q en su porción similar a colágena. Sin embargo, evidencia más directa puede ser obtenida por ensayos de fijación de complemento realizados en presencia y ausencia del AgB.

El papel secretor del AgB así como su propiedad de interactuar con colágena, sugieren que la respuesta mediada por anticuerpos anti-B es incapaz de dañar al cisticerco. Teleológicamente hablando, se trata de un antígeno hacia el cual el huésped compromete una porción considerable de su respuesta humoral. Es decir, que la secreción continua del AgB podría restar capacidad de respuesta en contra de otros antígenos del cisticerco, al menos en la interfase huésped-parásito.

La información existente en la literatura sobre las características bioquímicas e inmunológicas de antígenos purificados de otros céstodos (ver Sección II.1.b), indica que el AgB es una entidad no descrita anteriormente. Sin embargo esto no significa que el AgB es exclusivo de la T. solium. Al respecto, Olivo (227) ha demostrado que también está presente en otras especies incluídas en la clase Cestoda: T. saginata, T. hidatigena, T. pisiformis, T. taeniaeformis, T. crassiceps, Dipilidium caninum, así como en el parásito tremátodo Faciola hepatica. En cambio, está ausente en el turbelárido de vida libre Dugesia sp, en el acantocéfalo parásito Macracanthorhynchus hirudinaceus, y en los nemátodos Ascaris lumbricoides, A. suum, Parascaris equorum y Onchocerca volvulus. Aunque es necesario incluir en esta

búsqueda a otros representantes de las clases Turbelárida y Tremátoda, los anteriores resultados sugieren que el AgB es una proteína muy conservada en organismos parásitos del phylum Platyhelminthes. Por lo tanto, parece una proteína ideal para ser usada como indicador de evolución entre los organismos del phylum. Este punto es especialmente interesante, considerando las graves deficiencias que existen en el conocimiento de la filogenia de los platihelminths (228-231).

### 3.- GLICOPROTEINAS DEL CISTICERCO

La Con-A fue seleccionada como herramienta para el aislamiento de glicoproteínas del cisticerco, por su amplia especificidad en el reconocimiento de grupos carbohidratos. Ha sido bien caracterizado que la Con-A une grupos  $\alpha$ -d-metil-manósido y  $\alpha$ -d-metil-glucósido con alta afinidad, así como  $\alpha$  y  $\beta$ -d-arabinofuranósido y  $\alpha$  y  $\beta$ -d-metil-fructofuranósido con menor afinidad (174). Estos grupos son muy comunes en glicoproteínas de origen animal, mientras que aparecen menos frecuentemente en los glicolípidos (174). En consecuencia, el uso de una columna de sefarosa 4B-Con-A garantizaba el atrapamiento de un buen número de glicoproteínas del cisticerco. A su vez, el medio utilizado para la obtención de un extracto crudo del cisticerco, no contenía ningún agente disruptor de estructura de membrana (detergente, solvente orgánico, etc.). Por lo tanto, parece razonable esperar que las proteínas

extraídas del cisticerco, pertenezcan al grupo de las proteínas solubles y al de extrínsecas de membrana. Considerando específicamente el caso de las glicoproteínas, cabría esperar que el extracto crudo inicial contenga glicoproteínas extrínsecas de superficie así como de secreción. Esto es importante, puesto que indica que las proteínas intrínsecas de membrana no fueron extraídas. A pesar de lo anterior, se decidió no utilizar detergentes puesto que en algunos ensayos iniciales se encontró que el uso de tritón X-100 (detergente no iónico), producía un mayor desprendimiento de la Con-A unida a la columna, además de impedir la unión de las glicoproteínas con la lectina.

Los resultados de la cromatografía usando sefarosa 4B-Con-A ( $I^{125}$ ), demostraron que una pequeña parte de la lectina se desprendía de la columna y aparecía en la fracción Emm. Esto hizo considerar a las bandas de 27,000 y 18,000 d, correspondientes a la Con-A, como contaminantes ajenos al parásito. Consecuentemente, en el análisis que sigue, estas bandas así como la correspondiente al frente del gel fueron excluidas. La fracción Emm, obtenida de la cromatografía por la columna de sefarosa 4B-Con-A, mostró un enriquecimiento en glicoproteínas al ser comparada con la fracción de origen (EC). Sin embargo, a juzgar por la diferencia entre el número de bandas teñidas con azul brillante de Coomasie (19 bandas) y con PAS (8 bandas), en la SDS-PAGE de Emm, menos de la mitad de las proteínas contenidas en la fracción eran glicoproteínas. Esto sugiere que las proteínas carentes de carbohidratos fueron retenidas por la columna, al

estar agregadas con glicoproteínas. Otra posibilidad, proviene del hecho de que una de las glicoproteínas purificadas resultó ser la cadena pesada de IgG porcina (Ver abajo). Si la IgG porcina tiene actividad de anticuerpo, es concebible que algunas proteínas antigénicas hayan sido retenidas en la columna en forma de complejos inmunes.

El aislamiento de glicoproteínas tenía como objetivo paralelo el aislamiento de antígenos parasitarios. Este objetivo es potencialmente relevante por sus aplicaciones en el desarrollo de métodos inmunodiagnósticos e inmunoprolifácticos para cisticercosis. Como era de esperar, la fracción Emm enriquecida en glicoproteínas también estaba enriquecida de antígenos. Esto se demostró, al comparar el número de antígenos que los sueros de pacientes cisticercosos reconocían, al ser enfrentados en IEF contra la fracción Emm y contra un extracto crudo. De hecho, se han realizado algunos ensayos, en colaboración con el grupo de Flisser, utilizando a Emm como antígeno en las pruebas de ELISA (232) e inmunopunto (233). Resultados preliminares indican que no solo se obtiene una sensibilidad equiparable a la conseguida con el extracto crudo, sino que además se reducen las reacciones cruzadas con sueros de pacientes infectados por otros parásitos relacionados. El enriquecimiento en antígenos del cisticerco también hace atractiva a la fracción Emm, para llevar a cabo ensayos de vacunación en cerdos retados con huevecillos de la T. solium. Desafortunadamente, las características protectoras y tóxicas de la fracción Emm no han sido probadas.

La utilidad potencial de Emm en el desarrollo de métodos inmunodiagnósticos e inmunoprolifácticos no fué la única característica interesante de la fracción. Emm representaba una mezcla menos compleja de componentes parasitarios que su extracto de origen (EC). Esto la hizo atractiva para llevar a cabo intentos de purificación de glicoproteínas del cisticerco. Al respecto, en la presente tesis se describe la purificación y caracterización parcial de las seis glicoproteínas más abundantes en Emm, dos de las cuales (GP2 y GP3) se obtuvieron mezcladas. En su purificación se siguió un método reportado recientemente (178), que consiste en la electroelución de las bandas proteicas resueltas en geles de SDS-PAGE. Este método presenta múltiples ventajas sobre otros descritos anteriormente (234-240). Sin embargo, por la naturaleza misma del procedimiento, no se puede excluir la posibilidad de que las glicoproteínas electroeluidas contengan contaminaciones ligeras de otras proteínas (no observables con la tinción usada), que migren en la misma posición. A pesar de lo anterior, la SDS-PAGE de las glicoproteínas aisladas mostró patrones de bandeo razonablemente homogéneos, a excepción de la GP6 que presentó una banda bien definida sobrepuesta con una zona de tinción difusa.

