178
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGIA

INHIBICION DEL COMPLEMENTO POR EL ANTIGENO B DEL CISTICERCO DE Taenia solium

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A :
MARIA MIRELLA RODRIGUEZ SANCHEZ

MEXICO, D. F. 1988

UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

Los resultados presentados en esta tesis pretenden mejorar nuestra comprensión acerca del papel que juega el antigeno B (AgB) en el mantenimiento de la relación huésped-cisticerco. En este trabajo se presenta evidencia que demuestra que el antígeno B del cisticerco de Taenia solium inhibe la cascada del complemento.

Se describen dos procedimientos de afinidad, útiles para la purificación del AgB. El primero de ellos aprovecha la propiedad del AgB de interaccionar con colágena. Este método de purificación, que utiliza un "algodón" de colágena de tendón bovino, resultó ser rápido, sencillo y de bajo costo. El segundo de ellos consiste en una cromatografía de afinidad convencional, que utiliza anticuerpos monoclonales anti-AgB. El análisis bioquímico e inmunológico de las fracciones obtenidas por ambos procedimientos mostró que el AgB constituye más de 85% de la proteína en la fracción obtenida con la colágena y más del 95% en la fracción obtenida por cromatografía de afinidad.

El AgB purificado por los dos métodos fue empleado en ensayos de Fijación de Complemento en eritrocitos de carnero sensibilizados con hemolisina. Como fuente de complemento se utilizó suero humano normal preadsorbido con los mismos eritrocitos y preincubado a 50°C durante 20 min para inactivar la vía alterna. Los resultados mostraron una disminución en la actividad de complemento en el suero, que variaba en relación inversa con la concentración de AgB utilizada. Asimismo ensayos de inmunoelectroforesis utilizando anticuerpos anti-Factor B mostraron que el AgB, al ser preincubado con suero humano normal, sin inactivar, no induce consumo de complemento. Es decir, que la disminución en la actividad de complemento inducida por el AgB se debe a una inhibición sobre la vía clásica.

Ensayos de ELISA en los cuales se adsorbió C1q a la placa y después se incubó con AgB, mostraron que el AgB interacciona con C1q. Esto sugiere que la cascada del complemento es inhibida a través de un bloqueo sobre C1q.

El AgB parece jugar un papel central en la relación huésped-cisticerco, ya que además de desviar una porción considerable de la respuesta inmune humoral hacia una proteína de secreción, parece inhibir un mecanismo efector del huésped cisticercoso: el Complemento.

INDICE

		página
	CLASIFICACION TAXONOMICA	1
Capitulo I	INTRODUCCION	
	CICLO DE VIDA DE LA Taenia solium	2
	MORFOLOGIA DEL CISTICERCO	6
	DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LA CISTICERCOSIS HUMANA EN MEXICO	6
	FRECUENCIA E IMPACTO ECONOMICO DE LA CISTICERCOSIS PORCINA EN MEXICO	8
	SINTOMATOLOGIA DE LA CISTICERCOSIS HUMANA	12
	SINTOMATOLOGIA DE LA CISTICERCOSIS PORCINA	14
Capitulo II	ANTECEDENTES	
	COMPOSICION ANTIGENICA DEL CISTICERCO	15
	CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS E INMUNOLOGICAS DEL ANTIGENO B (AgB)	15
	PAPEL DEL AgB EN LA RELACION HUESPED-CISTICERCO	17
	OBJETIVO	18
Capitulo III	MATERIALES Y METODOS	
	REACTIVOS QUIMICOS	19
	MATERIALES BIOLOGICOS	19
	METODOS Obtención de los extractos crudos de cisticercos.	20
	Purificación de AgB utilizando colágena de tendón bovino	20
	Purificación de AgB por cromatografía de afinidad.	23

		Purificación de colágena soluble a partir de piel de cobayo	24
		Purificación de colágena polimérica de tendón bovino	24
		Acoplamiento de colágena a sepharosa 4B	25
		Acoplamiento de anticuerpos monoclonales anti-AgB a sepharosa 4B	25
		Determinación del contenido de hidroxiprolina	26
		Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)	26
		Determinación de la concentración de proteinas	26
		Inmunoelectroforesis	26
		Inmunoelectrotransferencia	27
		Obtención de suero humano	28
		Preparación de sueró tratado con Zymosan	28
		Obtención de eritrocitos de carnero	29
		Ensayos de fijación de complemento	29
		Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA)	34
Capítulo IV	RESULTADOS		
		PURIFICACION DEL AgB	36
		ANALISIS INMUNOLOGICO DE LAS FRACCIONES PURIFICADAS	39
		INHIBICION DE LA CASCADA DEL COMPLEMENTO	43
		INTERACCION AgB-C1q	46
Capítilo V	DISCUSION		48
	BIBLIOGRAFIA		54
	APENDICE		60

CLASIFICACION TAXONOMICA

REINO: ANIMALIA

SUBREINO: METAZOA

PHYLUM: PLATYHELMINTES

CLASE: CESTODA

ORDEN: CICLOPHYLLIDEA

SUPERFAMILIA: TAENOIIDEA

FAMILIA: TAENIDAE

GENERO: TAENIA

ESPECIE: solium

ETAPA LARVARIA: CISTICERCO

I. INTRODUCCION

La cisticercosis constituye un serio problema de salud pública y de economía en el mercado e industria de alimentos elaborados con carne de cerdo en México y en otros países subdesarrollados en el mundo (1-4).

El metacéstodo o cisticerco de Taenia solium es el parásito causante de la cisticercosis humana y porcina. El cisticerco es un estadio intermedio en el desarrollo que sigue el embrión para convertirse en gusano adulto o solitaria. Como el hombre es el único huésped definitivo de la T. solium, la prevalencia de la teniasis-cisticercosis depende exclusivamente de la relación que el hombre establece con los animales y en particular con el cerdo.

CICLO DE VIDA

Las tenias son parásitos intestinales de los vertebrados. Sus ciclos de vida incluyen uno o más huéspedes intermediarios, los cuales pueden ser artrópodos o vertebrados. La figura 1 muestra el ciclo de vida de Taenia solium, las formas intermedias en su desarrollo son: la oncosfera que eclosiona del huevecillo y una fase de cisticerco o metacéstodo (5) T. solium en su forma adulta es un parásito obligado que habita en el intestino delgado del hombre, en donde logra sobrevivir hasta por 25 años (6) y puede alcanzar una longitud de hasta 7 metros. 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 (fig. 2). El conjunto de proglótidos unidos entre sí en forma de cadena se denomina estróbilo. Los proglótidos unidos al cuello son los mas jóvenes e indiferenciados y los más distales no

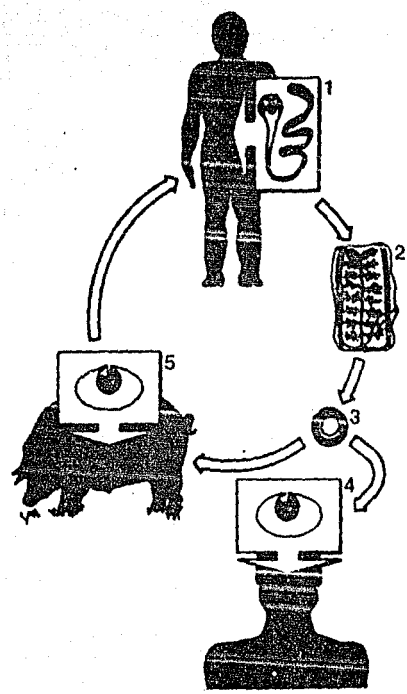


Fig. 1 Ciclo de vida de la Taenia solium: 1) Parásito adulto; 2) Proglótido grávido; 3) Huevecillo; 4 y 5) Cisticercos. (tomado de la ref. 20).

Fig. 2 Micrografía electrónica de barrido de un escólex de T. solium. C: cuello; V: ventosas y R: rostelo. (tomada de la ref. 19.)

solo están totalmente diferenciados sino que además contienen un gran número de huevecillos (aprox. 50,0000 c/u). Los proglótidos maduros o grávidos son desprendidos espontáneamente por el gusano adulto (promedio 4-5/dia) (6) y son eliminados 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 (7), cuando la tenia mide alrededor de 2.20 m de largo (6).

La descomposición de los proglótidos en el medio ambiente permite la liberación de los huevecillos, los cuales pueden infectar al huésped intermediario (cerdo o incluso el hombre) por ingestión directa de las heces de un teniásico o por ingestión de agua o vegetales contaminados con huevecillos.

Las enzimas proteoliticas y sales biliares del tubo digestivo del huésped intermediario, activan a la oncosfera contenida en el huevecillo (8). Las oncosferas activadas penetran la pared intestinal del huésped hasta alcanzar capilares linfáticos y sanguineos que las distribuyen a una gran variedad de órganos y tejidos (tejido subcutáneo, vísceras, músculos cardiaco y esquelético, cerebro, ojos, etc.). Se sabe que el embrión requiere al menos de 10 semanas para convertirse en un cisticerco (1) que puede sobrevivir por varios años en los tejidos del huésped intermediario.

El ciclo se cierra cuando el hombre ingiere carne de cerdo cruda o mal cocida proveniente de un cerdo cisticercoso. De nuevo las enzimas gástricas e intestinales, así como las sales biliares activan al cisticerco que se fija en la pared intestinal (8). Una vez fijo el gusano crece y se diferencia hasta convertirse en un gusano adulto productor de huevecillos (9-10).

MORFOLOGIA DEL CISTICERCO.

El cisticerco de T. solium está formado por una vesícula ovalada y translúcida llena de líquido (hasta 2 cm de diámetro), con un pequeño escólex invaginado (fig. 3). Al igual que el de la tenia adulta, el escólex del cisticerco posee cuatro ventosas y un rostelo con dos hileras de ganchos. Cuando un cisticerco viable es ingerido por el huésped definitivo, las enzimas gástricas e intestinales activan al escólex para evaginar de la vesícula y posteriormente fijarse a la pared intestinal.

La superficie que presenta el cisticerco a su huésped es un tegumento citoplasmático, 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 desechos a través de la superficie tegumental (11).

La superficie del cisticerco en contacto con el huésped es una membrana plasmática que como tal debiera ser susceptible al daño por los diversos mecanismos de defensa del huésped, como son el complemento, células efectoras compuestos tóxicos, etc. Sin embargo, a pesar de que el huésped monta una respuesta inmunológica específica, la superficie del parásito no sufre daño aparente, al menos durante ciertos períodos (12-14).

DISTRIBUCION GEOGRAFICA Y PREVALENCIA DE LA CISTICERCOSIS HUMANA EN MEXICO.

La mayoría de los estudios estadísticos disponibles se refieren principalmente a la neurocisticercosis, pues es en esta localización en donde el parásito produce las manifestaciones más graves de la enfermedad.

La prevalencia de la neurocisticercosis ha sido estimada en alrededor del 2% por estudios de autopsias en distintas instituciones hospitalarias (15,16).

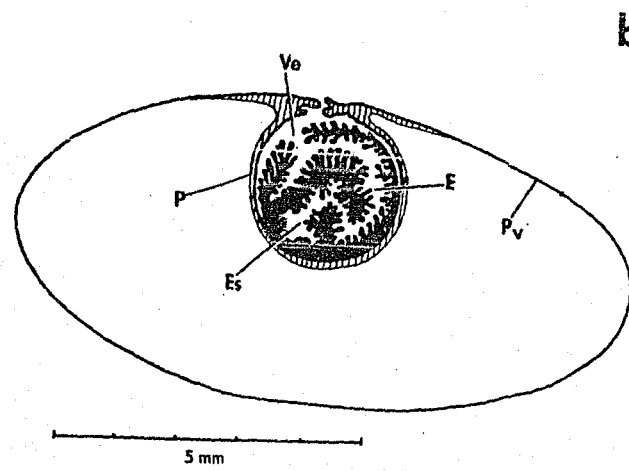


Fig. 3 a) Cisticercos expuestos en un corte de músculo esquelético de un cerdo infectado masivamente; b) Representación esquemática de un corte de cisticerco mostrando las diferentes estructuras. (E: canal-espiral; Es: escólex; P: parénquima; Ve: vestíbulo; PV: pared vesicular) (tomada de la ref. 6).

