

188
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACION DEL ELISA E INMUNOELECTRO-
TRANSFERENCIA UTILIZANDO COMO ANTIGENOS:
EXTRACTO CRUDO, GLICOPROTEINAS Y
GLUTATION PEROXIDASA PARA LA OPTIMIZACION
DEL DIAGNOSTICO DE LA CISTICERCOSIS
HUMANA

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A:
ALMA OLIVIA SANCHEZ GONZALEZ

FALLA DE ORIGEN

1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

INDICE

I. INTRODUCCION

1. Cisticercosis	1
1.1 Ciclo de vida y morfología de <u>T. solium</u>	2
1.2 Clasificación de <u>T. solium</u>	6
1.3 Descripción de la enfermedad	6
2. Diagnóstico de la cisticercosis humana	8
2.1 Diagnóstico Imagenológico	9
2.2 Inmunodiagnóstico	11
2.2.1 Técnicas Inmunoenzimáticas	14
2.2.2 ELISA	15
2.2.3 Inmunolectrotransferencia (IET)	18
2.3 Antígenos	20
2.3.1 Extracto Crudo	20
2.3.2 Glicoproteínas	20
2.3.3 Glutación Peroxidasa	23
2.3.3.1 <u>T. crassiceps</u> como modelo experimental de cisticercosis	24
2.3.3.2 Similitud antigénica entre <u>T. solium</u> y <u>T. crassiceps</u>	27
3. Objetivos	30

II. MATERIAL Y METODOS

1. Preparación de antígenos	
1.1 Extracto Crudo	
1.1.1 Obtención del homogeno del Extracto crudo	30
1.1.2 Determinación y cuantificación de proteínas	31
1.2 Purificación de glicoproteínas	
1.2.1 Obtención de la fracción LL-P	31
1.2.2 Cromatografía de afinidad en LL-S	33
1.2.3 Determinación y cuantificación de LL-GP	34

I. INTRODUCCION

1. CISTICERCOSIS

La cisticercosis es una enfermedad parasitaria zoonótica, producida por la presencia de la larva de Taenia solium (Linnaeus, 1758), en los tejidos tanto del hombre como del cerdo. Esta enfermedad constituye un serio problema de salud pública en Latinoamérica principalmente en países como Brasil, México, Chile, El Salvador, Guatemala y Perú (OMS, 1981).

La cisticercosis es característica en aquellos países donde las condiciones higiénicas y sanitarias son precarias, y por lo tanto la insalubridad del medio son determinantes en el funcionamiento de sus mecanismos de transmisión, (Aluja y col., 1987).

A pesar de que no hay estudios epidemiológicos confiables que nos permitan establecer los valores reales de prevalencia e incidencia de la enfermedad, se considera válida la cifra de 1 X 1000 habitantes de prevalencia de neurocisticercosis en América Latina, (Cruz y col., 1986).

Los huevecillos de T. solium son microscópicos; miden aproximadamente 30 μm de diámetro (Laclette y col., 1982). Cuando el huevecillo es inmaduro está rodeado de una capa celular llamada vitelo, que es donde obtiene sus nutrientes y es el que está en contacto con el medio ambiente. Este vitelo rodea una estructura denominada embrióforo, que consiste en una serie de tabiques llamados bloques embriofóricos que se encuentran unidos entre sí por una proteína cementante. Más adentro se encuentra la membrana oncosferal que cubre al embrión exacanto, llamado así porque tiene tres pares de ganchos.

Cuando entra el huevecillo al estómago del cerdo o del hombre, es activado por la acción de las enzimas gástricas e intestinales; se liberan los bloques embriofóricos debido a que se rompe la proteína cementante y la membrana oncosferal, de esta manera se activa el embrión (Correa y col., 1991).

A nivel de la porción alta del intestino delgado es liberado el embrión (oncosfera) y atraviesa la pared intestinal del huésped y así entra al sistema circulatorio para alojarse principalmente en el Sistema Nervioso Central (SNC), músculos, corazón, hígado, tejido celular subcutáneo; en estos tejidos el embrión se enquistaba y constituye el cisticerco en el curso de 24 a 72 horas (Acha, 1986).

En este estadio Taenia solium presenta el aspecto de una vesícula ovalada y translúcida llena de líquido que consta de un cuerpo que aparece plegado en secciones longitudinales o espirales y que contiene a la larva con su escólex y ganchos

invaginados así como la membrana que limita la cavidad con zonas de distinto espesor constituidas por tres capas, una interna festoneada de tipo epitelial, la media formada principalmente por tejido de tipo conjuntivo y la tercera por tejido de granulación (Aluja y col., 1987).

La gran mayoría de los cisticercos obtenidos de un mismo cerdo tanto musculares como cerebrales, tienen dimensiones, forma y apariencia microscópica similar. Las vesículas están separadas del hospedero por una cápsula a la que generalmente no están adheridos y prácticamente todos los cisticercos tienen la capacidad de evaginar. Por el contrario la apariencia de los cisticercos que se encuentran en el cerebro humano es diversa, éstos generalmente tienen un tamaño y estados de conservación variable, tanto si se comparan entre sí varios cerebros parasitados por un solo cisticerco cada uno, o bien varios cisticercos de un mismo cerebro (Correa, 1985).

Para que un individuo se convierta en teniásico debe ingerir carne de cerdo infectada con cisticercos cruda o mal cocida, las membranas del mismo son digeridas debido a las enzimas y sales biliares del aparato digestivo y el escólex del cisticerco se adhiere a la pared intestinal y desarrolla una serie de proglótidos, de éstos los más alejados del mismo son los grávidos con una gran concentración de huevecillos cada uno y que al ser expulsados junto con las heces contaminarán el medio y de esta forma se continuará el ciclo biológico. (Lamothe, 1983).

CICLO DE VIDA
Taenia solium

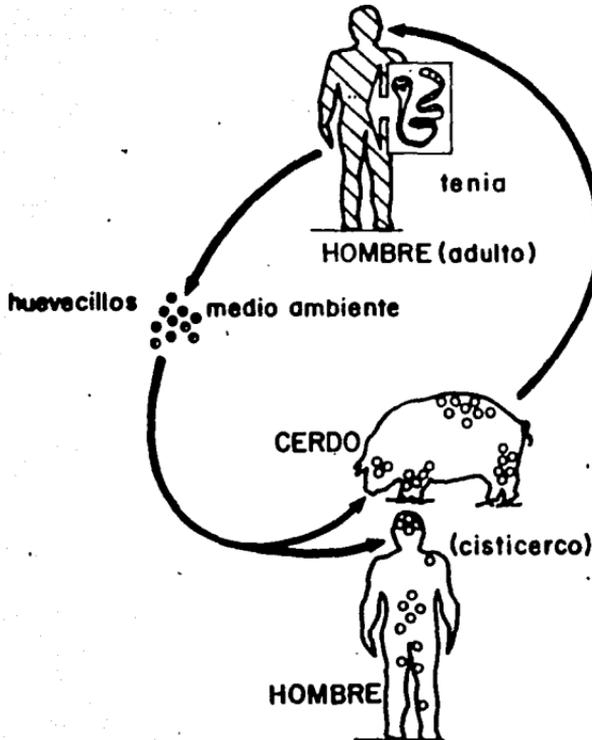


FIG. 1 CICLO DE VIDA DE *T. solium* (Sciutto, 1990).