Los ensayos de IEF (los de IET serán discutidos posteriormente) en los que se probaron los cuatro sueros antiglicoproteínicas (anti-GP1, anti-GP2-3, anti-GP5 y anti-GP6), mostraron que cada uno de ellos reconoce un componente distinto en el extracto crudo. Ello decidió a realizar directamente los experimentos de



localización en la superficie externa del cisticerco. Los resultados de los ensayos de inmunoperoxidasa en microscopía electrónica, indicaron que todas las glicoproteínas purificadas estaban expuestas en la superficie. Este hallazgo no fué inesperado si se considera que el segundo objetivo de la purificación de glicoproteínas del cisticerco era la obtención de componentes de superficie o de secreción (Ver Sección II.3). Parecía claro que se disponía de varios marcadores de la superficie parasitaria. Sin embargo, la superficie de los metacéstodos presenta no solamente proteínas de origen parasitario, sino también, algunas proteínas séricas del huésped, vgr: inmunoglobulinas (Ver Sección II.2.a). Además, como lo demostraron Willms y cols. (1930, 143), los extractos crudos de cisticercos obtenidos de cerdo, contienen IgG del huésped. Puesto que las glicoproteínas aquí descritas fueron purificadas a partir de un extracto crudo, cabía la posibilidad de que se hubiera obtenido alguna proteína sérica del cerdo. Sorprendentemente, los resultados de ensayos de IET demostraron que la glicoproteína designada como GP5 corresponde con las cadenas pesadas de IgG porcina. Por lo tanto, se había logrado purificar un componente del huésped a partir de un extracto crudo parasitario.

Como se muestra en la Figura 38, ensayos de IET permiten detectar cantidades considerables de IgG porcina en el extracto crudo de cisticercos. Además, es bien conocido desde hace algún tiempo, que los fluídos vesiculares de los ténidos contienen proteínas séricas del huésped, especialmente inmunoglobulinas (241-

243). Incluso se ha demostrado que los metacéstodos son capaces de internalizar inmunoglobulinas y otras proteínas no relacionadas, "in vivo" e "in vitro" (244-247). Puesto que la velocidad de entrada de las inmunoglobulinas normales y de las otras proteínas es idéntica, se ha propuesto que ocurre a través de un sistema no mediado por receptores (pinocitosis fluida) (246,247). Resultados descritos en esta tesis y otros obtenidos recientemente, indican que la interacción inmunoglobulina-superficie es de alta afinidad. En este punto, cabe hacer notar que se desconoce cómo están unidas las inmunoglobulinas a la superficie de los metacéstodos. Pudieran ser inmunoglobulinas normales unidas a receptores para Fc como los descritos en Schistosoma mansoni (163, 164), o, pudieran ser anticuerpos unidos con sus respectivos antígenos. En cualquier caso, es concebible que el cisticerco posea un sistema de internalización mediado por receptores, que funcione paralelamente al de pinocitosis fluida. Es posible, que información relevante para aclarar esta pregunta, pueda obtenerse en experimentos dirigidos a determinar cómo ocurre la interacción inmunoglobulina-superficie. Al respecto, la demostración de síntesis activa de anticuerpos en la reacción inflamatoria que rodea al cisticerco (131,153), sugiere que existen altos niveles de anticuerpos en la cercanía del parásito. Si esto es correcto, cabría esperar que al menos una parte de las inmunoglobulinas en la superficie, sean anticuerpos unidos a sus antígenos específicos, y que, los antígenos de superficie pudieran ser los "receptores" en el sistema paralelo de internalización. Actualmente se están

desarrollando esfuerzos para aclarar por un lado, como están unidas las inmunoglobulinas a la superficie, y por el otro, para determinar si la cinética de internalización de las inmunoglobulinas normales es distinta a la de los anticuerpos. Resultados preliminares utilizando anticuerpos e inmunoglobulinas normales marcados radioactivamente, indican que los primeros son internalizados a mayor velocidad. El anterior, podría ser un hallazgo importante porque hablaría, como ha sido sugerido por Willms (131), de un mecanismo que le permite al cisticerco impedir que su tegumento sufra daño mediado por anticuerpos.

Los experimentos de IET del EC mostraron que cada uno de los anticuerpos anti-glicoproteínas (a excepción de anti-GP5) reconocen a un gran número de componentes parasitarios del extracto crudo, a pesar de que fueron obtenidos inmunizando conejos con las glicoproteínas purificadas. Esta observación, además de llamar la atención hacia la gran diferencia en sensibilidad entre las técnicas de IEF y de IET, puede tener varias explicaciones no excluyentes entre sí. La primera consiste en pensar que las glicoproteínas parasitarias purificadas (GP1, GP2-3, GP6) son fragmentos proteolíticos provenientes de glicoproteínas de mayor peso molecular. Lo anterior podría explicar porqué los anticuerpos anti-GP2-3 y anti-GP6, reconocieron bandas de mayor peso molecular que las utilizadas en su producción. Otra posibilidad es que las glicoproteínas purificadas tienen su peso molecular nativo, pero que una parte de ellas sufre proteólisis durante la obtención del extracto crudo. Ello explicaría porqué los anticuerpos reconocen bandas de

pesos moleculares inferiores al de la glicoproteína con que fueron obtenidos. La tercera explicación podría ser que la inmunización de los conejos indujo la producción de anticuerpos dirigidos en contra de residuos carbohidratos comunes en muchas proteínas del cisticerco. Cabe hacer notar que la homogeneización de los cisticercos se llevó a cabo en presencia de varios inhibidores de actividad proteolítica. Además, para las IET se utilizó un extracto crudo, obtenido por homogeneización directa de los cisticercos en la mezcla de muestra SDS-PAGE, que es muy desnaturalizante.

Puesto que no se dispone de evidencias que permitan apoyar o descartar a ninguna de las explicaciones, actualmente se realizan esfuerzos para obtener información al respecto. Es posible que la explicación final tenga contribuciones parciales de cada una de ellas.

Los resultados descritos en la presente tesis, constituyen el inicio de un esfuerzo que permitirá conocer a los principales constituyentes de la superficie del cisticerco. Las implicaciones de este conocimiento, seguramente se manifestarán en una mejor comprensión de la relación huésped-cisticerco, y en bases más racionales para el diseño de métodos inmunoproliféricos que ayuden a prevenir y a controlar la enfermedad.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Hird, W. y Pullen, M. (1979) Tapeworms, meat and man: A brief review and update of cysticercosis caused by Taenia saginata and Taenia solium. J. Food Protection, 42: 58.
2. Asada, J., Otagaki, H., Kaji, F., Aokage, K. y Ochi, G. (1956) On the longevity and development of the pork and beef tapeworms in human host. Tokyo Iji Shinshi, 73: 153.
3. Makaruk, Z., Leszewska Potocka, J. y Sporny, S. (1929) Surgical complications of taeniasis of the bile track (case reports). Polski Tygodnik Lekarski. 34: 1633.
4. Silverman, P. (1954) Studies on the biology of some tapeworms of the genus Taenia. II. The morphology and development of the taeniid hexacanth embryo and its enclosing membranes, with some notes on the state of development and propagation of gravid segments. Ann. Trop. Med. and Parasitol. 48: 356.
5. Laclette, J.P., Ornelas, Y., Merchant, M. y Willms, K. (1982) Ultrastructure of the surrounding envelopes of Taenia solium eggs. En: "Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives", (Flisser, A., Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. Eds.). Academic Press (New York). Pags: 375-388.
6. Cañedo, L., Laclette, J.P. y Morales, E. (1982) Evagination of the metacestode of Taenia solium. En: "Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives." (Flisser, A., Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. Eds.). Academic Press (New York). Pags: 363-373.
7. Flores-Berroeta, L. y Bifano, A. (1965) Cisticercosis en los perros Canis familiaris de la Cd. de México. Acta Médica de México. 1: 27.
8. Freitas, M. y Lamas de Silva, J. (1958) Ocorrência de Cysticercus en caes em Minas Gerais. Arquivos de Escola Superiore de Veterinaria, Universidad Rural do Estado Minas Gerais. 11: 371.
9. Mazzotti, L., Dávalos, A. y Martínez Marañón, R. (1965) Infecciones naturales y experimentales por Cysticercus cellulosae en diferentes especies de mamíferos. Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (México), 25: 151.