Sin embargo, este porcentaje debe ser tomado con cautela puesto que la población de casos a los que se les practica la autopsia no es representativa de la población total del país. A su vez, algunos estudios seroepidemiológicos han demostrado la presencia de anticuerpos anti-cisticerco en el 1-3.8% de los sueros de la población abierta en México (17,18,20 y 43). Nuevamente, la presencia de anticuerpos solo demuestra que el individuo ha tenido contacto con el parásito y no necesariamente que esté infectado; es posible que la prevalencia real difiera considerablemente de los valores arriba mencionados (19). En estudios seroepidemiológicos (18,20) se reporta que existe una correlación entre la frecuencia de la seropositividad y las regiones geoeconómicas del país (Fig. 4). La más alta seropositividad se encuentra en los estados porcicultores más importantes como son Michoacán, Jalisco, Nayarit y Guanajuato.

FRECUENCIA E IMPACTO ECONOMICO DE LA CISTICERCOSIS PORCINA EN MEXICO.

La inspección sanitaria de los cerdos sacrificados en nuestro país, consiste en hacer un corte en el músculo para buscar visualmente los cisticercos. Cuando se encuentra un cerdo infectado se registra y se decomisa. El estudio más amplio realizado hasta la fecha es el de Aluja (21), quién reunió información de 75 rastros en 22 estados de la república durante los años 1980-1981 (Tabla 1). 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.). Estas cifras no son del todo confiables por las siguientes razones:

a) un gran número de cerdos sacrificados no se someten a inspección

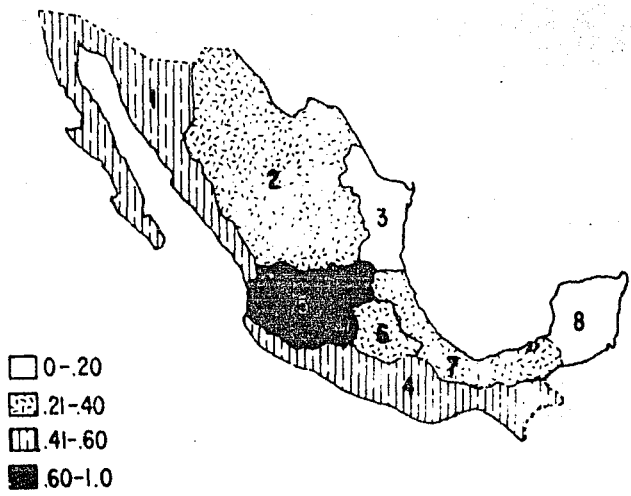


Fig. 4 Mapa geoeconómico de la República Mexicana indicando la frecuencia regional de anticuerpos anti-cisticercos. El area 5 tiene mayor porcentaje, seguida por las areas cercanas al Oceano Pacifico (tomada de la ref. 33).

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

Estado y localidad	Frecuencia (%)	Año	Fuente[a]
Aguascalientes			
Aguascalientes	0.52	1980	SSA
Campeche	sin registros disponibles		
Chihuahua			
Chihuahua TIF[b]	0.49	1980	SARH
Chihuahua	3.32	1980	M
	1.65	1981	M
Colima			
Colima, Villa Alvarez, 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[c]	1980	SARH
Morelos			
Cuernavaca	0.37	1980	SSA
Jojutla, Zacatepec, Tlalquiltengo, Puente 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[a]
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 21.

b) la inspección sanitaria se lleva a cabo bajo la supervisión de tres autoridades distintas, cada una con sus propios estándares y reglamentos: La Secretaría de Salud controla alrededor de 200 rastros en las grandes ciudades; la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidraúlicos controla los rastros que sacrifican animales para exportación; las autoridades municipales controlan los rastros de las localidades menores y

c) El método de inspección sanitaria que se utiliza no detecta a todos los cerdos cisticercosos.

En 1980 Acevedo-Hernández (22) estimó las pérdidas económicas debidas a la cisticercosis porcina. De acuerdo al censo nacional ganadero llevado a cabo el mismo año, 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, el autor calcula que las pérdidas debidas a decomiso ascendieron a 1,000 millones de pesos.

SINTOMATOLOGIA DE LA CISTICERCOSIS HUMANA.

Los pacientes cisticercosos caen en dos grandes categorías las cuales se pueden distinguir clínicamente: asintomáticos y sintomáticos. A su vez, los sintomáticos pueden subdividirse en cuatro grupos de acuerdo a la localización de los parásitos. El primer grupo incluye pacientes con parásitos distribuidos en las vísceras, piel y músculo (cisticercosis diseminada); el segundo grupo comprende a los que afectan los ojos (oftalmocisticercosis); el tercer grupo consiste en pacientes con larvas localizadas en el sistema nervioso central

cisticercos en mas de una de las anteriores localizaciones (cisticercosis mixta) (23).

En general la cisticercosis de localización externa al sistema nervioso central, puede considerarse como una enfermedad benigna. Los cisticercos localizados en el tejido subcutáneo son caracterizados únicamente por la presencia de nódulos y con frecuencia pasan desapercibidos (24). La presencia de cisticercos en músculo esquelético ha sido determinada en un pequeño número de casos. En infecciones masivas, los sintomas descritos son dolor muscular y debilidad (23). La infección en músculo cardiaco en algunos casos puede producir taquicardia, disnea, síncopes y ruidos cardiacos anormales (25,26). 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 (27,28), produciéndose respuestas inflamatorias que frecuentemente ocasionan la pérdida de la vista (29).

En el caso de la neurocisticercosis, 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 % (30). De acuerdo a los autores, el 81 % de los individuos neurocisticercosos nunca presentaron sintomas de alteraciones neurológicas. En cambio en un estudio similar de 9412 autopsias, un 57% de los neurocisticercosos detectados habia mostrado sintomas relacionados con la presencia del parásito (31). Este segundo porcentaje coincide con el obtenido por Lombardo (32), a través de una revisión de pacientes neurológicos con tomografía axial computarizada. Tomando el porcentaje promedio entre los tres estudios, se tendria que un 45% de los pacientes neurocisticercosos son sintomáticos (19).

SINTOMATOLOGIA DE LA CISTICERCOSIS PORCINA.

La sintomatologia se puede considerar en general como leve. Asi, es frecuente que cerdos masivamente infectados sean detectados solo a través de inspección sanitaria. En algunos casos, la infección es tal que una porción considerable de la masa muscular está invadida por miles de parásitos, sin que el cerdo presente una sintomatologia clara. La diferencia entre la sintomatologia de la enfermedad en humanos y en cerdos podria deberse, al menos en parte, a la edad de la infección (19). Cabe hacer notar que los métodos actuales para la explotación de los cerdos impiden que los animales vivan más allá de los 9 meses, por lo que la edad de la infección es considerablemente menor que en la cisticercosis humana.

II. ANTECEDENTES

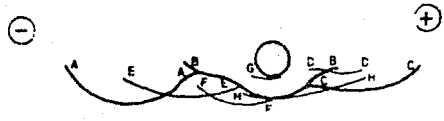
La presencia de uno o de varios cisticercos en los tejidos del huésped induce una respuesta inmune especifica que protege al huésped en contra de una segunda infección (2,4-7). Sin embargo, en la mayor parte de los casos los cisticercos ya establecidos no son afectados por la respuesta del huésped (37,38) logrando sobrevivir por largos periodos.

COMPOSICION ANTIGENICA DEL CISTICERCO.

La respuesta inmune de los humanos neurocisticercosos ha sido estudiada por inmunoelectroforesis (IEF) en la que se enfrenta un extracto crudo parasitario con los sueros de pacientes. La IEF permitió establecer una clasificación de los antígenos del cisticerco de acuerdo a su movilidad electroforética (34). De esta manera se han definido ocho antigenos del cisticerco, los cuales se han denominado con las primeras letras del alfabeto (fig 5). El antígeno isoeléctrico denominado como "B", resultó ser el más frecuentemente reconocido (84%) por anticuerpos en los sueros de pacientes que tenían niveles detectables por IEF, seguidos por los antigenos "A" (47%),"E" (35%), "C" (30%), etc. (34).

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS E INMUNOLOGICAS DEL ANTIGENO B (AgB)

El AgB ha sido aislado hasta un 95% de pureza (19) y ha sido parcialmente caracterizado. Se trata de una glicoproteína con 12 % de carbohidratos; constituida por dos cadenas polipeptídicas con pesos moleculares de 95,000 y 85,000 (39). Las dos cadenas presentan identidad antigénica cuando son



Frecuencia %
(116 sueros)

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

Fig. 5 Clasificación de los antígenos de Taenia solium en base a su migración en inmunoelectroforesis (tomada de la ref. 34).

enfrentadas con anticuerpos anti-B en un sistema de doble inmunodifusión (39). El análisis de aminoácidos mostró que el AgB está compuesto por proteínas poco comunes con respecto a su composición de aminoácidos (40). Las fracciones molares correspondientes a Lis, Arg, Glu y Asp, representan un 52% del contenido total, indicando que aproximadamente la mitad de los residuos pueden estar cargados (19).

La disponibilidad del AgB en forma pura ha permitido su utilización en el diseño de métodos de inmunodiagnóstico para neurocisticercosis. Resultados de ELISA (enzyme-linked-immuno sorbent assay) muestran que el uso de este antígeno permite detectar anticuerpos en el 80% y 88% de los sueros y líquidos cefalorraquídeos de pacientes neurocisticercosos, respectivamente (41). Estos porcentajes son similares a los que se obtienen cuando se utiliza un extracto crudo como fuente de antígenos.

PAPEL DEL AgB EN LA RELACION HUESPED-CISTICERCO.

Estudios de inmunofluorescencia muestran que el AgB tiene una amplia distribución en los tejidos del cisticerco, observándose la fluorescencia más intensa en las células tegumentales, lo cual sugiere que estas células son las responsables de su síntesis (42). Puesto que estas células son las encargadas de sintetizar los productos que posteriormente son enviados al tegumento, lo anterior también sugiere que se trata de un antígeno de superficie o de secreción. Resultados de experimentos de yodación de la superficie y de inmunoperoxidasa en microscopía electrónica apoyan la alternativa de que se trata de un antígeno de secreción (42).

La secreción del AgB es congruente con el hecho de que sea el antígeno más frecuentemente reconocido por los sueros de pacientes neurocisticercosos

(20,43), ya que un antigeno de secreción claramente entraria en contacto con el sistema inmune del huésped (19). La liberación de AgB hacia la respuesta inflamatoria que rodea al cisticerco es congruente con el hecho de que las células plasmáticas del granuloma sintetizan principalmente anticuerpos anti-B (37,44). El AgB secretado estimula al sistema inmune del huésped, que monta una respuesta especifica anti-B que es incapaz de dañar al cisticerco (19) puesto que está dirigida a un antigeno que se libera.

La capacidad del AgB para interaccionar con colágena (45,46), pudiera indicar que su participación en la relación huésped-cisticerco no termina con su secreción. Por ejemplo, el AgB pudiera alterar la via clásica del complemento (Apéndice 1) al interaccionar con el subcomponente C1q en su porción similar a colágena. Cabe mencionar que C1q forma parte del primer componente de la via clásica, el cual inicia la cascada al unirse con los complejos antigeno-anticuerpo.

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo de tesis consistió en determinar si el AgB altera de algún modo el funcionamiento del sistema de complemento. Un hallazgo en este sentido tendria implicaciones sobre nuestra comprensión de los mecanismos que permiten el mantenimiento de la relación huésped-cisticerco.

III. MATERIALES Y METODOS

REACTIVOS QUIMICOS.

La sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno, la albúmina sérica bovina (BSA), la hidroxiprolina, el barbiturato de sodio, el ácido dietilbarbitúrico, el zimosan, el etilendinitrilotreta acetato (EDTA), el p-hidroximercuribenzoato (PHMB), fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), el orto-fenilendiamino y el 1-4 cloronaftol fueron obtenidos de Sigma Chemical Company. La agarosa y todos los reactivos para la electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio fueron obtenidos de Bio-Rad Laboratories. El papel de nitrocelulosa de 0.45 um de diámetro fue obtenido de Schleicher and Schüel.

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

MATERIALES BIOLOGICOS

Los cisticercos de *T. solium* fueron obtenidos por disección de músculo esquelético de cerdos altamente infectados, provenientes de varios rastros oficiales de la ciudad de México y se almacenaron a -70°C hasta su uso. El suero de cerdo anti-AgB (anti-B) fue amablemente aportado por el M. en C. Agustín Plancarte y el suero humano fue amablemente donado por la Bióloga Lourdes Arcos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM,

La colágena de tendón bovino fue amablemente aportada por el Dr. Alfonso Torre Blanco de la Facultad de Ciencias, UNAM; los eritrocitos de carnero se obtuvieron de animales normales de la Facultad de Medicina Veterinaria y

Zootecnia, UNAM, la hemolisina (suero anti-eritrocitos) y los anticuerpos monoclonales anti-AgB fueron preparados en el laboratorio; el suero anti-Factor B se obtuvo de Atlantic Antibodies; el C1q del complemento fue obtenido de Sigma Chemical Co; la proteina A peroxidasa fué obtenida de Zymed Laboratories.

METODOS.

Obtención de los extractos crudos (EC) de cisticercos:

ECI: Los cisticercos recién descongelados fueron homogeneizados en un volumen de 5 ml de PBS/g de tejido húmedo, utilizando un homogeneizador Polytron a máxima potencia durante 1-2 min a 4°C. El homogeneizado que presentaba una apariencia lechosa fue aclarado por centrifugación a 100,000 g (Ultracentrifuga Beckman TL-100) durante 15 min a 4°C (19). Este extracto fue usado para la purificación del AgB utilizando colágena de tendón bovino.

ECII: Los cisticercos recién descongelados fueron homogeneizados en un volumen de 5 ml de una solución de extracción/g de tejido húmedo, en un homogeneizador Polytron a máxima potencia durante 1-2 min a 4°C. La solución de extracción contenía NaCl 0.45 M, EDTA 2.5 mM, 0.04% de PHMB y 0.006% de PMSF (solución A). El homogeneizado fue aclarado por centrifugación a 100,000 g (Ultracentrifuga Beckman TL-100) durante 15 min a 4°C (39). Este extracto fue usado para la purificación del AgB por cromatografia de afinidad.

Purificación del AgB utilizando colágena de tendón bovino:

El AgB se purificó a partir del ECI por medio de un método que aprovecha

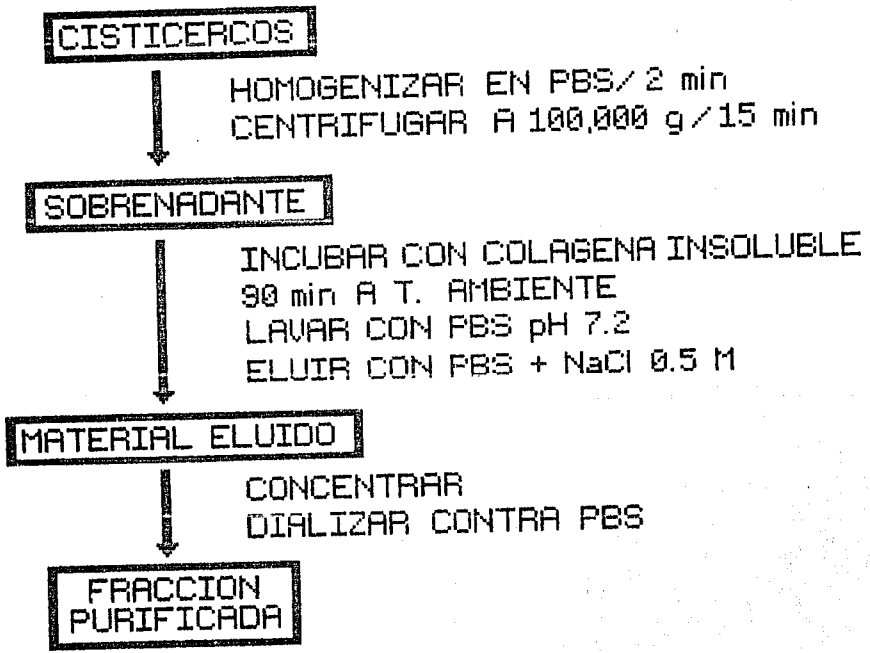


Fig. 6 Procedimiento de purificación del antígeno B utilizando colágena de tendón bovino.

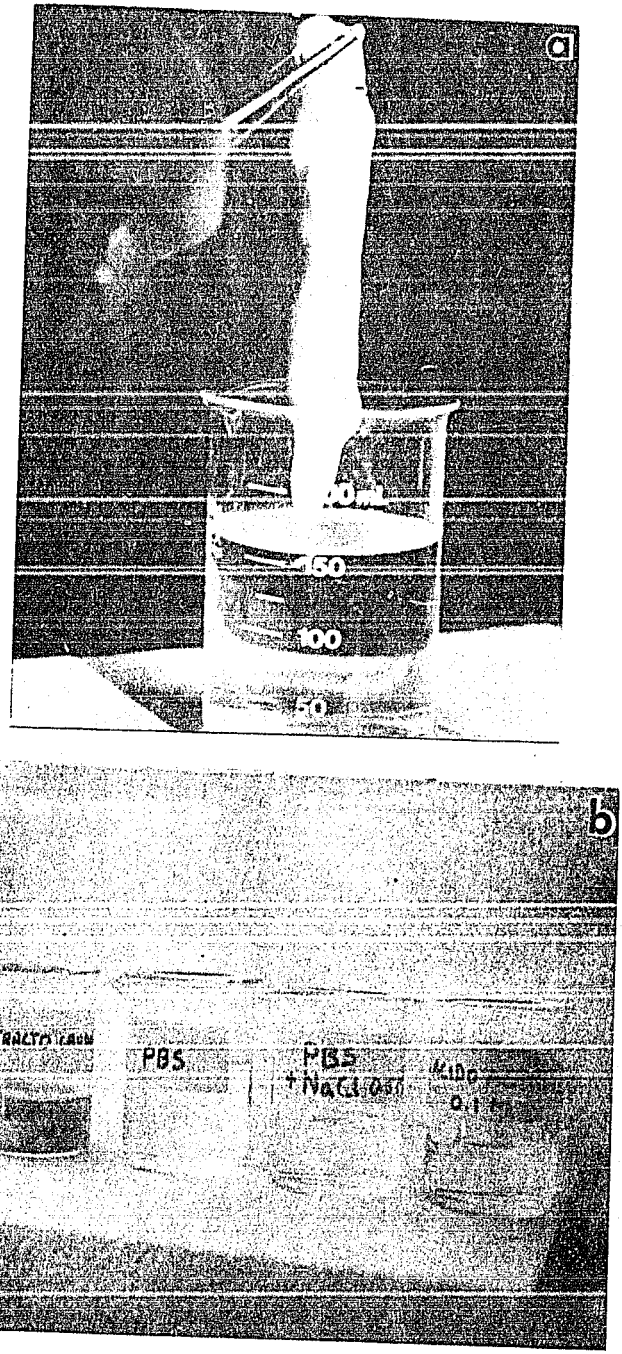


Fig. 7 a) Algodón de colágena insoluble de tendón bovino y b) Purificación del antigeno B del cisticerco de T. solium utilizando un algodón de colágena de tendón bovino. En la fotografía el algodón de colágena se encuentra incubándose con el extracto crudo (ECI).

su afinidad por colágena, un resumen del procedimiento se presenta en la figura 6. El método consiste en incubar el algodón de colágena (fig.7b) con 30 ml de EC con una concentración de proteína cercana a los 5 mg/ml, durante 90 min con agitación lenta y a temperatura ambiente. El material no unido a la colágena fue eluido con PBS hasta que la absorbencia a 280 nm en los lavados disminuia a un valor cercano a cero (aprox. 0.005). A su vez el material unido a la colágena fue eluido con un lavado con PBS al cual se le aumentó la concentración de NaCl (0.5 M). Ambas soluciones de lavado fueron concentrados en cámara de Amicon, usando una membrana Amicon PM 10,000, hasta obtener una concentración aproximada de 300 ug/ml y fueron dializados contra PBS.

Purificación del AgB por cromatografía de afinidad:

El AgB también fue purificado utilizando una columna de sepharosa 4B-anticuerpos monoclonales anti-AgB, equilibrada con la solución de extracción. La columna tenia un volúmen de cama de 5 ml de sepharosa 4B, conteniendo ~10 mg de anticuerpos monoclonales acoplados. Se pasaron 30 ml de EC II con una concentración de proteínas de 5 mg/ml a una velocidad de flujo de 30 ml por hora. El material no unido a la columna fue eluido con la misma solución hasta que la absorbencia a 280 nm de las fracciones colectadas tenia un valor cercano a cero (0.005). El material unido a la columna fue eluido aplicando un pulso de amortiguador de glicina-HCl 0.1 M pH 2.9. Se colectaron fracciones de 1 ml a las cuales se les determinó su absorbencia a 280 nm. La fracciones obtenidas en el único pico (fig. 11) fueron mezcladas y dializadas contra PBS, la proteina tenia una concentración aproximada de 150 ug/ml.

Purificación de colágena soluble a partir de piel de cobayo (47):

La piel de un cobayo, rasurada y cortada en pequeños trozos, se solubiliza en ac. acético 0.5 M a 4°C con agitación, durante toda la noche. El sobrenadante obtenido por centrifugación a 4,000 g se dializa contra una solución de fosfatos 20 mM; pH 9. El precipitado de esta diálisis se recupera centrifugando a 4,000 g, se resuspende en ac. acético 0.5 M a 4°C con agitación durante 24 Hr y se centrifuga a 150,000 g. Posteriormente, el sobrenadante se precipita con NaCl al 5% y el precipitado obtenido por centrifugación a 4,000 g se resuspende en ac. acético 0.5 M; se dializa contra una solución de fosfatos 0.15 M pH 7.3; se precipita con NaCl al 20% y se centrifuga a 4,000 g. El precipitado se resuspende nuevamente en ac. acético 0.5 M; se dializa contra ac. acético 0.15 M y se centrifuga a 150,000 g.

Purificación de colágena polimérica de tendón bovino (48):

El tendón fue limpiado de músculo y grasa adheridos y cortado en pequeños fragmentos. El material cortado fue deslipidizado empapándolo en acetona, y rehidratado con agua destilada y se dejó en una solución que contenía EDTA al 1% toda la noche a 4°C con agitación constante. El material lavado con agua destilada fue suspendido en 2 l de ácido acético 0.2 M, pH 2-3; homogeneizado con un Polytron (Brinkmann Instruments) a máxima potencia durante 20-30 seg; agitado toda la noche a 4°C y centrifugado a 300 g. Al sobrenadante que contenía fibras de colágena dispersas, se le ajustó el pH entre 6 y 7 con 1 M de NaOH para colectar las fibras insolubles con una espátula. El agregado de fibras de colágena tenía una apariencia muy similar a la de un algodón (Fig. 7a). El algodón de colágena fue lavado con ác. acético 0.1 M y con PBS (NaCl

0.15 M y NaH2PO4 0.015 M, pH 7.2) antes de usarse.

Acoplamiento de la colágena a la sepharosa 4B:

400 mg de colágena soluble fueron dializados contra NaHCO3 0.1M y guardados a 4°C hasta su uso. Por otro lado, la sepharosa 4B fué activada con bromuro de cianógeno siguiendo el método de Cuatrecasas et al. (49): la sepharosa 4B se lava y resuspende en agua bidestilada y se le agrega bromuro de cianógeno en una relación de 100 mg/ml de resina a 4°C, manteniendo una agitación constante. Se ajusta el pH de la mezcla con NaOH 4 N hasta que se mantenga estable en un valor de 11 (aproximadamente 8 min.), indicando que la activación ha terminado. Posteriormente, se lava la resina con 10 volúmenes de NaOH 4 N y con 20 volúmenes de NaH2CO3 0.1 M a 4°C; se mezcla con la solución de colágena y se deja en agitación durante 20-24 Hr a 4°C. Los sitios remanentes en la resina se bloquean con etanolamina al 1%; se lava la resina con PBS y se empaca en una columna que se equilibra con el mismo amortiguador.