1.2 CLASIFICACION DE Taenia solium.

PHYLUM	Platyhelminthes
CLASE	Cestoda
ORDEN	Cyclophyllidae
FAMILIA	Taenidae
GENERO	Taenia
ESPECIE	<u>Taenia solim</u> (Linnaeus, 1758)

1.3 DESCRIPCION DE LA ENFERMEDAD

La forma más conocida de infección por larvas de céstodos en el hombre, exceptuando la hidatidosis, es la cisticercosis, (Morera, 1989).

Existe un gran consenso por parte de los científicos para clasificar a la cisticercosis en dos grupos: sintomáticos y asintomáticos (Woodhouse y col., 1982).

Los pacientes que presentan síntomas se agrupan en cuatro categorías de acuerdo a la localización del parásito (Woodhouse y col., 1982):

1. Cisticercosis diseminada: Los parásitos están distribuidos en tejido subcutáneo, músculo estriado y vísceras en algunas ocasiones.
2. Oftalmocisticercosis: Los parásitos se localizan en ojo y estructuras anexas.
3. Neurocisticercosis: Los parásitos se encuentran en Sistema

Nervioso Central.

4. Cisticercosis mixta: Los parásitos están en más de una localización de las categorías anteriormente mencionadas.

El daño que produce el cisticerco al ser humano cuando se establece en el Sistema Nervioso Central (SNC) es variable; muchos de los casos de neurocisticercosis humana son asintomáticos. Es un hecho que muchos de los individuos que tienen cisticercos en el sistema nervioso central no presentan síntomas lo suficientemente graves como para asistir al médico y sólo son identificados la autopsia (Rabiela y col., 1982). Aun entre los casos sintomáticos hay una enorme heterogeneidad en los síntomas que pueden ser desde perturbaciones sensoriales o motoras leves, hasta la presencia de crisis convulsivas, cefalea y cuadro de hipertensión endocraneana, debido a la obstrucción de la circulación de líquido cefalorraquídeo y que en ocasiones provoca la muerte (Zenteno, 1982; Rabiela y col., 1982).

Debido a la magnitud de los daños ocasionados se considera que la neurocisticercosis tiene una gran importancia médica (Aluja y col., 1987). La sintomatología depende en mucho del número de quistes, su tipo (celuloso o racemoso), su localización y la respuesta inflamatoria que despiertan. De los dos tipos de cisticerco, el racemoso suele producir cuadros más severos, (Flisser, 1988).

La neurocisticercosis puede adoptar distintas formas según su localización, el estadio biológico del parásito (vivo o muerto), el grado y tipo de inflamación del tejido del huésped, las estructuras naturales afectadas y las consecuencias anatómicas y fisiopatológicas por la presencia del parásito que origina en el huésped (Aluja y col., 1987).

2. DIAGNOSTICO DE LA CISTICERCOSIS HUMANA

Debido a la heterogeneidad tan grande de la sintomatología de la cisticercosis en los seres humanos, el desarrollo de un método para su diagnóstico ha sido de gran interés para muchos científicos, de hecho se han diseñado procedimientos muy diversos para llevarlo al cabo (Correa y col., 1991).

El diagnóstico clínico es sumamente difícil por la gran variedad de síntomas que produce ésta enfermedad. Las manifestaciones neurológicas de la cisticercosis en el SNC son extremadamente variables y dependen de la edad, localización y número de larvas; pudiendo presentarse síndromes clínicos puros o mixtos, además de que la neurocisticercosis se encuentra entre el diagnóstico diferencial de numerosas enfermedades del Sistema Nervioso Central (Placencia y col., 1986). Es necesario el uso de métodos de laboratorio y de Neuroradiología para establecer un diagnóstico con certeza (Salguero, 1989).

2.1 DIAGNOSTICO IMAGENOLOGICO.

Las técnicas radiológicas han sido de gran ayuda para el diagnóstico de la cisticercosis humana y se han empleado desde hace varios años. Mc Arthur en 1934, citado por Placencia (1986), propuso que las calcificaciones encontradas en radiografías simples de cráneo en pacientes con cisticercosis podrían corresponder al escólex calcificado; Morrison en 1941-42, estableció además que la calcificación ocurría en la pared del quiste; apareciendo como un halo definido. Brailsford afirmó que el escólex puede ser visto como una área de relativa transparencia dentro del quiste y las apariencias radiográficas son debidas únicamente al depósito de calcio, primero dentro del contenido líquido y luego en los restos degenerados del parásito, que en última instancia podría localizarse en la pared del quiste. Dixon y Hargreaves en 1944, en sus estudios radiológicos de cráneo establecen criterios similares a los de Mc Arthur y Morrison. Brailsford además estableció que en los casos radiológicos sospechosos deberían tomarse radiografías simples de tejidos blandos (muslos y pantorrillas) que podrían revelar la presencia de cisticercos calcificados, (Dixon,1944).

Este tipo de métodos es útil porque marcan las zonas ocupadas del órgano afectado pero no permiten la localización fina de la lesión ni la confirmación de la etiología (Rodríguez-Carvajal y col., 1977).

En la década de los 80's, el mayor avance en neuroimagen fue la tomografía computarizada (TC) que permitió diagnósticos más certeros y tempranos en cuanto a ubicación; además la TC es la

base para reclasificaciones anatomotopográficas. La tomografía computarizada fue dada a conocer mundialmente en 1973 por Hounsfield y Ambrose (Rodríguez-Carvajal y col., 1982).

El diagnóstico por tomografía puede ser muy útil. La tomografía puede visualizar en algunos casos la forma, número y localización de las lesiones intracraneales cuando el cisticercos forma un contraste con el tejido inflamado o normal, o cuando hay calcificaciones presentes. Sin embargo por tomografía muchos casos escapan o dan resultados ambiguos que no pueden ser contundentes para un diagnóstico definitivo.

La TC revolucionó el diagnóstico de la neurocisticercosis pues permitió identificar muchos casos quísticos sin necesidad de intervenciones dolorosas al paciente (como la inyección de medio de contraste o aire en el cerebro) y mostró ser muy sensible en casos de localización subaracnoidea y parenquimatosa. Los pacientes con neurocisticercosis quística en los ventrículos son susceptibles de ser diagnosticados por éste método pero sólo con el uso de medios de contraste con el líquido cefalorraquídeo, (LCR), (Correa y col., 1991).