10. Verster, A. (1969) A taxonomic revision of the genus Taenia L., 1758. Onderstepoort J. Vet. Res. 36: 3.
11. Abuladze, K. (1964) Principles of Cestodology, Taeniata, Vol. IV (Taenidae-cestode of animals and man and the disease they provoke), Izd. Izvestiya Akademii Nauk (Moscow).
12. Du Noyer, M. y Baer, J. (1928) Etude comparée du Taenia saginata et Taenia solium. Bulletin des Sciences Pharmacologiques. 35: 209.
13. Gemmell, M. (1978) The effect of weather on tapeworm eggs and its epidemiological implications. En: "Weather and parasite animal disease" (Gibson, T. Ed.) . World Meteorological Organization. Technical Reports, 159: 83.
14. Rybicka, K. (1966) Embryogenesis in cestodes. En: Advances in Parasitology, Vol. 4, (Dawes, B. Ed.). Academic Press (London & New York). Pag: 107.
15. Schramlova, J. y Blazek, K. (1982) Ultrastructure of the hatched and unhatched oncospheres of Taenia saginata. Folia Parasitologica. 29: 45.
16. Rabiela-Cervantes, M., Rivas-Hernández, A., Rodríguez-Ibarra, J., Castillo-Medina, S. y Cancino, P. (1982) Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis. En: "Cysticercosis: Present State of knowledge and perspectives". (Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. Eds.). Academic Press (New York). Pags: 179-200.
17. Rabiela, M.T., Rivas-Hernández, A. y Rodríguez-Ibarra, J. (1979) Consideraciones anatomopatológicas sobre la cisticercosis cerebral como causa de muerte. Patología. 17: 119.
18. Smyth, J. (1954) Studies on tapeworm physiology. VII: Fertilization of Schistocephalus solidus "in vitro". Exp. Parasit. 3: 64.
19. Yakoleff-Greenhouse, V., Flisser, A., Sierra, A. y Larralde, C. (1982) Analysis of antigenic variation in cysticerci of Taenia solium. J. Parasitol. 68: 39.
20. Villaseñor, C. (1942) Algunos datos para la histopatología de la cisticercosis del encéfalo. Bol. Est. Med. Biol. 1: 89.
21. Macías, V. y Maqueo, M. (1958) Cisticercosis cerebral. Rev. Inv. Clín. 10: 443.

22. Albores, J. y Altamirano, M. (1971) Algunas consideraciones sobre 9,412 autopsias realizadas en el Hospital General de México. Rev. Invest. Salud Pública, 31: 1.
23. Martínez-Romero, H., Martínez Murray, R., Boisselier, E. y Martínez-Duhart, E. (1975). Cisticercosis cerebral Humana. Cirugía y Cirujanos 43: 507.
24. Flores Barroeta, F., Aguirre, J., Fernández, J., Jurado, J. y Velasco F. (1975) La utilidad de los estudios post-mortem. Patología 13: 17.
25. Macías, R., Rodríguez, F. y Ordóñez, S. (1970) Cisticercosis cerebral: Anatomía Patológica y Correlación Anatomoclínica. Neurol. Neurocir. Psiquiatr. 11: 271.
26. Salas-Martínez, M. (1971) Procesos patológicos mas frecuentes considerados como factores importantes en la causa de muerte en los niños, juzgados a través de la revisión de 2900 estudios post-mortem realizados en el Departamento de Patología del Hospital Infantil de México 1943-1968. Gac. Med. Mex. 102: 216.
27. López, A. y Cedillo, J. (1976) Cisticercosis intracraneal en los niños. Análisis de 48 casos. Rev. Mex. Pediatr. 45: 277.
28. Pérez-Tamayo, R. y Flores, F. (1959) Datos generales de 2202 autopsias. Prensa Med. Mex. 24: 117.
29. Briceño, C., Biagi, F. y Martínez, B. (1961) Cisticercosis. Observaciones sobre 97 casos de autopsia. Prensa Med. Mex. 26: 193.
30. Márquez-Monter, H. y Austria, B. (1969) Cisticercosis en el Hospital General de México, Estudio Anatomopatológico de 155 casos. Rev. Lat. Am. Patol. 8: 79.
31. Ridaura, C., López-Corella, E. (1968) Análisis de la mortalidad -- general en el Hospital General de México, S.S.A. Observaciones de -- once años. Rev. Med. Hosp. Gen. (Mex.) 51: 259.
32. Flisser, A., Bulnes, I., Diaz, M., Luna, R., Woodhouse, E., Beltrán, F., Martínez, I. y Larralde, C. (1976) Estudios seroepidemiológicos de la cisticercosis humana en poblaciones predominantemente indígenas y rurales del estado de Chiapas. Arch. Invest. Med. (Mex.) 7: 107.

33. Goldsmith, R., Kagan, I., Reyes-González, M. y Cedeño-Ferreira, J. (1971) Estudios seroepidemiológicos realizados en Oaxaca, México. I. Encuesta de anticuerpos parasitarios mediante la prueba de hemaglutinación indirecta. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. 71: 500.
34. Woodhouse, E. (1979) Seroepidemiología de la Cisticercosis Humana en la República Mexicana. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM (México).
35. Flisser, A. (1978) Inmunología de la Cisticercosis. Tesis de Doctorado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN (México).
36. Woodhouse, E., Flisser, A. y Larralde, C. (1982) Seroepidemiology of Human Cysticercosis in Mexico. En: "Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives". (Flisser, A., Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. Eds.). Academic Press (New York). Pags: 11-23.
37. Aluja, A. (1982) Frequency of porcine cysticercosis in Mexico. En: "Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives" (Flisser, A. Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. Eds.). Academic Press (New York). Pags: 53-62.
38. Guidelines for surveillance prevention and control of taeniasis/cysticercosis. (1984) (Gammel, M., Matyas, Z., Pawlowski, Z. y Soulsby, E. Eds.). WHO (Genève). Pags: 46-55.
39. Escobar, A. y Nieto, D. (1972) Parasitic Diseases. En: "Pathology of the nervous system. Vol. III" (Minckler, J. Ed.). McGraw-Hill (New York). Pags: 2507-2515.
40. Velasco-Suárez, M., Bravo-Becherelle, N. y Quirasco, F. (1982) Human cysticercosis: Medical-social implications and economic impact. En: "Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives" (Flisser, A., Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. Eds.). Academic Press (New York). Pags: 47-51.
41. Acevedo-Hernández, A. (1982) Economic impact of porcine cysticercosis. En: "Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives" (Flisser, A., Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. Eds.). Academic Press (New York). Pags: 63-67.
42. Dixon, H. y Lipscomb, F. (1961) Cysticercosis: An analysis and follow-up of 450 cases. Special Report Series. Medical Research Council. 299: 1.