Acoplamiento de anticuerpos monoclonales anti-AgB a sepharosa 4B:

12 mg de anticuerpos monoclonales en un volumen de 10 ml previamente preparados en el laboratorio fueron dializados contra NaHCO3 0.1 M y NaCl 0.5 M y almacenados hasta su uso. Por otro lado 1 gr de sepharosa 4B activada comercialmente fue hidratada en 150 ml de HCl 1 mM, durante 15 min a temperatura ambiente. Se filtró la resina para eliminar la solución y se lavó con 300 ml de agua destilada. La resina húmeda fue transferida a un recipiente que contenía los anticuerpos monoclonales y se incubó durante 2 hr a temperatura ambiente con agitación constante. Los sitios remanentes en la

resina fueron bloqueados adicionando una solución de etanolamina al 1% en NaHCO3. Posteriormente la resina fue equilibrada con la solución A.

Determinación del contenido de hidroxiprolina:

Se realizaron análisis de hidroxiprolina para determinar la concentración tanto de la colágena soluble como de la colágena acoplada a la Sefarosa 4B. Para ello, se siguió el método descrito por Rojkind y González (50) usando hidroxiprolina como patrón.

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

La composición polipeptídica de las fracciones obtenidas fue determinada por PAGE-SDS utilizando geles de placa al 10% de acrilamida de acuerdo al método descrito por Payne (51). La visualización de las bandas proteicas se realizó por tinción de los geles con azul brillante de Coomassie. La determinación del peso molecular aparente de las bandas proteicas se llevó a cabo usando una mezcla de proteínas globulares (Bio-Rad) como patrones.

Determinación de la concentración de proteínas:

La concentración de proteínas en las fracciónes obtenidas fue determinada por el método de Lowry modificado por Hartree, usando BSA como patrón (52).

Inmunoelectroforesis:

La inmunoelectroforesis se llevó a cabo en geles de agarosa al 0.8% (p/v) con amortiguador de barbital 0.05 M, pH 8.6. Se cubrieron laminillas con

agarosa y se aplicaron 25 ul de muestra en cada pozo del gel. La inmunoelectroforesis se corrió por 60-90 min, a 3mA por laminilla; el suero se adicionó al canal y se dejó difundir en cámara húmeda durante 48 Hr. Las laminillas fueron lavadas exhaustivamente con NaCl 0.65 M, en agua y secadas con un ventilador. Finalmente, las laminillas se teñian con negro de amido al 0.1% (p/v) en ácido acético al 10% (v/v) y se desteñian con ácido acético al 10% (53).

Inmunoelectrotransferencia:

Se llevó a cabo siguiendo el método de Tsang et al. (54), que consiste en la resolución inicial de las bandas proteicas en las fracciones (EC ó AgB) por PAGE-SDS. La cantidad de proteina aplicada por carril del gel era de 150 ug en el caso del EC y 25 ug de AgB puro. Al finalizar la electroforesis, las proteinas del gel fueron transferidas a papel de nitrocelulosa (PNC), en una cámara de transferencia (Trans-blot Cell, Bio-Rad), aplicando 250 mA por 2 hrs a 4°C. Para corroborar la transferencia de las proteinas al papel, uno de los carriles era recortado y teñido con 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 con las proteinas transferidas fué incubado toda la noche con BSA al 3% en PBS (PBS/BSA) a 4°C, con el objeto de bloquear los sitios libres en el papel. Posteriormente, se lavó 3 veces con PBS a temperatura ambiente durante 10 min cada vez, manteniendo agitación suave. Se recortaron tiras de PNC de acuerdo al esquema de ensayos por

agarosa y se aplicaron 25 ul de muestra en cada pozo del gel. La inmunoelectroforesis se corrió por 60-90 min, a 3mA por laminilla; el suero se adicionó al canal y se dejó difundir en cámara húmeda durante 48 Hr. Las laminillas fueron lavadas exhaustivamente con NaCl 0.65 M, en agua y secadas con un ventilador. Finalmente, las laminillas se teñian con negro de amido al 0.1% (p/v) en ácido acético al 10% (v/v) y se destañian con ácido acético al 10% (53).

Inmunoelectrotransferencia:

Se llevó a cabo siguiendo el método de Tsang et al. (54), que consiste en la resolución inicial de las bandas proteicas en las fracciones (EC ó AgB) por PAGE-SDS. La cantidad de proteina aplicada por carril del gel era de 150 ug en el caso del EC y 25 ug de AgB puro. Al finalizar la electroforesis, las proteinas del gel fueron transferidas a papel de nitrocelulosa (PNC), en una cámara de transferencia (Trans-blot Cell, Bio-Rad), aplicando 250 mA por 2 hrs a 4°C. Para corroborar la transferencia de las proteinas al papel, uno de los carriles era recortado y teñido con 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 con las proteinas transferidas fué incubado toda la noche con BSA al 3% en PBS (PBS/BSA) a 4°C, con el objeto de bloquear los sitios libres en el papel. Posteriormente, se lavó 3 veces con PBS a temperatura ambiente durante 10 min cada vez, manteniendo agitación suave. Se recortaron tiras de PNC de acuerdo al esquema de ensayos por

volumen de suero/la cantidad de zymosan obtenida al centrifugar dos volúmenes de la solución al 0.1%) durante 60 min a 37°C . La suspensión fue centrifugada para separar el suero del zymosan y colectar el sobrenadante (55).

Obtención de eritrocitos de carnero:

Se obtuvo sangre de un carnero normal por punción de la yugular con una aguja # 14, que fue recibida en un recipiente conteniendo un volumen equivalente de solución de Alsever (10 g de glucosa, 4.5 g de citrato de sodio, 0.31 g de ácido cítrico, 2.1 g de NaCl, llevado a un volúmen de 500 ml, pH 6.1). La mezcla se dejó equilibrar a temperatura ambiente y se almacenó a 4°C durante una semana, por lo menos, para estabilizar a los eritrocitos (56). Posteriormente, se decantó el sobrenadante, y el paquete de células, constituido principalmente por eritrocitos, fué resuspendido en una solución de Veronal (Acido 5,5-Dietilbarbitúrico 3 mM, Barbiturato de sodio 2 mM, CaCl 0.015 mM, MgCl 0.4 mM y NaCl 0.15 M), centrifugado a 700 g por 10 min y resuspendido nuevamente en Veronal para almacenarse a 4°C, hasta su uso.

Ensayos de fijación de complemento:

La actividad de complemento (C) en un suero, puede estimarse midiendo la hemólisis que este suero induce sobre eritrocitos utilizados como células blanco. Clásicamente, se emplean eritrocitos de carnero, hemolisina de conejo (suero hiperinmune con actividad anti-eritrocitos de carnero) y suero normal de cobayo como fuente de C (57). La hemólisis se determina espectrofotométricamente midiendo la absorbencia a 541 nm debida a la hemoglobina liberada. De este modo, el porcentaje de eritrocitos lisados se

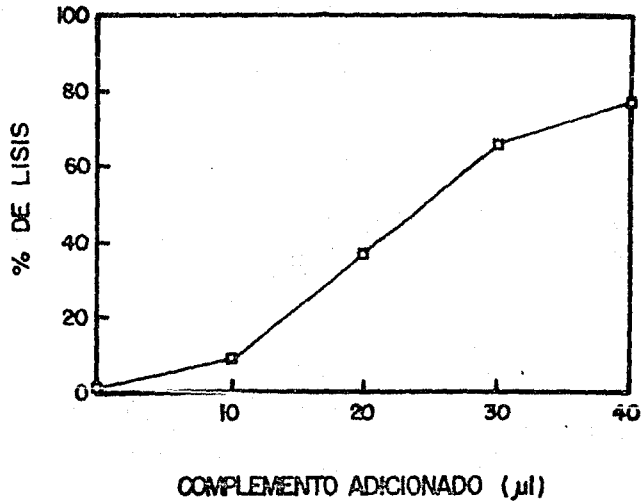


Fig. 8 Curva de dosis respuesta para la lisis inmune de eritrocitos de carnero por complemento humano, al cual se le inactivó la vía alterna.

calcula por comparación con una muestra de la misma cantidad de eritrocitos, a la cual se le induce lisis total por incubación con agua destilada. Cuando se grafica el porcentaje de lisis en contra de la cantidad de C adicionada, generalmente se obtiene una curva sigmoide con una meseta asintótica al 100% de lisis (ver por ejemplo la Fig. 8). En la región intermedia de la curva, alrededor del 50% de lisis, existe una relación casi lineal entre ambas variables. Es por ello, que la cantidad de C necesaria para inducir 50% de lisis (CH50) es un parámetro muy usado en estudios cuantitativos del sistema de complemento.

El CH50 del suero humano utilizado en este trabajo, se determinó gráficamente de acuerdo con la ecuación de von Krogh (Fig. 9):

$$\log X = \log K + \frac{1}{n}\log\frac{Y}{1-Y}$$

en donde: Y= porcentaje de lisis (expresado como fracción de 1)

X= ul de suero sin diluir

K= constante

n= constante

Los valores de Y/1-Y fueron graficados sobre papel log-log contra los ul de suero añadido. La CH50 del suero se obtuvo a partir de la inversa de la abcisa al origen.

En los ensayos de fijación de C descritos en la presente tesis, se utilizaron eritrocitos de carnero como células blanco, hemolisina de conejo y

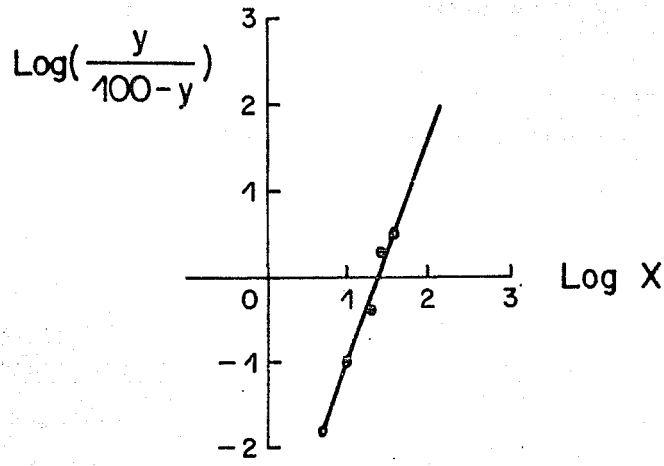


Fig. 9 Determinación gráfica (procedimiento de von Krogh) de la CH50 del suero humano utilizado, a partir de los resultados mostrados en la gráfica anterior

TUBO	RELACION AgB:C	AgB(ul)	COMPLEMENTO (ul)	VERONAL
1	8:1	800	100	100
2	4:1	400	100	500
3	2:1	200	100	700
4	1:1	100	100	800
5	1:2	50	100	850
6	1:4	25	100	875
7	1:8	12.5	100	887.5

TABLA II Relaciones de AgB:C probadas en los ensayos de Fijación de Complemento

suero de un humano normal como fuente de C. El suero humano fue incubado durante 20 min a 50°C para inactivar la via alterna del C. Posteriormente, este suero se diluyó 1:10 en amortiguador de Veronal, se preincubó 60 min a 37°C y se utilizó en los ensayos para obtener una curva patrón de lisis, así como para determinar la CH50. La otra parte del suero se diluyó 1:10 con diferentes concentraciones conocidas de AgB en PBS (AgB:C) y se preincubó durante 60 min a 37°C antes de ser usado en los ensayos de fijación del complemento. Las relaciones AgB:C probadas fueron: 8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8 (tabla II). Se utilizó una suspensión de eritrocitos al 2% en Veronal, que fue sensibilizada por incubación con la hemolisina (dilución 1:50,0000) durante 30 min a 37°C. Posteriormente, el suero humano preincubado o no con AgB, fue incubado con los eritrocitos durante 60 min a 37°C. Finalmente, se centrifugaron los tubos a 700 g por 10 min y se determinó la absorbencia del sobrenadante a 541 nm. Los resultados de los experimentos de fijación de complemento se expresan en forma de porcentajes de lisis.

Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA):

Se realizaron ensayos de ELISAs (58) para determinar si el AgB interacciona con la molécula de C1q. El C1q obtenido comercialmente en una solución de Tris fue dializado en contra de un amortiguador de carbonatos al 0.3%, pH 9.6. Se adsorbieron microplacas inmulon de 96 pozos, con 1 o con 10 ug de C1q/pozo durante 24 Hr, a 4°C. Después de lavar tres veces la placa con PBS conteniendo 0.05% de Tween (PBS-T), se incubó con albúmina sérica humana al 1% en PBS-T, adicionando 200 ul/pozo, durante 2 Hr a 37°C. La placa fue lavada de nuevo con PBS-T y se incubó con 1 o con 10 ug de AgB. Se realizó un nuevo ciclo de lavado con PBS-T y se incubó con suero de cerdo anti-AgB, durante 2 Hr a

37°C. Posteriormente, se lavó con PBS-T y se incubó con IgG de conejo anti-IgG de cerdo acoplada a peroxidasa. Como substrato de la enzima se utilizó 0.4% de orto-fenilendiamina en 0.1 M de amortiguador de citratos, pH 4.5. La reacción se dejó desarrollar durante 30 min a temperatura ambiente y se detuvo adicionando 100 ul/pozo de ácido sulfúrico 1 M. La absorbencia a 450 nm de los pozos se determinó con un lector automático de ELISA.

IV. RESULTADOS.

PURIFICACION DEL AgB:

Inicialmente, se intentó un procedimiento de purificación por afinidad, utilizando una columna de Sepharosa 4B-colágena. Para el acoplamiento de la colágena se utilizaron dos tipos de resinas activadas. La primera fue sepharosa activada de origen comercial, mientras que la otra fue activada en el laboratorio, con bromuro de cianógeno justo antes del acoplamiento. Los porcentajes de acoplamiento obtenidos con ambas resinas fueron similares y menores al 1%. Por ejemplo, el mejor resultado obtenido fue de 80 ug de colágena acoplada/ml de resina húmeda, determinado por el método de hidroxiprolina, en una columna de 20 ml. A través de esta columna se pasaron 30 ml de un EC, obteniéndose el perfil de elución que se muestra en la figura 10. La cantidad de proteína parasitaria retenida por la columna, de acuerdo a las determinaciones realizadas fue de 100 ug totales.

Se intentó otro método de purificación utilizando un "algodón" de colagéna insoluble obtenido a partir de tendón bovino. La cantidad de proteína parasitaria unida a la colágena cuando se incubaron 30 ml de ECI con un algodón de 1-2 g fue de 300 ug. Este material fue eluido de la colágena por medio de lavados tanto de PBS + NaCl 0.5 M como de Ac. Acético 0.1 M. La figura 12 ilustra el patrón de bandeo en SDS-PAGE del material unido al algodón de colágena. Las 2 bandas más abundantes con pesos moleculares de 85 y 95 Kd coinciden en su migración respectiva con las bandas principales, características del AgB (42). Un análisis densitométrico de los geles secos

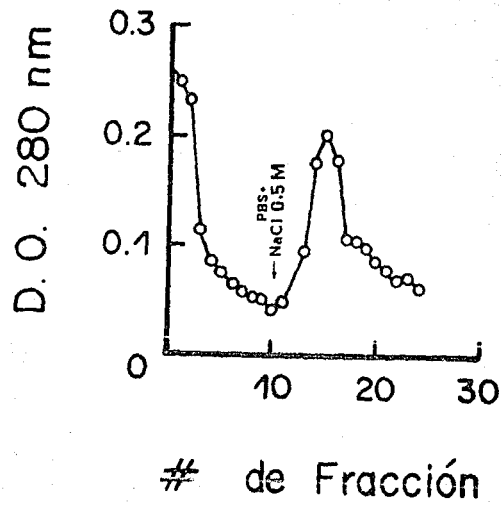


Fig. 10 Perfil de elución del ECI através de una columna de sepharosa 4B-colágena. El material retenido por la columna fué eluido con PBS al que se aumentó la concentración de NaCl hasta 0.65 M.

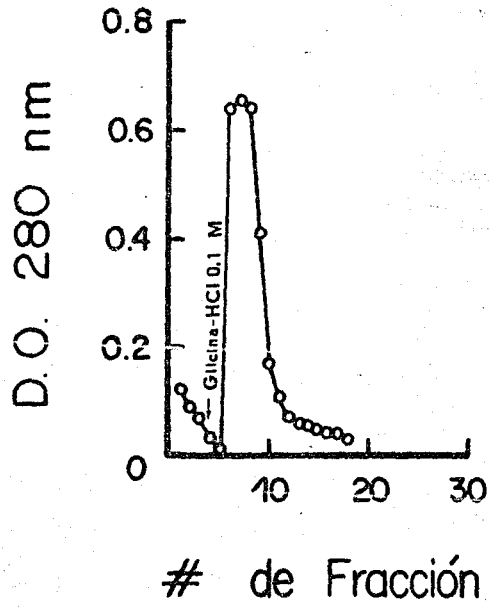


Fig. 11 Perfil de elución del ECII através de una columna de sepharosa 4B-Anti-B. El material retenido por la columna fué eluido con Glicina-HCl 0.1 M pH 2.9

indicó que las dos bandas más abundantes constituían el 85% del contenido de proteínas en la fracción.

El AgB fue también purificado por cromatografía de afinidad, utilizando una columna de sepharosa 4B con anticuerpos monoclonales anti-AgB acoplados, el perfil de elución se muestra en la figura 11. La cantidad de proteína unida a la columna después de que se pasaban 30 ml de ECII a una velocidad de flujo de 30 ml por hora, fue de 150 ug. Esta fracción fue eluida de la columna por medio de un lavado con un amortiguador de glicina-HCl 0.1 M. La figura 13 muestra el patrón de bandeo en SDS-PAGE de material eluido de la columna. La banda obtenida constituía el 95% de la proteína obtenida.

ANALISIS INMUNOLOGICO DE LAS FRACCIONES PURIFICADAS.

Para determinar si el AgB se encontraba presente en las fracciones obtenidas por medio del algodón de colágena y por la cromatografía de afinidad, se llevaron a cabo ensayos de inmunoelectrotransferencia utilizando un suero hiperinmune de cerdo anti-AgB. En la figura 14 se observa que el suero reconoce solamente las dos bandas más abundantes en el carril correspondiente a la fracción purificada por medio del algodón de colágena, así como también reconoce solo una banda en el carril correspondiente a la fracción purificada por la columna de monoclonales (fig. 14). No se observaron bandas de cuando se incubó con suero normal de cerdo.

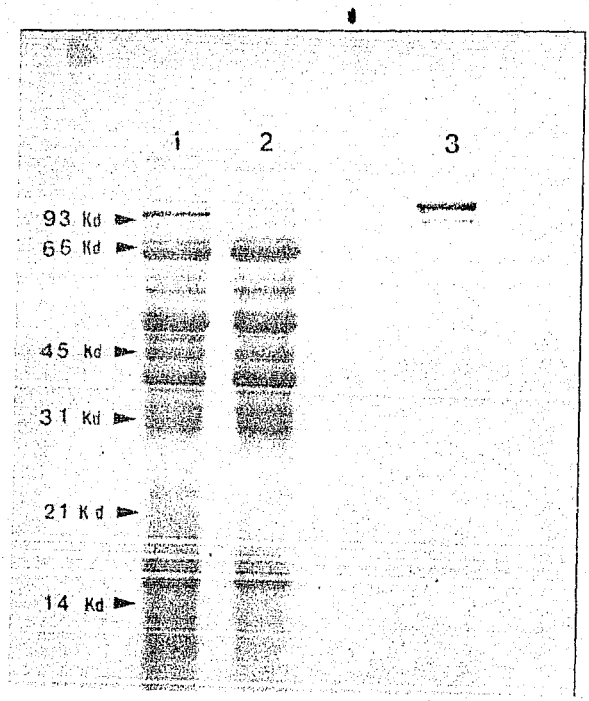


Fig. 12 SDS-PAGE de las fracciones obtenidas durante la purificación del AgB utilizando un algodón de colágena insluble de tendón bovino (figs. 6 y 7b). Tinción con azul brillante de Coomassie: 1) ECI antes de ser incubado con el algodón de colágena; 2) ECI después de la incubación y 3) Fracción retenida por la colágena .

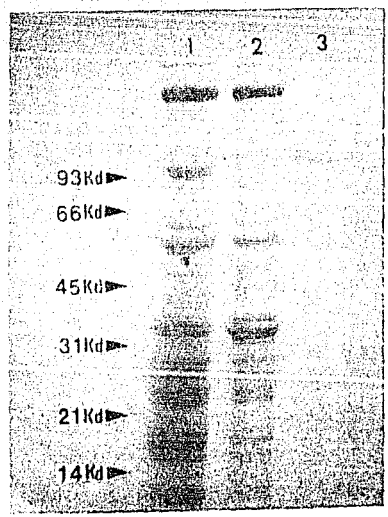


Fig. 13 SDS-PAGE de las fracciones obtenidas durante la purificación del AgB a través de una columna de sepharosa 4B anti-B. Tinción con azul brillante de Coomassie: 1) ECII antes de ser pasado por la columna y 2) ECII después de ser pasado por la columna 3) Fracción retenida por la columna.

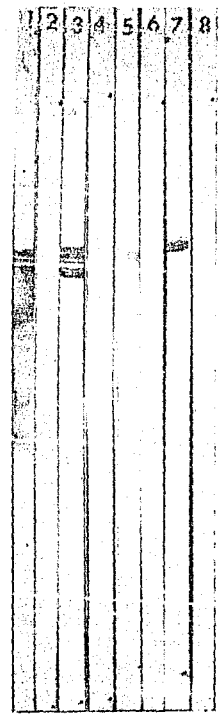


Fig. 14 Inmunoelectrotransferencia de ECI (1 y 2), fracción retenida por la colágena (3 y 4), ECII (5 y 6) y fracción retenida en la columna de sepharosa 4B- anticuerpos monoclonales anti-B (7 y 8) Carriles: 1,3,5 y 7) Incubados con suero de cerdo anti-B, dilución 1:500; 2,4,6 y 8) Incubados con suero de cerdo normal dilución 1:500. En lugar de segundo anticuerpo se usó proteina A peroxidada dilución 1:1000, el sustrato usado fué 1-4 cloronaftol.

INHIBICION DE LA CASCADA DEL COMPLEMENTO.

Cuando se usó el suero fresco de un humano normal como fuente de C, se observó un considerable porcentaje de lisis inespecifica en los experimentos de fijación de complemento, a pesar de que se habian utilizado eritrocitos de carnero sin sensibilizar (datos no mostrados). Para evitar esta lisis inespecifica el suero fue preadsorbido con eritrocitos de carnero para así eliminar anticuerpos dirigidos hacia determinantes menores de superficie. Adicionalmente, la vía alterna del C fue inactivada por incubación del suero a 50°C durante 20 min. En estas condiciones, la lisis inespecifica fue prácticamente eliminada en los ensayos de fijación de complemento además de lograrse una excelente reproducibilidad en experimentos consecutivos. La figura 8 muestra el perfil tipico de una cinética de lisis inmune utilizando el suero humano preadsorbido.