En fechas muy recientes se empezó a utilizar la resonancia magnética nuclear (RMN) para el diagnóstico de la cisticercosis humana. Esta técnica presenta una resolución mucho mayor a cualquier otra pues proporciona una imagen comparable a un corte histológico con lo que se puede localizar una lesión y determinar su etiología con alta precisión. Desafortunadamente, éste método

de diagnóstico es inaccesible para la mayoría de la población debido a su costo elevado (Correa y col., 1991).

Sin embargo debido a la sintomatología y a que las técnicas radiológicas generalmente no son concluyentes se requiere de las técnicas inmunológicas para dar un diagnóstico certero ya que pueden proporcionar valiosa información con un diagnóstico sensitivo y específico (Cho y col., 1986).

2.2 INMUNODIAGNOSTICO DE LA NEUROCISTICERCOSIS HUMANA.

Desde el punto de vista del diagnóstico el problema de la cisticercosis ha sido abordado desde hace muchos años. Weinberg en 1909, comenzó a practicar en los cerdos parasitados la reacción de fijación del complemento en sangre, utilizando como antígeno el extracto de cisticerco, sin lograr la presencia de anticuerpos en el suero de pacientes infectados. En 1911, Moses, empleando extracto acuoso de cisticercos obtuvo resultados positivos en la reacción de fijación del complemento. En 1919, Guccione practicó, también con éxito, la misma reacción (En: Nieto; 1956).

En los últimos años ha habido un considerable avance en el desarrollo de las pruebas inmunodiagnósticas de enfermedades parasitarias (Walls y Shantz, 1986).

Para el diagnóstico inmunológico de la cisticercosis se han utilizado pruebas cualitativas y cuantitativas: las primeras sólo indican la existencia de anticuerpos específicos que reaccionan

con el antígeno correspondiente. En este tipo de pruebas es necesaria una cantidad importante de inmunoglobulinas específicas para que las reacciones (de precipitación), se pongan de manifiesto. Son poco sensibles por lo que prácticamente ya no se utilizan (Quiroz, 1989).

Entre las pruebas inmunológicas cualitativas se encuentran: fijación del complemento (RFC), la inmunolectroforesis (IEF), inmunofluorescencia indirecta (IFI), contraelectroforesis (CIEF), y la doble inmunodifusión (DID), principalmente.

En las pruebas cuantitativas mediante diluciones del suero y/o líquido cefalorraquídeo (LCR) problema, se pueden valorar la cantidad de anticuerpos específicos, para lo cual se requiere estandarizar la técnica en la población de estudio, y que a partir de los títulos de dilución se tome como parámetro de positividad un valor estándar, punto de corte, (Quiroz, 1989).

El hallazgo de anticuerpos séricos anticisticerco no significa necesariamente que el parásito esté alojado en el sistema nervioso del hospedero, ni siquiera que esté vivo en el momento de la toma de la muestra, ni tampoco que haya jamás existido como metacéstodo. Ciertamente podría estar localizado en algún otro órgano o tejido, o haber sido eliminado por los mecanismos de defensa del hospedero o éste haber estado infectado por el parásito adulto y haber respondido inmunológicamente. La presencia de anticuerpos anticisticerco en el suero solamente demuestra que el huésped ha tenido contacto con algún estadio del

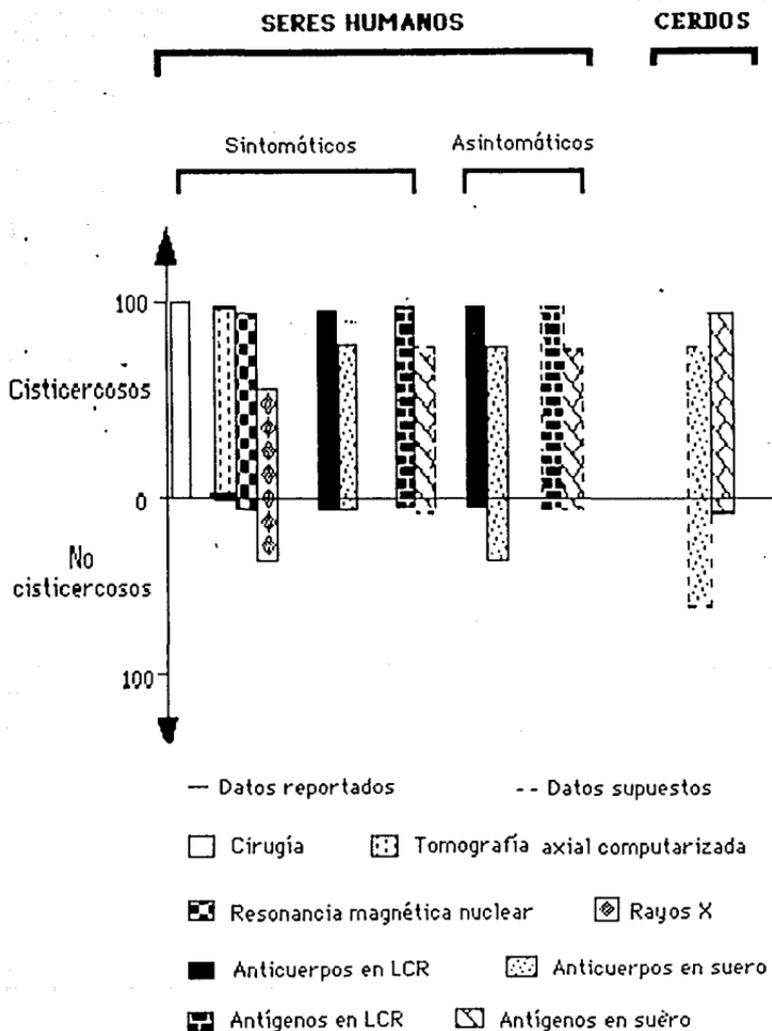


FIG. 2 DIAGNOSTICO DE LA CISTICERCOSIS HUMANA Y PORCINA

(TOMADO DE CORREA Y COL., 1991).

parásito en algún momento. Sería difícil dilucidar el significado de una serología positiva en un individuo asintomático y con una tomografía de cráneo de aspecto normal. Por otra parte, en un enfermo neurológico con síndrome de hipertensión endocraneal o crisis epilépticas, la serología positiva fortalece el diagnóstico de neurocisticercosis (Larralde, 1989).

2.2.1 TECNICAS INMUNOENZIMATICAS

Las técnicas inmunoenzimáticas se basan en que las reacciones antígeno-anticuerpo pueden ser visualizadas por medio de enzimas que al reaccionar con su sustrato se produce un viraje colorido en el sitio de la reacción. Cuando reaccionan un antígeno y un anticuerpo, su unión es de naturaleza química y su combinación tiene un alto grado de especificidad aunque esta reacción no comprende la totalidad de las moléculas de uno y otro componentes (Ortiz, 1987).