43. Briceño, C., Biagi, F. y Martínez, B. (1961) Cysticercosis: observations on 97 autopsy cases. Prensa Med. Mex. 26: 193.
44. Priest, R. (1926) A case of extensive somatic dissemination of Cysticercus cellulosae in man. Br. Med. J. 2: 471.
45. Zenteno, G. (1982) A classification of human cysticercosis. En: "Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives" (Flisser, A., Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. Eds.). Academic Press (New York). Pags: 107-126.
46. Bourilkov, T. y Babadjov, L. (1968) Cysticercose, problème de diagnostic différentiel en pneumologie. A propose de deux cas. Poumon Coeur. 24: 239.
47. Mayo, F. y Baier, H. (1979) Cysticercotic cyst involving the pleura. Arch. Intern. Med. 139: 115.
48. Sánchez-Cisneros, R. (1979) Cisticercos en el corazón. Referata Médica. 6: 35.
49. Márquez-Monter, H., Aguirre, J. y Biagi, F. (1963) Cisticercosis del miocardio. Revista de la Facultad de Medicina (México). 5: 401.
50. Saens, J. (1950) Estado actual del problema de la cisticercosis ocular. Anales de la Sociedad Mexicana de Oftalmología y Otorrinolaringología. 24: 30.
51. Sánchez-Fontan, R. (1964) Cisticercosis ocular. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina, UNAM (México).
52. Rognetta, E. (1844) Traite philosophique et clinique d'ophtalmologie. Art. 8: 146.
53. Lombardo, L. (1982) Cisticercosis cerebral; Colección Textos Médicos No. 4. Instituto Mexicano del Seguro Social (México). 71 págs.
54. Dres. Francisco Escobedo Ríos e Ignacio Madrazo: Comunicación personal.
55. Macías, S. y Ordóñez, S. (1970) Cisticercosis cerebral. Prensa Méd. Mex. 1-2: 6.

56. Dunne, W. y Lemman, A. (1975) Disease of swine. 4a. edición, Iowa State University Press. (Iowa). 463 pags.
57. Hernández-Jáuregui, P., Márquez Monter, H. y Sastré, O. (1973) Cysticercosis of the central nervous system in hogs. Am. J. Vet. Res. 34: 451.
58. Nieto, D. (1948) Diagnóstico de la cisticercosis del sistema nervioso central. Prensa Med. Mex. 13: 226.
- ✓ 59. Nieto, D. (1956) Cysticercosis of the nervous system. Diagnosis by means of the spinal fluid complement fixation test. Neurol. 6: 725.
60. Flisser, A., Tarrab, R., Willms, K. y Larralde, C. (1975) Inmunoelectroforesis y doble inmunodifusión en el diagnóstico de la cisticercosis cerebral humana. Arch. Invest. Med. (México). 6: 1.
61. Rydzewski, A., Chisholm, E. y Kagan, I. (1975) Comparison of serologic test for human cysticercosis by indirect immunofluorescent antibody and agar gel precipitin tests. J. Parasitol. 61: 154.
62. González-Barranco, D., Sandoval, M. y Trujillo, V. (1978) Reacción de inmunofluorescencia indirecta en cisticercosis. Arch. Inv. Med. (México). 9: 51.
63. Espinoza, B., Flisser, A., Plancarte, A. y Larralde, C. (1982) Immunodiagnosis of human cysticercosis: ELISA and immunoelectrophoresis. En: "Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives". (Flisser, A., Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. Eds.). Academic Press (New York). Págs: 163-170.
64. Diwan, A., Coker-Vann, M., Brown, D., Subianto, R., Desowitz, R., Escobar, A., Clarence, J., Gibbs, J. y Carleton, G. (1982) Enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to cysticerci of Taenia solium. Am. J. Trop. Med. Hyg. 31: 364.
65. Coker-Vann, M., Brown, D. y Godjdissek, A. (1984) Serodiagnosis of human cysticercosis using a chromatofocused antigenic preparation of Taenia solium cysticerci, in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 78: 492.
66. Mohammad, I., Heinser, D., Miller, B., Goldberg, M. y Kagan, I. (1984) Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of cerebral cysticercosis. J. Clin. Mic. 20: 775.

67. Flisser, A. (1980) The immunology of human cysticercosis. En: "Molecules cells and parasites in immunology". (Larralde, C., Willms, K., Ortíz-Ortíz, L. y Sela, M. Eds.). Academic Press (New York). Pags: 125-143.
68. Flisser, A., Woodhouse, E. y Larralde, C. (1980) Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. Clin. Exp. Immunol. 39: 27.
69. Flisser, A., Plancarte, A., Espinoza, B., Woodhouse, F., Rivera, L., Trueba, T., Yakoleff-Greenhouse, V., Sierra, A., Laclette, J.P., Cañedo, L. y Larralde, C. (1982) The immune status of patients with cysticercosis. Afr. J. Clin. and Exp. Immunol. 3: 1983.
70. Siebert, A., Good, A. y Simmons, J. (1978) Kinetics of primary and secondary infections with Taenia crassiceps metacestodes (Zeder, 1800) (Cestoda: Cyclophyllidea). Int. J. Parasit. 8: 39.
71. Good, A. y Miller, K. (1976) Depression of the immune response to sheep erythrocytes in mice infected with Taenia crassiceps larvae. Infection and Immunity. 14: 449.
72. Miller, K., Good, A. y Mishell, R. (1978) Immunodepression in Taenia crassiceps infection: restoration of the in vitro response to sheep erythrocytes by activated peritoneal cells. Infection and Immunity. 22: 365.
73. Engelkirk, P. y Williams, J. (1982) Taenia taeniaeformis (Cestoda) in the rat: Ultrastructure of the host-parasite interface on days 1 to 7 postinfection. J. Parasitol. 68: 620.
74. Engelkirk, P. y Williams, J. (1983) Taenia taeniaeformis (Cestoda) in the rat: Ultrastructure of the host-parasite interface on days 8 to 22 postinfection. J. Parasitol. 69: 828.
75. Musoke, A. y Williams, J. (1975) The immunological response of the rat to infection with T. taeniaeformis. V. Sequence of appearance of protective immunoglobulins and the mechanism of action of 7S $\gamma$ 2a antibodies. Immunology. 29: 855.
76. Musoke, A. y Williams, J. (1976) Immunological response of the rat to infection with T. taeniaeformis. III. Protective antibody response to implanted parasites. Int. J. Parasitol. 6: 265.
77. Németh, I. (1972) Immunological study of rabbit cysticercosis. V. Characterization of the antibody response to experimental infection with Cysticercus pisiformis (Bloch 1780) Gmelin 1790. Acta Vet. Acad, Sci. Hung. 22: 377.