Para determinar si el AgB, tanto el purificado por medio de la colágena como el purificado por cromatografia de afinidad, tienen algún efecto sobre el sistema del C, se realizaron ensayos de fijación en las condiciones descritas arriba, en los que el suero humano habia sido preincubado con diferentes cantidades de AgB. Como se muestra en la figura 15, el AgB produjo una disminución en la actividad de C presente en el suero después de la preincubación. El efecto inhibitorio debido al AgB es aparente incluso en las relaciones AgB:C de 1:4 y 1:8.

Se realizaron ensayos para determinar si la inhibición causada por el AgB se debia exclusivamente a un efecto sobre la vía clásica del C. Para ello, se tomó una muestra del suero humano, sin haber sido tratada a 50°C por 20 min, y se incubó con AgB purificado por medio de la colágena, en una relación de 1:1 por un lado y con Zymosan por otro, durante 60' a 37°C. Posteriormente, se

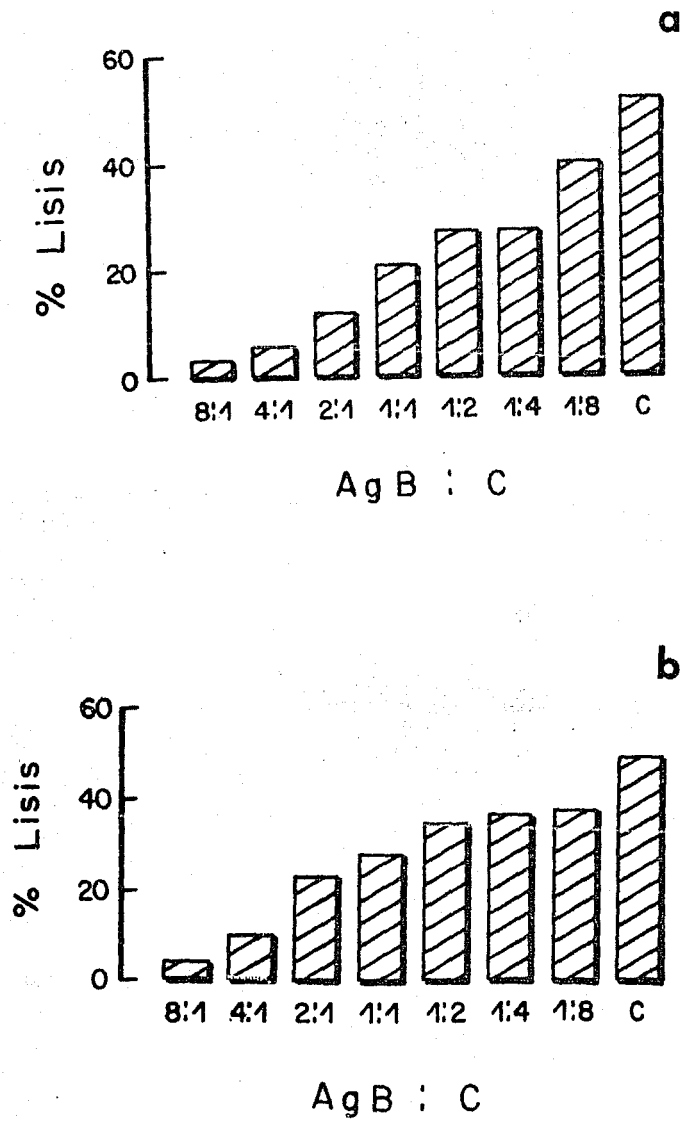


Fig. 15 Inhibición del complemento por el AgB del cisticerco a) con AgB purificado por medio del algodón de colágena y b) con AgB purificado por medio de la columna de afinidad.

Fig. 15 Inmunoelectroforesis de un suero humano incubado con AgB (pozo superior o con zymosan (pozo inferior). El canal contenía suero hiperinmune anti- Factor B

realizaron inmunoelectroforesis de ambas muestras en contra de un suero hiperinmune con actividad de anti-Factor B* del complemento. Los resultados mostraron que el AgB no tiene ningún efecto sobre la vía alterna, determinado por hidrolisis del Factor B (fig. 16).

INTERACCION AgB-C1q

Se realizaron ensayos de ELISA para determinar si el AgB se unía al C1q. El C1q se adsorbió a la placa y posteriormente se incubó con 1 o con 10 ug de AgB. Los resultados mostrados en la tabla III indican que el AgB interacciona por igual con el C1q, en las dos concentraciones probadas.

* Cabe hacer notar que el AgB no tiene ninguna relación con el Factor B del complemento. El Factor B es un componente que participa en la formación de la C3 convertasa de la vía alterna.

SUERO DE CERDO	C1q(ug)	AgB(ug)	D.O.*
ANTI-B (1:1000)	1	1	0.219
	10	10	0.310
NORMAL (1:1000)	1	1	0.083
	10	10	0.098
ANTI-B (1:500)	1	1	0.252
	10	10	0.275
NORMAL (1:500)	1	1	0.091
	10	10	0.099

* LAS LECTURAS SE OBTUVIERON EN ENSAYOS DE ELISA EN LOS QUE EL C1q FUE ADSORBIDO A LA PLACA Y EL AgB FUE INCUBADO 2 h A 37°C. COMO 2do. ANTICUERPO SE USO IgG DE CONEJO PEROXIDADA ANTI-IgG DE CERDO.

Tabla III Interacción AgB-C1q determinada en un ensayo de ELISA

V. DISCUSION.

La purificación del AgB se intentó inicialmente usando una columna de sepharosa 4B-colágena. Para ello, se acopló la colágena a la sepharosa siguiendo el procedimiento del bromuro de cianógeno (49). El porcentaje de acoplamiento fue de 0.4%, obteniéndose al final una resina que tenía 80 ug de colágena acoplados en cada ml. Aunque estas cifras pueden considerarse normales con respecto a las reportadas por otros autores para el acoplamiento de la colágena (59), resultaron muy bajas como para permitir la purificación de una cantidad razonable de AgB.

Se intentó además acoplar la colágena por el método del 2-iminotiolano (60) y de los oxiranos bifuncionales (61), obteniéndose cantidades similarmente bajas de proteína acoplada por ml de resina. Lo anterior sugiere que el factor limitante para el acoplamiento de la colágena a la sepharosa 4B no es la disponibilidad de grupos reactivos en la proteína, sino quizá, la accesibilidad de los sitios en la resina, especialmente considerando que se trata de una proteína altamente asimétrica.

Se trataba pués de desarrollar un método para la purificación del AgB, que aprovechara su afinidad por colágena y que no necesitara el uso de una resina como soporte. En consecuencia, se utilizó colágena polimérica la cual se obtiene induciendo la reasociación de colágena pura en solución (48). La colágena reasociada tiene la apariencia de un algodón (fig.7a) que puede ser fácilmente manipulado. El uso del algodón de colágena permitió captar cantidades mayores de proteína a partir del ECI de cisticercos. El análisis de la proteína atrapada con el algodón de colágena, por SDS-PAGE (Fig. 12) así

como por inmunoelectrotransferencia usando anticuerpos anti-AgB (Fig. 14), demostró que el AgB constituía el 85% de la proteína en la fracción. El resto de la proteína en la fracción estaba formada principalmente por colágena desprendida espontáneamente del algodón. En resumen, el uso de colágena polimérica posibilita la purificación de AgB en cantidades del orden de los miligramos, a través de un procedimiento rápido, sencillo y de bajo costo.

Cabe hacer notar que el algodón de colágena puede ser utilizado múltiples veces con similares resultados. Solo se observó un decaimiento de su capacidad para atrapar AgB después de varios meses de uso frecuente.

El AgB purificado como se describió arriba fue utilizado en ensayos de fijación de complemento. El objetivo era determinar si este antígeno afectaba de algún modo la cascada del C. La idea subyacente era que la propiedad del AgB para interaccionar con colágena podría permitirle interaccionar con el C1q y alterar su función. Puesto que el C1q es el componente inicial en la vía clásica, una alteración en su funcionamiento provocaría efectos en todos los pasos subsecuentes de la cascada (ver apéndice). Los resultados mostraron que el nivel de C funcional disminuye en las muestras de suero que habían sido preincubadas con AgB. La actividad de C varía en relación inversa con la concentración del AgB en la preincubación (Fig. 15). Estos resultados pueden tener dos explicaciones. La disminución en la actividad del C puede deberse a que durante la preincubación con el AgB se produce un consumo a su vez debido a una activación por vía alterna. Al respecto, se conoce un gran número de compuestos de naturaleza diversa, incluyendo a una glicoproteína de metacéstodos téniidos (62), capaces de consumir complemento por activación de la vía alterna (63). Cabe hacer notar que los experimentos de fijación del complemento descritos en la presente tesis, se llevaron a cabo utilizando un

suero humano que habia sido incubado a 50°C durante 20 min. Este tratamiento produce la inactivación de la vía alterna debido a una destrucción de componentes termolábiles (64). Es decir, que en las condiciones en las que se realizaron los ensayos de fijación, sería razonable esperar bajos niveles de actividad de la vía alterna. La otra explicación posible sería que el AgB actúa como inhibidor de la cascada, de tal modo que a pesar de que los niveles de complemento funcional no varíen durante la preincubación, la activación es impedida por el AgB.

Para distinguir entre las anteriores posibilidades se realizaron inmunoelectroforesis en las que se enfrentaron muestras de suero preincubadas o no con el AgB y anticuerpos dirigidos en contra del Factor B. El suero utilizado en las inmunoelectroforesis no fue sometido al tratamiento térmico (50°C por 20 min). Además, se utilizó una concentración de AgB que inducía una considerable disminución en la actividad de C. Los resultados mostraron que la preincubación con el AgB no induce la hidrólisis del Factor B, indicando que no ocurre activación de la vía alterna.

Puesto que la pureza del AgB utilizado era del 85%, existía la posibilidad de que la inhibición observada en los ensayos de fijación del complemento, se debiera a alguna otra proteína presente en la fracción. Este punto era especialmente crítico si se toma en cuenta que el AgB había sido purificado aprovechando su afinidad por colágena (Fig. 7b). Otra proteína parasitaria con capacidad para interaccionar con colágena podría ser la responsable del efecto. Esta posibilidad fue explorada realizando ensayos de fijación con AgB purificado por medio de una columna de sepharosa 4B que tenía acoplados anticuerpos monoclonales anti-B. En estas condiciones, el AgB que se obtiene de la columna es aproximadamente 95% puro. Las pequeñas cantidades de proteínas

contaminantes en la fracción, eran diferentes a las que se observan en la fracción obtenida con el algodón de colágena. El efecto inhibitorio encontrado fue prácticamente idéntico, lo cual permite identificar al AgB como el único responsable del efecto inhibitorio sobre el complemento.

Cabe mencionar que el AgB purificado por medio de la columna con anticuerpos monoclonales solo presenta la cadena polipeptídica de 95 Kd. Esto puede deberse a que el extracto crudo del cual se purificó el AgB se obtuvo utilizando varios inhibidores de proteasas; en estas condiciones, es posible que se evite la degradacion del AgB nativo. La anterior explicación implica que la cadena de menor peso molecular en el AgB es producto de la hidrolisis de la cadena mayor. Otra posible explicación consiste en suponer que los anticuerpos monoclonales reconocen un epitopo de carbohidrato en la molécula del AgB, que solo se encuentre presente en la cadena de 95,000 d.

Los resultados hasta aquí descritos demuestran por un lado, que el AgB no es un agente consumidor de complemento, y por el otro, que la disminución de la actividad del complemento debida a este antígeno, se lleva a cabo a través de una inhibición sobre la vía clásica. Sin embargo, se ignoraba a que nivel de la vía clásica se produce el bloqueo por AgB.