Las reacciones antígeno-anticuerpo se emplean en la práctica médica para llegar al diagnóstico etiológico de infecciones producidas por microorganismos. Además de lo anterior es posible titular tanto la intensidad de la infección como los anticuerpos. Si se tienen anticuerpos de especificidad conocida, puede

llegarse a la identificación inmunológica de microbios aislados de los pacientes y si se tienen antígenos conocidos, tanto bacterianos como de otros grupos, es posible determinar anticuerpos circulantes en el suero o fijos en las biopsias mediante el empleo de las técnicas inmunoenzimáticas (Ortiz,1987).

2.2.1.1 ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO EN FASE SOLIDA (ELISA).

Este ensayo inmunoenzimático es empleado comunmente para detectar anticuerpos o antígenos utilizando para ello reacciones enzima-sustrato

El ELISA emplea antígenos o anticuerpos conjugados de tal manera que la actividad inmunológica y enzimática de cada componente se mantiene. Este ensayo dá resultados objetivos y es extremadamente sensitivo (Voller y col., 1976).

Es esencial que tanto la actividad enzimática como la actividad inmunológica se preserven. La cantidad de enzima conjugada es determinada por la velocidad de reacción del sustrato apropiado. Las enzimas tienen sustratos que son fácilmente detectados usando productos para colorear o fluorescentes (Rosen y col., 1989).

La optimizacion de la técnica es la clave para la alta precisión en ensayos inmunoenzimáticos y esto puede ser adecuado únicamente empleando preparaciones de referencia. En pruebas para

anticuerpos una muestra de referencia consiste de un conjunto de muestras de un grupo de individuos con un alto título de anticuerpos (Voller y col.,1976).

Algunas de las enzimas que se han usado en el ELISA son la fosfatasa alcalina, peroxidasa, la lisozima y la glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa. Desde luego, es necesario que la enzima que se vaya a pegar al antígeno o al anticuerpo no se encuentre presente en los materiales biológicos, ya que estos pueden interferir en la reacción. Para conjugar la enzima seleccionada con el antígeno o con el anticuerpo se suele usar glutaraldehído, que forma un puente entre ambos materiales (Ortiz,1987).

Otra ventaja importante con que cuenta el ELISA es que tiene la posibilidad de cuantificar la concentración del antígeno con más precisión que otros métodos inmunoenzimáticos (Télez-Girón y col,1989).

El ELISA empleado para el diagnóstico de la neurocisticercosis en los últimos años se ha considerado como el método más sensible y menos variable pues se ha señalado que puede detectar el 85% de los casos cuando se emplea suero como muestra y el 95% si se usa líquido cefalorraquídeo y el 100% si se emplean ambas muestras de un mismo individuo o si se busca anti-inmunoglobulinas de las clases IgG a IgA. Todo esto empleando extracto crudo (Plancarte y col.,1989).

Otro punto a considerar es el problema de los costos de ésta

E L I S A



ADSORBER ANTIGENO A PLACA

LAVAR



AÑADIR EL ANTICUERPO QUE ACTUE
CON EL ANTIGENO.

LAVAR



AÑADIR UNA ENZIMA ACOPLADA A
UNA ANTIGLOBULINA QUE ACTUE CON
EL ANTICUERPO

LAVAR



AÑADIR SUSTRATO.

FIG. 3 DIAGRAMA QUE VIZUALIZA LA TECNICA DE ELISA
(Voller y Col., 1976).

técnica. No obstante que se emplean reactivos de importación, que se requiere de un espectrofotómetro, y que la prueba debe efectuarse por duplicado, buscando anticuerpos de la clase IgG e IgA, el costo de un estudio es de aproximadamente de 2 dolares (Plancarte y col., 1989).

2.2.1.2 - INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET)

La inmunolectrotransferencia es una técnica en la cual los anticuerpos o los antígenos específicos son usados para identificar partículas antigénicas (o anticuerpos) en una mezcla de proteínas que ha sido resuelta y transferida a una membrana. Las proteínas son separadas por una técnica apropiada, usualmente la electroforesis en gel de poliacrilamida.

La transferencia es llevada al cabo por una corriente eléctrica a un papel de nitrocelulosa. La membrana de nitrocelulosa es incubada con anticuerpos específicos contra el antígeno de interés. Los anticuerpos sueltos son lavados y la posición de los anticuerpos acoplados es revelada con una técnica apropiada a lo cual se le llama adición del sustrato. Esta técnica también es conocida como "Western blotting" porque tiene similitudes con el "Southern blotting" y "Northern blotting" (Rosen y col., 1989).

Tsang y colaboradores en 1989 informaron de un método diagnóstico para la cisticercosis basado en la inmunolectrotransferencia y empleando como antígeno glicoproteínas purificadas a partir de larvas de Taenia solium provenientes en parte de una cromatografía de afinidad a través de lentil-lectina Sefarosa la cual tiene una sensibilidad del 98% y una especificidad del 100%. En dicho trabajo Tsang evaluó 532 sueros y 46 líquidos cefalorraquídeos los cuales pertenecían a pacientes con tres diferentes parasitosis confirmadas: Echinococcus granulosus, Echinococcus multilocularis y Taenia solium y menciona que las muestras de pacientes con T. solium reconocen siete bandas específicas de glicoproteínas, estas bandas diagnósticas fueron registradas como GP50, GP42-39, GP24, GP21, GP18, GP14 y GP13. Las letras GP denotan la naturaleza glicoproteica de este antígeno y los números corresponden a su respectivo peso molecular, analizados en geles de poliacrilamida. Para el diagnóstico de la cisticercosis no es necesario que el paciente reconozca las siete bandas, es suficiente si la muestra sospechosa reacciona con al menos una de las siete bandas para ser considerado como positivo o tener la certeza de que el paciente ha estado en contacto con el agente etiológico.

Una gran ventaja que tiene la inmunolectrotransferencia cuando se emplean glicoproteínas es que no se presentan reacciones cruzadas (Tsang y col., 1989).

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

EMPLEANDO

GLICOPROTEINAS.

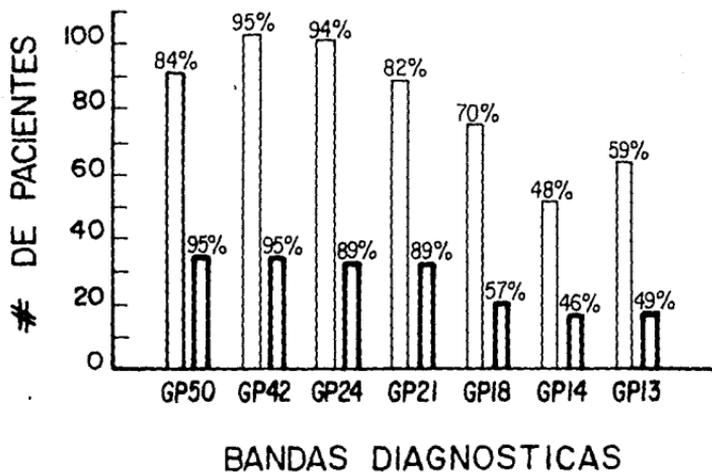


FIG. 4 FRECUENCIAS DE RECONOCIMIENTO ANTIGENICO DE PACIENTES CON NEUROCYSTICERCOSIS PARA TODAS LAS BANDAS DIAGNOSTICAS INDIVIDUALES (Tsang y Col., 1989).