78. Németh, I. (1973) Immunological study of rabbit cysicercosis. VI. Isolation of specific antibodies from serum of rabbits infected with the larval form of Taenia pisiformis (Bloch 1780) Gmelin 1790. Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 23: 13.
79. Biguet, J., Rose, F., Capron, A. y Tran Van Kyi, P. (1965) Contribution de l'analyse immunoélectrophorétique a la connaissance des antigenes vermineux. Incidences pratiques sur leur standardisation, leur purification et le diagnostic des helminthiases par immunoélectrophorese. Revue d'Immunologie et de Thérapie Antimicrobienne (Paris). 29: 5.
80. Capron, A., Biguet, J., Vernes, A. y Afchain, D. (1968) Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relation hote-parasite. Pathol. Biol. (Paris). 16: 121.
81. Capron, A., Vernes, A. y Biguet, J. (1967) Le diagnostic immunoélectrophorétique de l'hydatidose. En SIMEP Ed. (Lyon): Le kyste hydatique du foie (Journées Lyonnaises d'Hydatologie, 1966). Págs: 27-40.
82. Oriol, R., Williams, J., Pérez-Esandi, M. y Oriol, C. (1971) Purification of lipoprotein antigens of Echinococcus granulosus from sheep hydatid fluid. Am. J. Trop. Med. and Hyg. 20: 569.
83. Varela-Díaz, V., Coltorti, A., Rickard, M., Guisantes, J. y Yarzabal, L. (1974) The immunoelectrophoretic characterization of sheep hydatid cyst fluid antigens. Am. J. Trop. Med. and Hyg. 23: 1092.
84. Bouth, D., Fruit, J. y Capron, A. (1974) Purification d'un antigène spécifique du liquide hydatique. Ann. Immunol. (Institut. Pasteur). 125: 775.
85. Oriol, C. y Oriol, R. (1975) Physicochemical properties of a lipoprotein antigen of Echinococcus granulosus. Am. J. Trop. Med. and Hyg. 24: 96.
86. Dottorini, S. y Tassi, C. (1977) Echinococcus granulosus: Characterization of the main antigenic component (Arc 5) of hydatid fluid. Exp. Parasitol. 43: 307.
87. Rickard, M., Davies, C., Bout, D. y Smyth, J. (1977) Immunohistological localization of two hydatid antigens (Antigen 5 and Antigen B) in the cyst wall, brood capsules and protoscoleces of Echinococcus granulosus (ovine and equine) and E. multilocularis using immunoperoxidase methods. J. Helmitol. 51: 359.

88. Yárzabal, L., Dupas, H., Bout, D. y Capron, A. (1976) Echinococcus granulosus: The distribution of hydatid fluid antigens in the tissues of the larval stage. I. Localization of the specific antigen of hydatid fluid (antigen 5). Exp. Parasitol. 41: 391.
89. Davies, C., Rickard, M., Bout, D. y Smyth, J. (1978) Ultrastructural immunocytochemical localization of two hydatid fluid antigens (antigen 5 and antigen B) in the brood capsules and protoscolexes of ovine and equine Echinococcus granulosus and E. multilocularis. Parasitology. 77: 143.
90. Varela-Díaz, V., Echert, J., Rausch, R., Coltorti, E. y Hess, V. (1977) Detection of E. granulosus arc 5 in sera of patients with surgically confirmed E. multilocularis infection. Z. Parasitenkd. 53: 183.
91. Varela-Díaz, V., Coltorti, E., Rickard, M. y Torres, J. (1977) Comparative antigenic characterization of Echinococcus granulosus and Taenia hydatigena cyst fluids by immunoelectrophoresis. Res. Vet. Sci. 23: 213.
92. Yarzabal, L., Bout, D., Náquira, F. y Capron, A. (1977) Further observations on the specificity of antigens 5 of Echinococcus granulosus. J. Parasitol. 63: 495.
93. Yong, W. y Heath, D. (1979) "Arc 5" antibodies in sera of sheep infected with Echinococcus granulosus, Taenia hydatigena and Taenia ovis. Parasite Immunol. 1: 27.
94. Conder, G., Andersen, F. y Schantz, P. (1980) Immunodiagnostic test for hydatidosis in sheep: an evaluation of double diffusion, immunoelectrophoresis, indirect hemagglutination and intradermal test. J. Parasitol. 66: 577.
95. Schantz, P., Shanks, D. y Wilson, M. (1980) Serologic cross-reactions with sera from patients with echinococcosis and cysticercosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29: 609.
96. Chordi, A. y Kagan, I. (1965) Identification and characterization of antigenic components of sheep hydatid fluid by immunoelectrophoresis. J. Parasitol. 51: 63.
97. Pozzuoli, R., Piantelli, M., Perucci, C., Arru, E. y Musiani, P. (1975) Isolation of the most immunoreactive antigens of Echinococcus granulosus from sheep hydatid fluid. J. Immunol. 115: 1459.
98. Piantelli, M., Pozzuoli, R., Arru, E. y Musiani, P. (1977) Echinococcus granulosus: identification of subunits of the major antigens. J. Immunol. 119: 1382.

99. Campbell, D. (1936) Active immunization of albino rats with protein fraction from Taenia taeniaeformis and its larval form. Cysticercus faciolaris. Am J. Hyg. 23: 104.
100. Leid, R. y Williams, J. (1974) Immunological response of the rat to infection with Taenia taeniaeformis. I. Immunoglobulin classes involved in passive transfer of resistance. Immunology. 27: 195.
101. Kwa, B. y Liew, F. (1977) Immunity in taeniasis-cysticercosis. I. Vaccination against Taenia taeniaeformis in rats using purified antigen. J. Exp. Med. 146: 118.
102. Rajasekariah, G., Rickard, M., Anders, R. y Mitchell, G. (1982) Immunization of mice against Taenia taeniaeformis using solubilized oncospherical antigens. Int. J. Parasitol. 12: 111.
103. Rickard, M. y Katiyar, J. (1976) Partial purification of antigens collected during in vitro cultivation of the larval stages of Taenia pisiformis. Int. J. Parasitol. 12:111.
104. Geerts, S., Kumar, V. y Aerts, N. (1979) Antigenic components of Taenia saginata and their relevance to the diagnosis of equine cysticercosis by immunoelectrophoresis. J. Helmitol. 53: 293.
105. Harrison, L., Sewell, M. (1980) The antigenic activity of chromatographic fractions of a saline extract of Taenia saginata proglottids. Vet. Immunol. Immunopathol. 1: 361.
106. Geerts, S., Vervoot, T., Kumar, V. y Ceulemans, F. (1981) Isolation of fraction No. 10 from Taenia saginata and evaluation of its specificity for the diagnosis of bovine cysticercosis. Z. Parasitenkd. 66: 201.
107. Siebert, A., Blitz, R., Morita, C. y Good, A. (1981) Taenia crassiceps: serum and surface immunoglobulins in metacestode infections of mice. Exp. Parasitol. 51.
108. Campbell, D. (1938) The specific protective property of serum from rats infected with Cysticercus crassicolis. J. Immunol. 35: 195.
109. Kwa, B. y Liew, F. (1978) Studies on humoral immunity against Taenia taeniaeformis infection in rats. J. Helmitol. 52: 99.
110. Mitchell, G.F., Goding, J. y Rickard, M. (1977) Studies on immune responses to larval cestodes in mice. Increased susceptibility of certain mouse strains and hypothyroid mice to Taenia taeniaeformis and analysis of passive transfer of resistance with serum. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 55: 165.

111. Musoke, A.J. y Williams, J.F. (1975) Immunoglobulins associated with passive transfer of resistance to Taenia taeniaeformis in the mouse. *Immunology*. 28: 97.
112. Mitchell, G., Rajasekariah, G. y Rickard, M. (1980) A mechanism to account for mouse strain variation in resistance to the larval cestode, Taenia taeniaeformis. *Immunology*. 39: 481.
113. Williams, J., Engelkirk, P. y Lindsay, M. (1982) Mechanisms of immunity in rodent cysticercosis. En: "Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives". (Flisser, A., Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. Eds.). Academic Press (New York). Págs: 621-632.
114. Leid, R. y Williams, J. (1974) The immunological response of the rat to infection with Taenia taeniaeformis. II. Characterization of reaginic antibody and an allergen associated with the larval stage. *Immunology*. 27: 209.
115. Leid, R. y Williams, J. (1975) Reaginig antibody response in rabbits infected with Taenia pisiformis. *Int. J. Parasitol.* 5: 203.
116. Musoke, A., Williams, J. y Leid, R. (1978) Immunological response of the rat to infection with Taenia taeniaeformis. VI. The role of immediate hypersensitivity in resistance to infection. *Immunology*. 34: 565.
117. Musoke, A., Williams, J., Leid, R. y Williams, C. (1975) The immunological response of the rat to infection with T. taeniaeformis. IV. Immunoglobulins involved in passive transfer of resistance from mother to offspring. *Immunology*. 29: 845.
118. Lloyd, S. y Soulsby, E. (1978) The role of IgA immunoglobulins in the passive transfer of protection to Taenia taeniaeformis in the mouse. *Immunology*. 34: 939.
119. Lindsay, M. y Williams, J. (1980) IgE-containing mast cells in livers and intestines of rats infected with Taenia taeniaeformis. Abstract 50, Program and Abstract of the 55th Annual Meeting of the American Society of Parasitologists. 79 (citado en 113).
120. Lindsay, M. (1980) Immunoglobulin-containing cell populations in tissues of rats infected with Taenia taeniaeformis. Tesis de Maestría, Michigan State University. (Citado en 113).
121. Cook, R. y Williams, J. (1981) Pathology of Taenia taeniaeformis infection in the rat: gastrointestinal changes. *J. Comp. Pathol.* 91: 205.