Como primer acercamiento a esta cuestión, los resultados de los ensayos de ELISA demuestran que el AgB interacciona con el C1q (Tabla III), lo cual hace pensar que la inhibición de la vía clásica ocurre a nivel de C1 (ver apéndice). La explicación más sencilla, considerando la propiedad del AgB para interaccionar con colágena, seria que la molécula del AgB unida a la región colagénica del C1q, produce un impedimento estérico que evita la activación del C1r y del C1s. Sin embargo, se requiere evidencia más directa al respecto. Actualmente se llevan a cabo ensayos para determinar si la inhibición del C

causada por el AgB puede ser revertida por adición de C1 o de C1q puro. Además, se intentará determinar el sitio de interacción AgB-C1q usando técnicas de microscopia electrónica así como por ensayos con C1q parcialmente digerido.

Cualquiera que sea el mecanismo por el cual el AgB inhibe la cascada del complemento, la evidencia disponible indica que este antígeno juega un papel central en el mantenimiento de la relación huésped-cisticerco. Por un lado, es el antígeno más frecuentemente reconocido por anticuerpos presentes en sueros de pacientes y cerdos cisticercosos (34,65). Además, el AgB es responsable de gran parte de los anticuerpos sintetizados en la reacción inflamatoria que rodea al parásito (37). Se trata pues de una proteína inmunodominante, que parece desviar una porción considerable de la respuesta inmune humoral del huésped cisticercoso hacia un producto de secreción. Por otro lado, la secreción continua de AgB hacia los tejidos del huésped podría reducir su capacidad de respuesta hacia otros antígenos del cisticerco. Los resultados descritos en la presente tesis sugieren que el AgB secretado podría inhibir localmente la activación del complemento debida a la presencia de complejos inmunes en la interfase huésped-parásito. Antes de considerar las implicaciones de esta inhibición, conviene recordar que durante la activación del complemento se producen factores quimioatrayentes de células así como anafilatoxinas. Es decir, que la activación del complemento no solo constituye un mecanismo efector directo debido a la formación de lesiones en las membranas blanco y a los factores opsonificadores, sino que también, otros factores contribuyan a modular fenómenos tan importantes como la inflamación local. En consecuencia, la característica inhibitoria del AgB sugiere que su secreción hacia la interfase podría disminuir la respuesta inflamatoria, y de este modo, reducir la confrontación huésped-parásito.

Si el AgB juega un papel relevante en el mantenimiento de la relación huésped-cisticerco, es posible que la inducción de una respuesta humoral anti-B, anterior a la instalación del cisticerco en los tejidos del huésped, pudiera tener efectos inmunoprofilácticos. Al respecto, solo se dispone de evidencias preliminares provenientes de experimentos en los que se inmunizaron ratones BALB/C con una sola dosis de AgB; posteriormente, se les retó con cisticercos de T. crassiceps por transferencia intraperitoneal. Los resultados mostraron una protección significativa debida a la inmunización por AgB, lo cual abre las puertas para el uso futuro de este antígeno en ensayos de vacunación.

Finalmente, los esfuerzos futuros estarán dirigidos a caracterizar en detalle la acción inhibitoria del AgB sobre el sistema del complemento, con la idea de lograr una mejor comprensión de esta compleja relación huésped-parásito, que a su vez aporte nuevas estrategias para el control de la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA.

1. Hird, W. and M. Pullen, (1979) Tapeworms, meat and man. A brief review and update of cysticercosis caused Taenia saginata and Taenia solium. J. Food Protection, 42:58.

2. Beltrán, F. (1982) Epidemiology and economic impact of cysticercosis. In: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Academic Press, N. Y. 99-103.

3. Schenone H., F. Villarroel, A.L. Rojas and R. Ramírez (1982) Epidemiology of human cysticercosis in Latin American. En : Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Academic Press, N.Y. 25-35.

4. González-Angulo A., A. Schunaman-de-Aluja, L. Lombardo (1984) La cisticercosis en México. Gaceta Médica de México 120: 309-325.

5. Barnes, R.D. (1984) Zoología de los invertebrados. Nueva Editorial Interamericana, 4a. edición. México, D.F. 259-260.

6. Silverman, P. (1954) Studies on the biology of some tapeworms of the genus Taenia. II. The morphology and development of the taeniid hexacant 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.

7. Laclette, J.P., Y. Ornelas, M. Merchant, and K. Willms (1982) Ultrastructure of the surrouding envelopes of Taenia solium eggs. In: "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). 375-388.

8. Cañedo , L., J.P. Laclette, and E. Morales (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). 363-373.

9. Schmidt, G.D. and S.L. Roberts (1977) Tapeworms of particular importance to humans. En: Foundations Parasitology. The C. V. Mosby Company, 354.

10. Sealy, M.A. (1980) Respuesta inmune a antígenos de Cysticercus cellulosae. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M. México.

11. Lumsden, R. (1975) Surface ultrastructure and cytochemistry of parasitic helminths. Exp. Parasitol. 37:267.

12. Leid, R. and J. Williams (1974) Immunological response of the rat to infection with Taenia taeniaeformis. I Immunoglobulin classes involved

in passive transfer of resistance. Immunology, 27: 195.

13. Siebert, A., T. Vervoot, V. Kumar, and F. Ceulemans, (1981) Taenia crassiceps: serum and surface immunoglobulins in metacestode infections of mice. Exp. Parasitol. 51.

14. Mitchell, G.F., J. Goding, and M. Rickard, (1977) Studies on immune responses to larval cestodes in mice. Increased susceptibility of certain mouse strains and hypothymic mice to Taenia taeniaeformis and analysis of passive transfer of resistance with serum. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 55:165.

15. Villaseñor, C. (1942) Algunos datos para la histopatología de la cisticercosis del encéfalo. Bol. Est. Biol. 1:89

16. Márquez-Monter, H. y B. Austria, (1969) Cisticercosis en el Hospital General de México, Estudio Anatomopatológico de 155 casos. Rev. Lat. Am. Patol. 8:79.

17. Flisser, A., I. Bulnes, M. Diaz, R. Luna, E. Woodhouse, F. Beltrán, I. Martinez, y C. Larralde (1976) Estudios seroepidemiológicos de la cisticercosis humana en poblaciones predominantemente indígenas y rurales del estado de Chiapas. Arch. Invest. Med. (Mex.) 7:107

18. Woodhouse, E., A. Flisser, y C. Larralde (1982) Seroepidemiology of Human Cysticercosis in Mexico. In: "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). 11-23.

19. Laclette, J.P. (1985) Componentes de superficie en el metacestodo de Taenia solium. Tesis de Doctorado. Instituto de Investigaciones Biomédicas. U.N.A.M. México.

20. Woodhouse, E. (1979) Seroepidemiología de la cisticercosis humana en la República Mexicana. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias UNAM, México.

21. Aluja, A. (1982) Frequency of porcine cysticercosis in Mexico. In: "Cysticercosis: Present state of knowlwdge and perspectives". (Flisser, A., K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltrán, Eds.). Academic Press (New York) 53-62.

22. Acevedo-Hernández, A. (1982) Economic impact of porcine cysticercosis. In "Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives" (Flisser,A., K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltrán Eds.). Academic Press (New York) 47-51.

23. Zenteno-Alanis, G. (1982) A Classification of Human Cysticercosis. In: "Cysticercosis: Present state of Knowledge and perspectives". (Flisser, A., K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltrán Eds.). Academic Press (New York) 107-126.

24. Dixon, H. y F. Limpscomb, (1961) Cysticercosis: An analysis and follow-up of 450 cases. Special Report Series. Medical Research Council, 299:1.

25. Sánchez-Cisneros, R. (1979) Cisticerco en el corazón. Referata Médica, 6:35

26. Márquez-Monter, H., J. Aguirre, y F. Biagi, (1963) Cisticercosis del miocardio. Revista de la Facultad de Medicina (México) 5:401.

27. Seens, J. (1950) Estado actual del problema de la cisticercosis ocular. Anales de la Sociedad Mexicana de Oftalmología y Otorrinolaringología, 24:30.

28. Rognetta, E. (1844) Traite philosophique et clinique d'ophtalmologie. Art. 8:145.

29. Sánchez-Fontan, R. (1964) Cisticercosis ocular. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina, UNAM (México).

30. Rabiela, M.T., A. Rivas-Hernández, y J. Rodríguez-Ibarra (1979) Consideraciones anatomopatológicas sobre la cisticercosis cerebral como causa de muerte. Patología, 17:119.

31. Ribera, J. y M. Altamirano (1971) Algunas consideraciones sobre 9,412 autopsias realizadas en el Hospital General de México. Rev. Invest. Salud Pública, 31:1.

32. Lombardo, L. (1982) Cisticercosis cerebral. Colección de Textos Médicos No. 4 Instituto Mexicano del Seguro Social (México) 71 pags.

33. Flisser, A. (1980) The immunology of human Cysticercosis. In: Molecules, cells and parasites in immunology. (C. Larralde, K. Willms, L. Ortiz y M. Sela Eds.). Academic Press (New York) pags. 125-143.

34. Flisser, A., E. Woodhouse, and C. Larralde (1980) Human Cysticercosis, antigens, antibodies and no-responders. Clin. Exp. Immunol. 39:27

35. Flisser, A., A. Plancarte, S. Espinoza, E. Woodhouse, L. Rivera, Trueba., W. Yakoleff Grechouse, A. Sierra, J.P. Lalcette, G. Guerra, L. Cañedo, and C. Larralde (1982) The immune status of patients with cysticercosis. Mt. J. Clin. and Exp. Immunol. 3:1983.

36. Cohen, S. (1974). The immuneresponse to parasites In the immunized host. Eds. Associated Scientific Publishers, Amsterdam-London-New York, 3-20.

37. Willms, K., M.T. Merchant, S. Diaz, and L. Arcos (1982) Host-Parasite interface in the metacestode of Taenia solium. In: Cysticercosis: Present state of knowledge and pespectives. (A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura and F. Beltrán Eds.). Academic Press (New York) 397-411.

38. Willms, K., M.T. Merchant, L. Arcos, M. Sealey, and S. Diaz (1980) Immunopatology of Cysticercosis. In: Molecules, Cells and Parasites in Immunology. Eds. C. Larralde, K. Willms, L. Ortiz y M. Sela. Academic Press (New York) 145.

39. Guerra, G., A. Flisser, L. Cañedo, and J.P. Laclette (1982) Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from Cysticerci of T. solium. In: "Cysticercosis: Present state of knowledge and Perspectives." (Flisser, A., Willms, K., J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura and F. Beltrán Eds.). Academic Press (New York) 437-451.

40. Sober, H. (1976) Handbook of Biochemistry, Selective Data for Molecular Biology, Section C. (3a. Ed.) Chemical Rubber Co. (Cleveland).

41. Diwan, A., M. Coker-Van, D. Brown, R. Subianto, R. Desowitz, A. Escobar, J. Clarence, J. Gibbs, and G. Carleton (1982) Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) for the detection of antibody to cysticerci of Taenia solium Am. J. Trop. Med. Hyg. 31:364.

42. Laclette, J.P., M.T. Merchant, and K. Willms (1987) Histological and Ultraestructural Localization of Antigen B in the Metacestode of Taenia solium. J. Parasitol. 73 (1): 121.

43. Flisser, A. (1978) Inmunología de la cisticercosis. Tesis de Doctorado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN (México).

44. Diaz, 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.

45. Plancarte, A., A. Flisser, and C. Larralde, (1982) Fibronectinlike properties of antigen B from cysticerci of Taenia solium. In: "Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives". (Flisser, A., K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura and F. Beltrán Eds.) Academic Press (New York). 453-463.

46. Plancarte, A., A. Flisser and C. Larralde (1983) Fibronectine properties in antigen B from the cysticercus of Taenia solium. Cytobios. 36:83.

47. Torre-Blanco, A. and A.M. Alvizouri (1987) In vitro hidroxilation of proline in the collagen of Taenia solium Comp. Biochem. Phisiol. 88 1213-1217.

48. Steven, F. (1967) The effect of chelating agents on collagen interfibrillar matrix interactions in conective tissue. Biochim. Biophys. Acta 140: 522-528.