2.3 ANTIGENO

El antígeno es una sustancia que puede desencadenar una respuesta inmune y que puede reaccionar específicamente con los anticuerpos correspondientes o células T receptoras (Rosen y col., 1989).

2.3.1 EXTRACTO CRUDO

Los preparados de antígeno crudo detectan anticuerpos anti-larva de céstodo en animales, generalmente y pueden mostrar un alto grado de sensibilidad en algunas pruebas (Yong y col., 1978), pero las reacciones cruzadas con otros parásitos hacen que el extracto crudo sea menos útil para el diagnóstico.

Espinoza y col., 1982 señalan el uso y purificación de un extracto crudo de Taenia solium, que por análisis en geles de poliacrilamida, con sulfato duodecil de sodio (SDS) y mercaptoetanol, tiene aproximadamente 20 bandas proteicas.

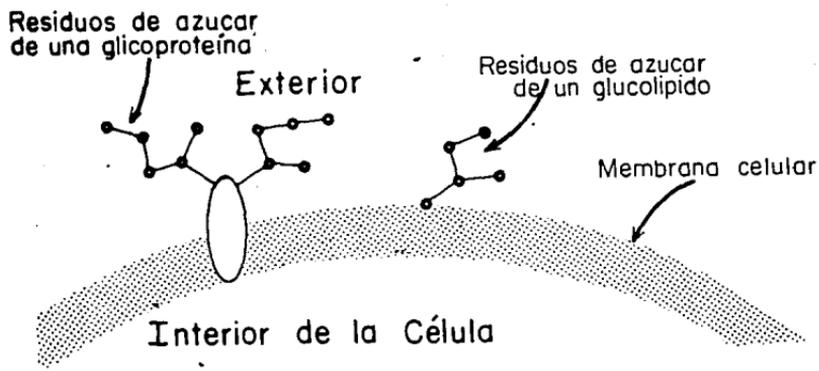
2.3.2 GLICOPROTEINAS

Las membranas de las células eucarióticas contienen entre un 2 y un 10% de carbohidratos, en forma de glicolípidos y glicoproteínas. Los glicolípidos de los organismos superiores son derivados de la esfingosina con uno o varios residuos de azúcar.

En las proteínas de membrana una o más cadenas de azúcar

están enlazadas a las cadenas laterales de serina, treonina o asparagina de la proteína, normalmente a través de la N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina. Una posible función de los grupos de carbohidrato es orientar las glicoproteínas en las membranas. Al ser los azúcares altamente hidrofílicos, la porción glicídica de las proteínas y los glicolípidos tiende a situarse en la superficie de la membrana más que en el núcleo hidrofóbico. La fracción glicídica de las glicoproteínas de membrana, ayuda a mantener el carácter asimétrico de las membranas biológicas. (Stryer, 1985).

Los azúcares de las superficies celulares también son importantes en el reconocimiento intracelular. La interacción de diferentes células para formar un tejido y la detección de células extrañas por el sistema inmunitario de los organismos superiores son ejemplos de procesos que dependen del reconocimiento de una superficie celular por otra. Los azúcares tienen grandes posibilidades de diversidad estructural. Es posible una variedad enorme de azúcares porque (1) los monosacáridos pueden enlazarse mutuamente a través de varios grupos hidroxilo, (2) la unión del C-1 puede tener configuración α o β y (3) es posible una amplia ramificación (Stryer, 1985).



· FIG. 5 GLICOPROTEINAS DE MEMBRANA.

(Stryer, 1985).

2.3.3 Glutación Peroxidasa.

Las proteínas desempeñan papeles cruciales en prácticamente todos los procesos biológicos. Una de las funciones de mayor alcance y significado es la catálisis enzimática. Casi todas las reacciones químicas en los sistemas biológicos están catalizadas por macromoléculas denominadas enzimas. La mayoría de las enzimas poseen un enorme poder catalítico. Las enzimas normalmente aumentan las velocidades de reacción al menos un millón de veces además no alteran los equilibrios de reacción y reducen la energía de activación de las reacciones químicas (Stryer, 1985). La glutación peroxidasa es un ejemplo de las miles de enzimas que existen en los seres vivos.

Mills en 1957 demostró la presencia de una peroxidasa en eritrocitos de mamíferos la cual por catálisis rompe el peróxido de hidrógeno dando como resultado glutación reductasa y un hidrógeno donador. En el eritrocito la glutación peroxidasa reductasa fue purificada por medio de una cromatografía de intercambio aniónico (Mills, 1958).

La primera GSH-Px que se purificó y caracterizó por primera vez a partir de un parásito fue la de Taenia taeniaeformis.

La Glutación Peroxidasa, así como algunas otras enzimas, se consideran de crucial importancia para muchos parásitos, pues ayudan a evadir algunos ataques durante el proceso inflamatorio realizados por los leucocitos del hospedero. Cuando se analiza esta enzima en un gel en gradiente de poliacrilamida con duodecilsulfato de sodio (SDS) en condiciones no reducidas esta banda tiene 26,000 daltons (D) y en condiciones reducidas esta banda consta 24,900 D. Su peso molecular es de 45,000 D en geles

de filtración. A un pH 2 se inhibe el 100% de la actividad enzimática de la GSH-Px, mientras que a pH 3 únicamente el 30%. A un pH de 4 a 9 no disminuye su actividad enzimática pero a un pH de 10 lo hace en un 25%. Las variaciones de temperatura también modifican la actividad enzimática. (Leid y col., 1989).

Es de gran interés desde el punto de vista biológico el hecho de que los parásitos, y los agentes extraños a un organismo en general, sobrevivan a la respuesta inmune que éstos provocan, no obstante, los parásitos sobreviven produciendo incluso una afección crónica.

2.3.3.1 Taenia crassiceps como modelo experimental de cisticercosis.

Ya se han mencionado las técnicas que se emplean con mayor frecuencia para el diagnóstico de esta enfermedad, sin embargo, debido a la creciente inaccesibilidad de los antígenos, en ocasiones es necesario emplear modelos experimentales para estudiar algunas parasitosis. Leid en 1989, menciona que desde hace 18 años la infección por la forma adulta de Taenia taeniaeformis, en ratones, ha servido como un excelente modelo para el estudio de la cisticercosis y la hidatidosis. En el caso de T. solium un modelo empleado sobre todo en los últimos años es el de Taenia crassiceps (Cardenas y col., 1989; Larralde y col., 1989; Sciutto, 1990;).