122. Ansari, A. y Williams, J. (1981) The eosinophilic response of the rat to infection with Taenia taeniaeformis. J. Parasitol. 62: 728.
123. Lumsden, R. (1975) Surface ultrastructure and cytochemistry of parasitic helminths. Exp. Parasitol. 37: 267.
124. Rothman, A. (1959) The physiology of tapeworms correlated to structures seen with the electron microscope. J. Parasitol. 45 (Suppl.) 28.
125. Rothman, A. (1960) Ultramicroscopic evidence of absorptive function in cestodes. J. Parasitol. 46 (Suppl.) 10.
126. Rothman, A. (1963) Electron microscopy studies of tapeworms: the surface structures of Hymenolepis diminuta (Rudolphi, 1819) Blanchard, 1891. Transactions of the American Microscopical Society. 82: 22.
127. Mukherjee, T. y Williams, A. (1967) A comparative study of the ultrastructure of microvilli in the epithelium of small and large intestine of mice. J. Cell. Biol. 34: 447.
128. Sheffield, H. (1964) Electron microscope studies on the intestinal epithelium of Ascaris suum. J. Parasitol. 50: 365.
129. Willms, K. y Merchant, M. (1980) The inflammatory reaction surrounding Taenia solium larvae in pig muscle: ultrastructural and light microscopic observations. Parasite Immunol. 2: 261.
130. Willms, K., Merchant, M., Arcos, L., Sealey, M., Díaz, S. y Díaz de León, L. (1980) Immunopathology of cysticercosis. En: "Molecules, Cells and Parasites in Immunology". (C. Larralde, K. Willms, L. Ortíz-Ortíz y M. Sela, Eds.). Academic Press (New York). Págs: 145-162.
131. Willms, K., Merchant, M., Díaz, S. y Arcos, L. (1982) Host-parasite interface in the metacestode of Taenia solium. En: "Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives". (Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. Eds.). Academic Press (New York). Págs: 397-411.
132. Sosa, A., Girón, H., Alva, S. y Calzada, L. (1977) Presence and nature of a glycocalix-like coat on the external vesicular membrane of Cysticercus cellulosae: A high resolution histochemical study. Life Sci. 21: 1021.
133. Pappas, P. y Read, L. (1975) Membrane transport in helminth parasites. Exp. Parasitol. 37: 469.



134. Hammerberg, B., Dangler, C. y Williams, J. (1980) Taenia taeniaeformis: chemical composition of parasite factors affecting coagulation and complement cascades. J. Parasitol. 66: 569.
135. Hammerberg, B. y Williams, J. (1978) Physicochemical characterization of complement-interacting factors from Taenia taeniaeformis. J. Immunol. 120: 1039.
136. Letonja, T. y Hammerberg, B. (1983) Third component of complement, immunoglobulin deposition, and leucocyte attachment related to surface sulfate on larval Taenia taeniaeformis. J. Parasitol. 69: 637.
137. Oaks, J. y Lumsden, R. (1971) Cytological studies on the absorptive surfaces of cestodes V. Incorporation of carbohydrate containing macromolecules into tegument membranes. J. Parasitol. 57: 1256.
138. Lumsden, R. (1966) Cytological studies on the absorptive surfaces of cestodes II. The synthesis and intracellular transport of protein in the strobillar integument of Hymenolepis diminuta. Z. Parasitenkd. 28: 1.
139. Oaks, J. (1970) The functional morphology of integuments of parasitic and free living platyhelminths. Ph.D. Dissertation, Tulane University. (Citado en 137).
140. Bonneville, M. y Weinstock, M. (1970) Brush border development in the intestinal absorptive cells of Xenopus during metamorphosis. J. Cell. Biol. 44: 151.
141. Keenan, T. y Moore, D. (1970) Phospholipid class and fatty acid composition of Golgi apparatus isolated from rat liver and comparison with other cell functions. Biochemistry. 9: 19.
142. Ito, S. (1969) Structure and function of the glycocalix. Fed. Proc. 28: 12.
143. Willms, K. y Arcos, L. (1977) Taenia solium: host serum proteins on the cysticercus surface identified by an ultrastructural immunoenzyme technique. Exp. Parasitol. 43: 396.
144. Kwa, B. y Liew, F. (1978) Studies on the mechanisms of long term survival of Taenia taeniaeformis in rats. J. Helminthol. 52: 1.
145. Befus, A. (1977) Hymenolepis diminuta and H. microstoma: mouse immunoglobulins binding to the tegumental surface. Exp. Parasitol. 41: 242.

146. Threadgold, L. y Befus, A. (1977) Hymenolepis diminuta: Ultrastructural localization of immunoglobulin-binding sites on the tegument. *Exp. Parasitol.* 43: 169.
147. Mitchell, G., Marchalonis, J., Smith, P., Nicholas, W. y Warner, N. (1977) Studies on immune responses to larval cestodes in mice. Immunoglobulins associated with the larvae of Mesocestoides corti. *Aust. J. Exp. Biol. and Med. Sci.* 55: 187.
148. Sogandares-Bernal, F. y Voge, M. (1978) Immunoglobulins on the surfaces of tetrathyridia of Mesocestoides corti. *Hoeppli 1925 (Cestoda)*, from laboratory infections of ICR mice. *J. Parasitol.* 64: 620.
149. Siebert, A., Good, A. y Simmons, J. (1978) Ultrastructural aspects of early immune damage to Taenia crassiceps metacestodes. *Int. J. Parasitol.* 8: 39.
150. Siebert, A. y Good, A. (1979) Taenia crassiceps: Effect of normal and immune serum on metacestodes in vitro. *Exp. Parasitol.* 48: 164.
151. Siebert, A. y Good, A. (1980) Taenia crassiceps: Immunity to metacestodes in BALB/c and BDF1 mice. *Exp. Parasitol.* 50: 437.
152. Correa, D. (1982) Elementos del sistema inmunológico en la superficie de cisticercos extirpados del ser humano. Tesis de Licenciatura. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
153. Díaz, S. (1983) Síntesis de anticuerpos en la reacción inflamatoria al cisticerco de la Taenia solium en el músculo porcino. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, UNAM.
154. Hopkins, C., Law, L. y Threadgold, L. (1978) Schistocephalus solidus: Does pinocytosis occur in the plerocercoid tegument? *Exp. Parasitol.* 44: 161.
155. Threadgold, L. y Hopkins, L. (1981) Schistocephalus solidus: Pinocytosis by the tegument. *Exp. Parasitol.* 51: 444.
156. Threadgold, L. (1984) Parasitic Platyhelminths. En: "Biology of the integument. 1. Invertebrates". (Bereiter-Hahn, J., Matoltsy, A. y Sylvia, K. Eds.). Springer-Verlag (Berlin). Págs. 132-191.
157. Singh, B. y Rao, B. (1967) On the development of Cysticercus fasciolaris in albino rat liver and its reaction on the host tissue. *Ceylon Vet. J.* 15: 121.