49. Cuatrecasas, P., Wilchek and Anfisen (1968) Proc. Nat. Academic Soc. 61: 636-643.

50. Rojkind, M. and E. González (1974) An improved method for determining Specific Radioactivities of proline 14C and Hidroxiproline 14C in Collagen and in Noncollagenous Proteins. Analytical Biochemistry 57: 1-7

51. Payne, T. (1976) Electrophoresis of proteins on sodium dodecyl sulphate poliacrilamide gels. En: Chromatografic and electrophoresis techniques. Vol. II: zone electrophoresis. Ed. I. Smith, Year Book Medical Publications, Chicago.

52. Hartree, E. (1972) Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal. Chem. 48: 422.

53. Ouchterlony, O. (1968) Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Ann. Arbor Science Publ. (Ann. Arbor) 132 pags.

54. 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 Enzimology. 92:377.

55. Rose, N., H. Friedman, and J. Fahey (1986) Manual of Clinical Laboratory Immunology. Third Edition. American Society for Microbiology.

56. Garvey, J., N. Cremer, and D. Sussdorf, (1977) Cellular Antigens In: Methods in Immunology. W. A. Benjamin, Inc. New York. 140-143.

57. Garvey, J., N. Cremer and D. Sussdorf (1977) Complement Fixation Assay In: Methods in Immunology. W. A. Benjamin, Inc. New York. 379-411.

58. Espinoza, B., A. Flisser, A. Plancarte and C. Larralde (1982) Immunodiagnosis of Human Cysticercosis: ELISA and Immunoelectrophoresis. In: "Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives". (Flisser, A., K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltrán Eds.) Academic Press (New York). 163-170.

59. Von der Mark, H., K. Von der Mark, and S. Gay (1976) Study of differential collagen synthesis during development of the chick embryo by immunofluorescence. 1.- Preparation of collagen type I and type II specific antibodies and their aplicattions to early stages of the chick embryo. Developmental Biology 48, 237-249.

60. Alagón, A. and K. Te Pio (1980) Activation of Polisaccharides with 2-Iminothiolane and Its Use. Biochemistry. 19:18.

61. Sundberg, L. and J. Porath (1974) Preparation of adsorbents for biospesific affinity chromatography. Attachment of group-containing ligands to insoluble polymers by means of bifunctional oxiranes. Journal of Chromatografy. 90.

62. Hammerberg, B., C. Dangler and J. Williams (1980) Taenia taeniformis chemical composistion of parasite factors affecting coagulation and complement cascade. J. Parassitol., 66:569.

63. Pangburn, M. (1986) The Alternative Pathway. In: Immunobiology of the Complement System. Gordon D. Ross. Academic Press. 45-85.

64. Müeller-Eberhard, H. and R. Schreiber (1980) Molecular biology and

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

chemestry of the alternative pathway. Advances in immunology ,29.

65. Espinoza, B. (1985) Respuesta inmune humoral en la neurocisticercosis humana. Inmunodiagnóstico, caracterización de anticuerpos e identificación de antígenos en liquido cefalorraquideo. Tesis de Maestria. UNAM.

66. Porter R. R. and B.M. Reid (1979) Activation of Complement System by Antibody-Antigen Complex: The Classical Pathway. Advances in Protein Chemistry. 33:1-65.

67. Hughes-Jones, N. (1986) The Clasical Pathway. In: Immunobiology of the complement system. Gordon Ross (ed). Academic Press. New York.

68. Stites, D., Stobo, J., H. Fudenberg and V. Wells (1985) Inmunología Básica y Clinica. 5a. Edición, Ed. El Manual Moderno. México, D.F.

69. Dorrington, K.J. and R.H. Painter (1974) Prog. Immunol. Proc. Int. Congr. Immunol. 2nd vol. 1, pp. 75-84.

70. Ross, G. (1986) Introduction and History of complement research. Immunobiology of the complement system. Academic Press, 1-19.

71. Reid, K. (1983) Proteins involved in the activation and control of the to pathways of human complement. Biochemical Society Transaction 11: 1-12

APENDICE

EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

En la sangre de todos los vertebrados existen sistemas protectores que al activarse desencadenan reacciones en cascada. Entre ellos se puede mencionar al sistema de coagulación de la sangre, destinado a controlar las heridas, y al sistema del complemento que participa en la defensa contra agentes infecciosos. La activación de ambos sistemas depende de la conversión de zimógenos proteolíticos en proteasas activas (66).

El complemento es con mucho el más complejo de estos sistemas y tiene como función principal la destrucción de organismos extraños y de complejos inmunes. Esta función es llevada a cabo por dos mecanismos: 1) Recubrimiento de las partículas con las proteínas C3 y C4, dando por resultado su opsonificación que facilita la fagocitosis de las partículas por los macrófagos y 2) La lisis de los organismos extraños por la inserción en sus membranas de una estructura compleja que resulta del ensamble de varias moléculas de C9. Esta estructura tiene un "agujero" central que permite la entrada libre de agua y sales al interior de la célula, con el subsecuente aumento de volumen interno y ruptura de la membrana plasmática (67). Cabe hacer notar que a lo largo de la activación del complemento se liberan algunos factores quimioatrayentes y anafilatoxinas que participan en la modulación de fenómenos defensivos tan importantes como la respuesta inflamatoria.

El sistema del complemento puede ser activado por dos mecanismos diferentes designados como vía clásica y vía alterna. La vía clásica es

dependiente de anticuerpos mientras que la alterna es totalmente independiente de la respuesta inmune (Fig. 17).

La vía clásica es activada por complejos antígeno-anticuerpo o por inmunoglobulinas agregadas. En los humanos, las inmunoglobulinas de la clase IgM y de las subclases IgG1, IgG2 e IgG3, son capaces de iniciar la vía clásica (68). La activación inmunológica ocurre a través de la combinación del primer componente de complemento (C1) con un sitio localizado en el dominio CH2 de la región Fc de la molécula de IgG o IgM humana (69) . Una vez activado el C1, la reacción se propaga a los demás componentes hasta la formación del complejo lítico que se inserta y produce canales en las membranas biológicas.

A su vez, la vía alterna es activada por diversos tipos de superficies biológicas así como por una variedad de otros factores no dependientes del sistema inmune. Después que el C3 ha sido activado por la vía alterna, la cascada continua a través de los mismos pasos descritos para la activación por vía clásica. Por esta razón, se piensa que constituye el primer frente de defensa del organismo. Cabe hacer notar que durante la activación de la vía alterna, el factor B asociado al C3b es hidrolizado por el factor D en dos fragmentos: Ba y Bb. Este hecho permite detectar fácilmente la activación de la vía alterna en una muestra de suero, por medio de una inmunoelectroforesis utilizando anticuerpos anti-factor B.

Activación del C1:

Como se mencionó anteriormente, la activación del complemento por vía clásica se inicia con la activación del C1. El C1 que está formado por tres proteínas denominadas C1q, C1r y C1s, inicia la cascada en el sitio en donde se debe producir la acción efectora ya que es el único componente que interacciona

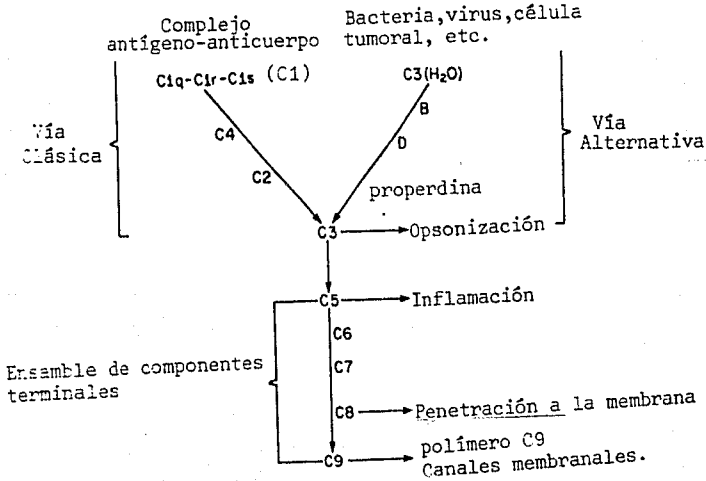


Fig. 17 Esquema de las vías clásica y alterna para la activación del sistema del complemento. (tomada de la ref. 71).

directamente con el anticuerpo unido a su antígeno. Esta interacción es mediada por el C1q, que tiene un peso molecular de 460,000 y que es el mayor de los tres subcomponentes (Fig. 18).

La molécula de C1q se compone de 18 cadenas polipeptídicas que forman seis cabezas globulares periféricas, unidas entre sí por brazos fibrilares que las reunen en un tallo central (Fig. 18). Los brazos fibrilares y el tallo central tienen una estructura colagénica y cada cabeza presenta un sitio de reconocimiento para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas (71). Los otros componentes del C1: C1r y C1s, son proenzimas similares que forman un tetrámero con dos subunidades de cada uno, que se mantiene unido electrostáticamente por calcio. Después de la activación del C1q, el C1r que tiene un peso molecular de 83,000, sufre un proceso no bien entendido de autoactivación que lo convierte en una esterasa con capacidad de activar enzimáticamente al C1s. A su vez, el C1s activado adquiere una actividad de esterasa de serina que le permite activar enzimáticamente al siguiente componente de la cascada: el C4 (Fig. 17).

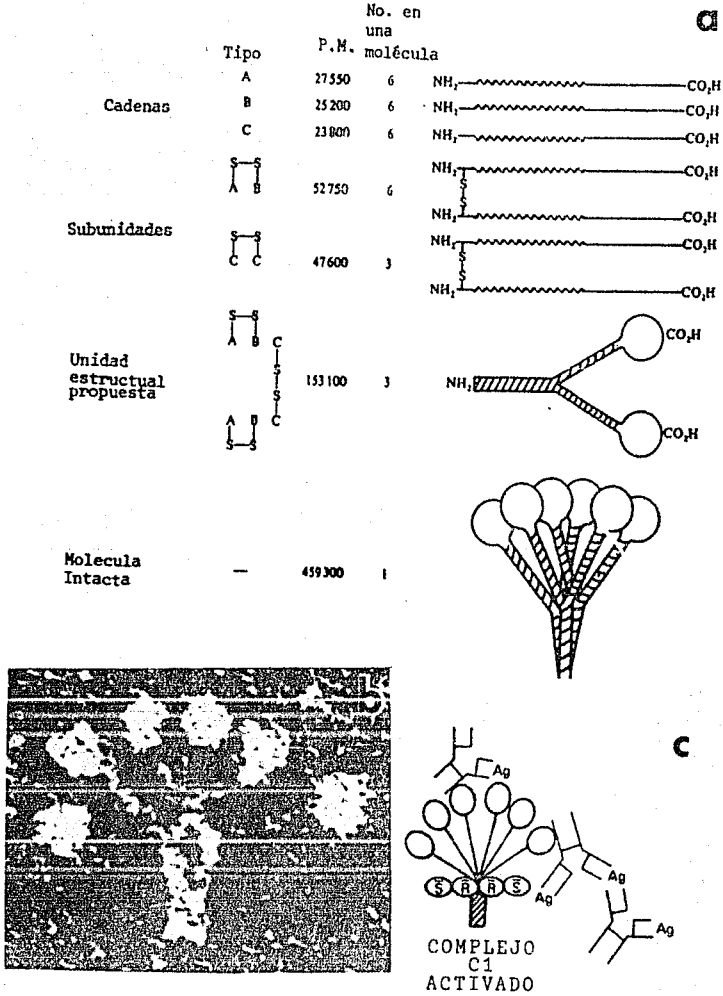


Fig. 18 Aspectos estructurales del C1q: a) Composición polipeptídica (tomada de la ref. 72); b) microscopía electrónica de transmisión mostrando un tallo y 6 cabezas globulares (tomada de la ref. 68); c) Esquema que describe simplificadamente la interacción de C1q-C1r-C1s con el complejo antígeno-anticuerpo (tomada de la ref. 72).