Rudolphi en 1819 describió el cisticerco de Taenia

crassiceps, el cual infecta naturalmente a pequeños roedores y al topo. La larva por infección natural se desarrolla generalmente en forma subcutánea o en la cavidad pleural y menos frecuente en la cavidad abdominal. El metacéstodo es una vesícula casi esférica de 5 X 3 mm con una membrana translúcida blanquecina llena de un fluido vesicular, presenta un escólex semejante al de T. solium, con cuatro ventosas y dos coronas de ganchos rostellares que varían en número de 32 a 36, aunque no son uniformes, algunos son grandes de 155 a 187 μm y otros pequeños de 107 a 142 μm , esta característica es propia de la especie (Freeman, 1962).

La reproducción asexual se lleva al cabo por gemación múltiple aproximadamente en la tercera semana de iniciada la infección experimental; algunos presentan gemas endógenas y exógenas en el polo opuesto al escólex. Las gemas exógenas son las más comunes y llegan a estar unidas al cisticerco hasta 30 o 40 gemas, su progenitor es alargado y diferenciado; cuando las gemas alcanzan aproximadamente los 2 mm se desprenden y forman nuevos individuos, la mayoría de estos presentan una muesca, región que da origen al escólex y al poro de evaginación, ésta no se distingue en el metacéstodo en desarrollo temprano, originado directamente del huevo; algunos de los metacéstodos no desarrollan por completo el escólex o lo hacen cuando están gemando. Las pocas gemas que quedan unidas al cisticerco progenitor si lo desarrollan. Los cisticercos con escólex invaginado varían de 2 X 1 mm a 6 X 4 mm (Freeman, 1962).

Freeman en 1962 propone llamar "gemas" a todos aquellos

metacéstodos con muesca o con un escólex pequeño, o no diferenciado sobre el poro del mismo y que estén unidas al cisticerco progenitor, "cisticerco" a las larvas con ventosas y roestelo desarrollado pero que carezca de gemas unidas a él, "progenitor" a los cisticercos con gemas unidas a él, y "progenitores de larvas gemantes" a la fuente original de gemas, ya sea al cisticerco originado por un huevo o los que fueron inyectados al hospedero intermedio.

El ciclo de vida es similar al de T. solium, en la naturaleza se inicia cuando el ratón ingiere huevecillos presentes en el medio ambiente contaminado con heces de pequeños carnívoros -zorros y gatos, entre otros, quienes portan la fase adulta en su intestino-. (Freeman, 1962).

Existen varias cepas de cisticercos de Taenia crassiceps, las más comúnmente empleadas son la ORF (Freeman, 1962) y la HYG (Sally y col., 1976). La cepa ORF fue la primera que se aisló y se mantuvo en el laboratorio desde 1952 (Freeman, 1962). El cisticerco se caracteriza por ser una vesícula llena de líquido sin escólex o con reminiscencias del mismo, la que perdió la capacidad de completar su ciclo sexual, sólo se reproduce asexualmente por gemación. La cepa ORF tiene una capacidad reproductiva más alta que HYG, posiblemente resultado de una mutación genética (Sciutto, 1990). La cepa HYG (Sally y col., 1976) es la que mantiene sus características estructurales normales, con escólex y doble corona roestelar con cuatro ventosas, y la capacidad de completar el ciclo sexuado, también se puede reproducir asexualmente (Sally y col., 1976). Ambas cepas se

pueden mantener en el laboratorio por medio de pases intraperitoneales de ratón a ratón.

2.3.3.2 Similitud antigénica entre Taenia solium y Taenia crassiceps

Larralde y colaboradores en 1989, demostraron que el cisticerco de Taenia solium y el de Taenia crassiceps comparten gran cantidad de antígenos pues debido a la Inmunoelectrotransferencia (IET) se pudieron detectar reacciones cruzadas entre éstos céstodos, mediante el uso de proteínas de líquido vesicular de cisticercos de T. crassiceps como antígeno, revelado con sueros de pacientes con neurocisticercosis. Las bandas obtenidas de las reacciones cruzadas de anticuerpos anti-cisticerco de los sueros con el líquido vesicular de T. crassiceps son semejantes a las que se presentan en las IET que emplean como antígeno el extracto total de cisticercos de T. solium revelados con sueros de enfermos.

Taenia crassiceps pertenece al igual que Taenia solium al Phylum Platyhelminthes, Clase Cestoda, Orden Cyclophilidae, Familia Taenidae, Género Taenia (Zeder, 1800; Rudolphi, 1810).

CICLO DE VIDA
Taenia crassiceps

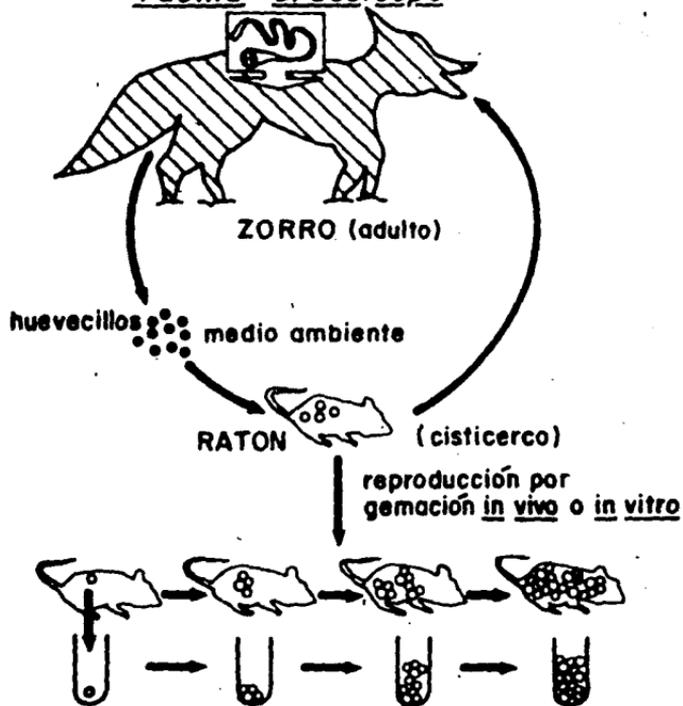


FIG. 6

CICLO DE VIDA DE T. crassiceps (Scutto, 1990).

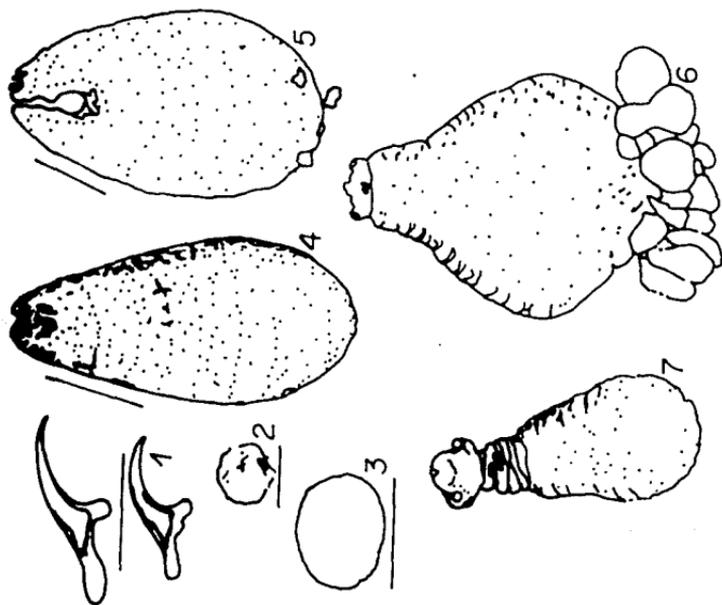


FIG. 7 MORFOLOGIA DEL METACESTODO DE T. crassiceps
(Sciutto, 1990).