158. Cook, R., Trapp, A. y Williams, J. (1981) Pathology of Taenia taeniaeformis infection in the rat: hepatic, lymph node and thymic changes. J. Comp. Path. 90: 219.
159. Lewert, R. y Lee, C. (1955) Studies on the passage of helminth larvae through host tissues. III. The effects of Taenia taeniaeformis on the rat liver as shown by histochemical techniques. J. Infect. Dis. 97: 177.
160. Banerjee, D. y Singh, K. (1969) Studies on Cysticercus fasciolaris. III. Histopathology and histochemistry of rat liver in cysticerciasis. Ind. J. Anim. Sci. 39: 242.
161. Siebert, A., Good, A. y Simmons, J. (1979) Ultrastructural aspects of the host cellular immune response to Taenia crassiceps metacestodes. Int. J. Parasitol. 9: 323.
162. Askenase, P. (1977) Role of basophils, mast cells and vasoamines in hypersensitivity reactions with a delayed time course. Prog. in Allerg. 23: 199.
163. Butterworth, A., Taylor, D., Veith, M., Vadas, M., Dessein, A., Sturrock, R. y Wells, E. (1982) Studies on the mechanisms of immunity in human schistosomiasis. Immunol. Rev. 61: 5.
164. Capron, A., Dessaint, J., Capron, M., Joseph, M. y Torpier, G. (1982) Effector mechanisms of immunity to schistosomes and their regulation. Immunol. Rev. 61: 41.
165. Mackenzie, C. (1980) Eosinophil leucocytes in filarial infections. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74 (Suppl.): 51.
166. Osborn, P., Heath, D. y Roberts, M. (1982) Vaccination of sheep against Taenia ovis. The response to various dose rates of antigens obtained by incubation of oncospheres "in vitro". Res. Vet. Sci. 32: 351.
167. Rickard, M. (1982) Immunization against infection with larval taeniid cestodes using oncospherical antigens. En: "Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives". (Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. Eds.). Academic Press (New York). Págs: 633-646.
168. Rickard, M. y Williams, J. (1982) Hydatidosis/cysticercosis: Immune mechanisms and immunization against infection. Adv. Parasitol. 21: 229.

169. Plancarte, A., Flisser, A. y Larralde, C. (1982) Fibronectin-like properties of antigen B from cysticerci of Taenia solium. En: "Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives". (Flisser, A., Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. Eds.). Academic Press (New York). Págs: 453-463.
170. Plancarte, A., Flisser, A. y Larralde, C. (1983) Fibronectin properties in antigen B from the cysticercus of Taenia solium. *Cytobios.* 36: 83.
171. Lehninger, A. (1983) Principles of Biochemistry (3a. Ed.). Worth Publishers Inc. (New York). Pág: 277.
172. Winzler, R. (1970) Carbohydrates in cell surfaces. *Int. Rev. Cyt.* 29: 77.
173. Ramírez-Bon, E., Merchant, M., González, M. y Cañedo, L. (1982) Ultrastructure of the bladder wall of the metacestode of Taenia solium. En: "Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives". (Flisser, A., Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. Eds.). Academic Press (New York). Págs: 261-279.
174. Bittigen, H. y Schnebli, H. (1976) Concanavalin A as a Tool. John Wiley & Sons (London). Pág: 5.
175. Guerra, G., Flisser, A., Cañedo, L. y Laclette, J.P. (1982) Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of Taenia solium. En: "Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives". (Flisser, A., Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. Eds.). Academic Press (New York). Págs: 437-451.
176. Hartree, E. (1972) Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 48: 422.
177. Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. y Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350.
178. Mendel-Hartvig, I. (1982) A simple and rapid method for the isolation of peptides from sodium dodecyl sulfate-containing polyacrylamide gels. *Ann. Biochem.* 121: 215.
179. Bolton, A. y Hunter, W. (1973) The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a  $I^{125}$ -containing acylating agent. Application to the radioimmunoassay. *Biochem. J.* 133: 529.

180. Marchalonis, J. (1969) An enzymatic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. *Biochem. J.* 133: 299.
181. Payne, J. (1976) Electrophoresis of proteins on sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gels. En: "Chromatographic and electrophoretic techniques. Vol. II: Zone Electrophoresis". (I. Smith, Ed.) Year Book Medical Publications (Chicago). Págs: 321-346.
182. Fairbanks, G., Stack, T. y Wallach, D. (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry.* : 2606.
183. Leaback, D., y Rutter, A. (1968) Polyacrylamide-isoelectric-focusing: A new technique for the electrophoresis of proteins *B.B.R.C.* 32: 447.
184. March, S., Parikh, I. y Cuatrecasas, P. (1971) A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Anal. Biochem.* 60: 149.
185. Woessner, J. (1961) The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this aminoacid. *Arch. Bioch. Biophys.* 93: 440.
186. Garvey, J., Cremer, N. y Susdorf, D. (1977) *Methods in immunology* (3a. Ed.). W.A. Benjamin, Inc. Publ. (Massachusetts). Págs: 215-226.
187. Sober, H., Gutter, F., Wychoff, M. y Peterson, E. (1956) Chromatography of proteins. II. Fractionation of serum proteins on anion-exchange cellulose. *J. Am. Chem. Soc.* 78: 756.
188. Ouchterlony, D. (1968) *Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis.* Ann Arbor Science Publ. (Ann Arbor). 132 págs.
189. Tsang, V., Peralta, J. y Simmons, R. (1983) Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods in Enzymology.* 92: 377.
190. Weller, T. y Coons, A. (1954) Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86: 789.
191. Thompson, R. (1977) *Techniques in clinical immunology.* Blackwell Scientific Publ. (Oxford). Págs: 85-115.

192. Nakane, P. y Pierce, G. (1966) Enzyme labelled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.* 14: 929.
193. Karnovsky, M. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 27: 137A.
194. Caro, L. y Van Tubergen, R. (1962) High-resolution autoradiography. I. Methods. *J. Cell. Biol.* 15: 173.
195. Caro, L. (1962) High-resolution autoradiography. II. The problems of resolution. *J. Cell. Biol.* 15: 189.
196. Reynolds, E. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17: 208.
197. Bachman, L. y Salpeter, M. (1964) Autoradiography with the electron microscope. A procedure for improving resolution, sensitivity and contrast. *J. Cell. Biol.* 22: 469.
198. Rogers, A. (1969) Techniques in autoradiography. Elsevier Publ.Co. (Amsterdam). Págs: 109-115.
199. Guerra, G., Cañedo, L. y Rojkind, M. (1976) Proteins of Cysticercus cellulosae. En: "Biochemistry of parasites and host-parasites relationships". (H. van den Bossche Ed.). Elsevier-North Holland. Biomedical Press (Amsterdam). Págs: 109-115.
200. Sumner, J. (1944) A method for the colorimetric determination of phosphorus. *Science.* 100: 413.
201. Pande, H. y Shively, J. (1982) NH<sub>2</sub>-terminal sequences of DNA-heparin-, and gelatin-binding tryptic fragments from human plasma fibronectin.
202. Engval, E. y Ruoslahti, E. (1977) Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *Int. J. Cancer.* 20: 1.
203. Sober, H. (1976) Handbook of Biochemistry, Selective Data for Molecular Biology, Section C. (3a. Ed.) Chemical Rubber Co. (Cleveland).
204. Pharmacia Fine Chemicals. (1980) Gel Filtration: Theory and Practice. Pharmacia Fine Chem A.B. (Upsala). Pág. 9.