3. OBJETIVOS.

1. Disminuir el tiempo de procesamiento del ELISA original (ELISA-rápido) sin detrimento en su sensibilidad y especificidad.

2. Evaluar a la Glutación Peroxidasa como un candidato para mejorar el inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana.

3. Comparar una técnica de ELISA Indú con nuestro ELISA-rápido.

II. MATERIAL Y METODOS

1. PREPARACION DE ANTIGENOS--

1.1 EXTRACTO CRUDO

1.1.1 Obtención del extracto total

El extracto total fué preparado según el método descrito por Espinoza y colaboradores en 1981, con algunas modificaciones. Se aislaron larvas de Taenia solium a partir de carne de cerdo infectado de manera natural.

El fluido vesicular fué descartado, posteriormente el resto de los metacéstodos (escólex y estróbilo) se lavaron varias veces con amortiguador de fosfatos de sodio (0.015M NaCl, 0.0014M KH_2PO_4 , 0.02M NaHPO_4), (AFS), eliminando tanto los cisticercos calcificados como los restos de carne de cerdo que pudieran haber quedado.

Se eliminó el exceso de amortiguador de fosfatos y se le agregó KCl 3M (J.T.Baker), posteriormente las larvas se homogenizaron con ayuda de un Polytron (KINEMATICA, GmbH, Switzerland) equipado con un vástago PT-20 ST, la homogenización se realizó primero con pulsaciones durante un minuto separados por un minuto de pausa y manteniendo el homogenizado en frío.

El homogenado resultante se agitó lentamente durante toda la noche a 4°C. Se centrifugó a 30 000 g durante una hora a 4°C.

1.1.2. Determinación y cuantificación de proteínas.

El sobrenadante resultante de la centrifugación se dializó exhaustivamente contra AFS y se le determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (1951) descrito en el apéndice.

Se elaboró una curva patrón con 10, 20, 50 y 100 µg/ml de albúmina sérica bovina. Se interpolaron las densidades ópticas experimentales en la curva patrón y se calcularon sus concentraciones. A la curva patrón se le calculó la pendiente (m), ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación lineal para comprobar que su comportamiento fuera lineal y constante y a la vez se pudieran interpolar los valores experimentales en la misma. La concentración proteica del sobrenadante se determinó en tres volúmenes diferentes.

Posteriormente el sobrenadante se dividió en alícuotas y se guardó a 0°C.

1.2 PURIFICACION DE GLICOPROTEINAS (Tsang, 1989).

1.2.1 Obtención de la fracción LL-P.

Se obtuvieron 37.67 gramos de cisticercos separados de la carne de cerdo los cuales se almacenaron a -70°C hasta su uso. Todos los cisticercos obtenidos se embebieron en 150 ml de amortiguador de sacarosa/HEPES/PMSF (0.05M HEPES-NaOH, 0.25M sacarosa, 2mM ácido-etilen-dinitrotetra-acético EDTA, 5mM

parametil-sulfonil-fluoro PMSF; pH 7.20) a 37°C.

Debido a la labilidad del PMSF a hidrolisarse en soluciones acuosas a pH < 7.0, todas las veces en que se utilizó PMSF se siguió el siguiente procedimiento: se preparó una solución "stock" de 100mM PMSF en isopropanol absoluto (2-propanol) que fué mantenido a baja temperatura. El amortiguador final de PMSF 5 mM fué usado en los siguientes 20 minutos después de su preparación.

Los cisticercos más fueron homogenizados en HEPES con un Polytron de manera similar a la anteriormente descrita.

Posteriormente el homogenado fué centrifugado a 500g por 20 minutos. El sobrenadante resultante fue cuidadosamente removido con una jeringa sin aguja a la cual se le colocó en lugar de la aguja una manguera de un diámetro muy pequeño y se mantuvo en refrigeración.

El precipitado de todos los tubos se combinó, y se le agregó cinco volúmenes de amortiguador de sacarosa/HEPES/PMSF posteriormente se homogenizó y centrifugó a 500 g por 20 minutos.

El sobrenadante resultante fué combinado con el sobrenadante de la centrifugación anterior y se le denominó sobrenadante 0.5 KG. El precipitado denominado 0.5 KG ppt fué desechado.

El sobrenadante 0.5 fue centrifugado a 250 000g por dos horas.

La capa lipídica que quedó en el sobrenadante fué retirada cuidadosamente con papel absorbente.

El precipitado resultante fué suspendido en 10-20 ml de

amortiguador de UREA/PMSF (8M urea, 0.05M Tris-HCl y 5 Mm PMSF; pH 8.00) posteriormente se centrifugó a 48 000 g durante una hora. Más tarde se dializó contra Tris-HCl durante toda la noche para eliminar el exceso de urea, a esto se le llamó 250 KG PS.

El sobrenadante que quedó después de la centrifugación a 250 000 g así como el sobrenadante de la centrifugación a 48 000 g fueron concentrados por ultrafiltración a través de una membrana YM-10 (AMICON) y llamada 250 KG SUP.

Estas dos fracciones (250 KG PS y 250 KG SUP) fueron combinadas y se formó la fracción llamada LL-P.

1.2.2 Cromatografía de afinidad en LL-S.

Se elaboró una columna de 5 cm de diámetro por 30 cm de alto con 50 ml Sefarosa 4B lentil-lectina. La capacidad de trabajo de esta columna fue por cada ml de lectina fue preparado 3 mg de proteína.

Antes de usar la columna de lectina se lavó dos veces con amortiguador base (NaCl 0.2M, Tris 0.05M pH 8.0), T-N, y una alta concentración del amortiguador de elusión (0.2M α -metil manósido, 0.2M NaCl y 0.05M Tris-HCl; pH 8.0).

Las muestras equilibradas en T-N fueron pasadas dentro de la columna y posteriormente el material que no se absorbió a la lentil-lectina fue lavado con 8 volúmenes de NaCl 0.2M Tris 0.05M pH 8.0. Las fracciones obtenidas fueron denominadas LL-0.00M. Debido a que las glicoproteínas son las que se pegan a la lentil-lectina tuvieron que ser eluidas primero con 5 volúmenes de 0.05M y después con 0.2M de soluciones de α -metil manósido

en 0.2M NaCl y 0.05 M Tris-HCl (pH 8.0).