205. Cann, J.R. (1962) Electrophoresis. En: "Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry". (S.J. Leach. Ed.). Parte A. Academic Press (New York). Págs: 396-450.
206. Alexander, S., Colonna, G., Yamada, K., Pastan, I. y Edelhoch, H. (1978) Molecular properties of a major cell surface protein from chick embryo fibroblasts. J. Biol. Chem. 253: 5820.
207. Kleinman, H., McGoodwin, E., Martin, G., Kebe, R., Fietzek, P. y Woolley, D. (1978) Localization of the binding site for cell attachment in the  $\alpha 1(I)$  chain of collagen. J. Biol. Chem. 253: 5642.
208. Hahn, L. y Yamada, K. (1979) Identification and isolation of a collagen-binding fragment of the adhesive glycoprotein fibronectin P.N.A.S., USA. 76: 1160.
209. Sekiguchi, K. y Hakomori, S. (1980) Functional domain structure of fibronectin. P.N.A.S., USA. 77: 2661.
210. Ruoslahti, E., Engvall, E. y Hayman, G. (1981) Fibronectin: Current concepts of its structure and functions. Coll. Res. 1: 129.
211. McDonagh, J. (1981) Fibronectin, a molecular glue. Archs. Path. Lab. Med. 105: 393.
212. Yamada, K. y Olden, K. (1978) Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. Nature. 275: 179.
213. Pearlstein, E., Gold, L. y García-Pardo, A. (1980) Fibronectin: A review of its structure and biological activity. Mol. Cell. Bioch. 29: 103.
214. Mosher, D. (1980) Fibronectin. En: "progress in Hemostasis and Thrombosis". (Spaet, T. Ed.). Grune and Stratton Inc. (New York) Vol. 5. Págs: 111-151.
215. Mosesson, M. y Amrani, D. (1980) The structure and biologic activities of plasma fibronectin. Blood. 56: 145.
216. Klebe, R. (1974) Isolation of a collagen-dependent cell attachment factor. Nature. 250: 248.
217. Grinnell, F., Hays, D. y Minter, D. (1977) Cell Adhesion and spreading factor. Partial purification and properties. Exp. Cell. Res. 110: 175.

218. Pearlstein, I. y Gold, L. (1978) High-molecular-weight glycoprotein as a mediator of cellular adhesion. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 312: 278.
219. Grinnell, F. y Hays, D. (1978) Cell adhesion and spreading factor: Similarity to cold insoluble globulin in human serum. *Exp. Cell. Res.* 115: 221.
220. Grinnell, F., Feld, M. y Minter, D. (1980) Fibroblast adhesion to fibrinogen and fibrin substrata: Requirement for cold insoluble globulin (plasma fibronectin). *Cell.* 19: 517.
221. Hynes, R., Ali, V., Destree, A. et al. (1978) A large glycoprotein lost from the surfaces of transformed cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 312: 317.
222. Vaheri, A., Alitalo, K., Hedman, K. et al. (1978) Fibronectin and the pericellular matrix of normal and transformed adherent cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 312: 343.
223. Chen, L., Burridge, K., Murray, A. et al. (1978) Modulation of Cell Surface Glycocalix: Studies on large, external, transformation-sensitive protein. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 312: 366.
224. Yamada, K., Yamada, S. y Pastan, I. (1977) Quantification of a transformation-sensitive adhesive cell surface glycoprotein. *J. Cell. Biol.* 74: 649.
225. Eagle, H. (1955) Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science.* 122: 501.
226. Vuento, M. (1979) Hemagglutinin activity of human plasma fibronectin. *Physiol. Chem.* 360: 1327.
227. Olivo, A. (1983) Presencia del antígeno B del cisticerco de la Taenia solium en otros helmintos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
228. Vik, R. (1981) Evolution in cestodes. *Parasitology.* 82: 63.
229. Morris, S. (1981) Parasites and the fossil record. *Parasitology.* 82: 489.
230. Mackiewicz, J. (1982) Parasitic platyhelminth evolution and systematics: Perspectives and advances since ICOPA IV. En: "Parasites, their World and Ours". (Mettrick, D. y Desser, S. Eds.). Elsevier Biomedical Press. Págs: 179- 188.



231. Brooks, D. (1982) Higher level classification of parasitic platyhelminthes and fundamentals of cestode classification. En: "Parasites, their World and Ours". (Mettrick, D. y Dessler, S. Eds.). Elsevier Biomedical Press (Amsterdam). Págs: 189-193.
232. Espinoza, B., Ruiz Palacios, G. y Flisser, A. (1984) Diagnóstico de la neurocisticercosis por una técnica inmunoenzimática. *Bioquímica*. 36: 1387.
233. Plancarte, A., Landa, A., Arcos, L., Flisser, A. y Laclette, J.P. (1984) Técnicas inmunoenzimáticas en papel de nitrocelulosa. *Bioquímica*. 36: 1401.
234. Bray, D. y Brownlee, S. (1973) Peptide mapping of protein from acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 55: 213.
235. Suzuki, T., Benesch, R., Yung, S. y Benesch, R. (1973) Preparative isoelectrofocusing of CO hemoglobins on polyacrylamide gels and conversion to their oxy forms. *Anal. Biochem.* 55: 249.
236. Ziola, B. y Scraba, D. (1976) Recovery of SDS-proteins from polyacrylamide gels by electrophoresis into hydroxyl apatite. *Anal. Biochem.* 72: 366.
237. Karsnas, P. y Roos, P. (1977) Two methods for electrophoretic elution of proteins from polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 77: 168.
238. Hanaoka, F., Shaw, J. y Muller, G. (1979) Recovery of functional proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 99: 170.
239. Hager, D. y Burgess, R. (1980) Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate, and renaturation of enzymatic activity. *Anal. Biochem.* 109: 76.
240. Otto, M. y Snejdarkova, M. (1981) A simple and rapid method for the quantitative isolation of proteins from polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 111: 111.
241. Esch, G. (1964) Comparative carbohydrate metabolism of adult and larval Multiceps serialis. *J. Parasitol.* 50: 72.
242. Chordi, A. y Kagan, I. (1965) Identification and characterization of antigenic components of sheep hydatid fluid by immunoelectrophoresis. *J. Parasitol.* 51: 63.

243. Varela-Díaz, V. y Coltorti, E. (1973) The presence of host immunoglobulins in hydatid cyst membranes. *J. Parasitol.* 59: 484.
244. Esch, G. y Kuhn, E. (1971) The uptake of C<sup>14</sup>-chlorella protein by larval Taenia crassiceps. *Parasitology.* 62: 27.
245. Pappas, P. y Read, C. (1973) Permeability and membrane transport in the larva of Taenia crassiceps. *Parasitology.* 66: 33.
246. Hustead, S. y Williams, J. (1977) Permeability studies on taeniid metacestodes: I. Uptake of proteins by larval stages of Taenia taeniaeformis, T. crassiceps and Echinococcus granulosus. *J. Parasitol.* 63: 314.
247. Hustead, S. y Williams, J. (1977) Permeability studies on taeniid metacestodes: II. Antibody-mediated effects on membrane permeability in larvae of Taenia taeniaeformis and Taenia crassiceps. *J. Parasitol.* 63: 322.
248. Slais, J. (1970) The Morphology and Pathogenicity of the Bladder Worms Cysticercus cellulosae and Cysticercus bovis. The Hague-Academia (Prague). 144 págs.