La fracción eluida con 0.2M de α -metil manósido, llamada LL-GP contenía las glicoproteínas y sirvió como antígeno para realizar la técnica de la inmunoelectrotransferencia.

Se concentró la LL-GP por ultrafiltración con presión negativa (nitrógeno gaseoso en concentradores de amicón) a través de una membrana YM-10; la cual permitió el paso de moléculas de hasta 10,000 daltons.

Se determinó el volumen final después de la ultrafiltración y se almacenó en nitrógeno líquido hasta su uso. Para su conservación a las LL-GP se les agregó glicerol en una proporción de 0.77 ml de glicerol por ml de LL-GP.

1.2.3. Determinación y cuantificación de proteínas.

La concentración de glicoproteínas de LL-GP fué determinada de acuerdo al método de Lowry, 1951; descrito en el apéndice.

Los valores de densidad óptica obtenidos fueron extrapolados en la curva patrón descrita anteriormente y se obtuvo su concentración.

1.2.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis en geles de acrilamida permite la separación de proteínas con diferente peso molecular y/o carga eléctrica. Este método es muy útil por tanto para la identificación de los componentes de una mezcla de proteínas así como para su purificación.

En el presente trabajo se usaron dos tipos de geles los

analíticos y los preparativos. Los primeros solo se prepararon con un grosor de 0.75 mm con una concentración de 10% el gel separador y 5% el concentrador. Para la preparación de éstos geles siempre se emplea un peine con varios carriles y así poder colocar varias muestras con las cantidades que nosotros deseemos.

Los geles preparativos pueden hacerse con diferentes grosores en este caso se emplearon geles con 3 mm de grosor.

1.3 PURIFICACION DE LA GLUTATION PEROXIDASA (GSH-Px).

1.3.1 Modelo experimental

Se emplearon larvas de Taenia crassiceps de la cepa ORF mantenida en el laboratorio por infección artificial en ratones (Mus musculus) hembras cepa Balb/c de cuatro a seis semanas de edad.

Se aprovechó la capacidad reproductiva asexual de éstos metacéstodos para el mantenimiento de la cepa, la cual se realizó como lo indica Freeman en 1962, mediante pases intraperitoneales de larvas a ratones sanos. Se extrajeron los cisticercos de la cavidad abdominal de un ratón que presentaba una infección de aproximadamente 30 días, los parásitos se colocaron en Tris (hidroximetil) aminometano (Sigma)-ácido clorhídrico (Tris-HCl) 0.01M pH 8 a 4°C. Se lavaron cinco o seis veces en la misma solución, eliminandose tanto los parásitos calcificados como los restos del hospedero. Las series de pasos intraperitoneales se hicieron inyectando en la cavidad peritoneal de cada ratón 10 a 20 larvas con una jeringa de 1 ml a través de una aguja de 20x25 mm.

1.3.2 Obtención del homogenado.

Se colectaron 160 ml de larvas de Taenia crassiceps del peritoneo de cuatro ratones previamente infectados, y se colocaron en Tris-HCl en un vaso sumergido en hielo para conservarlos a baja temperatura, se lavaron con la misma solución entre cinco y seis veces. Se les agregó KCl 3.0 M disuelto en Tris-HCl en una proporción de 1 ml de ésta solución por cada 3 ml de cisticercos. Los parásitos se homogenizaron como se describió anteriormente en la obtención de homogenados. Esta acción se repitió entre seis y ocho veces hasta quedar perfectamente homogenizados. El extracto se mantuvo en agitación lenta durante 24 horas a 4°C, después se centrifugó (Beckman J2-21) a 20,000 r.p.m. durante 60 minutos a 4°C. El precipitado se descartó y el sobrenadante se dializó exhaustivamente durante 24 horas a 4°C contra cinco litros de Tris-HCl con azida de sodio (Sigma) con cuatro cambios del mismo amortiguador. Posteriormente se centrifugó a 20,000 r.p.m. durante 60 minutos a 4°C, nuevamente se descartó el precipitado y el sobrenadante constituyó el extracto total de cisticercos de T. crassiceps: el cual se mantuvo en alicuotas a 4°C hasta su uso.

1.3.3 Cromatografía de intercambio catiónico.

Para obtener semipura a la Glutación Peroxidasa se realizó una cromatografía de intercambio catiónico en QAE-Cellex. Una columna de 3 X 30 cm con un volumen de 90 ml equilibrada con Tris-HCl 0.01 M pH 8 fue empleada para correr 150 ml de extracto

total de Taenia crassiceps después de lavar exhaustivamente el material no absorbido a la resina, se conectó a la columna un gradiente salino de 0 - 20 mS de conductividad para desprender el material adsorbido a la QAE-Cellex.

Las fracciones obtenidas en esta parte se leyeron a 280 nm y una de cada cinco. En seguida se procedió a lavar la columna con dos litros de Tris-HCl con la finalidad de eliminar el exceso de sal. Todas las fracciones se guardaron en refrigeración.

A las fracciones con actividad de GSH-Px resultantes de las dos primeras cromatografías de T. solium se les midió la conductividad, lo cual nos indicó la calidad de la actividad de la enzima.

1.3.4 Ensayo enzimático.

Para determinar la actividad enzimática de la Glutatión Peroxidasa se realizó un ensayo específico siguiendo el método de Plagia y Valentine (1967), brevemente consistió en determinar en una de cada cinco fracciones resultantes de la cromatografía de intercambio catiónico, ayudarse con amortiguador de ensayo (GSH, NADPH, GSSG-R y amortiguador de fosfato de potasio 0.25 M, pH 7.0) e hidroperóxido de Cumene. El testigo positivo consistió en adicionar a los reactivos anteriormente mencionados GSH-Px de Sigma. Cada tubo se leyó en el espectrofotómetro a 366 nm, el cual fué previamente calibrado a ceros con el testigo positivo. Después se leyó el testigo negativo y posteriormente las fracciones. En todos los tubos en los que la densidad óptica fué menor al valor de absorbancia obtenido en el testigo negativo, se

consideró que contenía a la enzima.

1.3.5 Electroforesis en geles preparativos de poli(acrilamida).

Se preparó un gel en tabla separador al 10% y un concentrador al 5% con diez carriles éste último, ambos de acrilamida con 0.75mm de espesor, siguiendo la técnica de Laemmli(1970). Las muestras se manejaron como se describe en el apéndice. En el primer carril se colocó el control de peso molecular bajo (Bio-Rad), CPMB, en los carriles posteriores (1-4) se agregó la fracción resultante de la cromatografía reconocida como Glutación Peroxidasa por el ensayo enzimático específico como sigue: en el carril 2 se colocó 20 μ l, carril 3 con 40 μ l y el 4 con 50 μ l. Cada una de las muestras se trató sin mercaptoetanol. El gel concentrador se corrió a 20 mA durante una hora y el separador a 100 mA durante 2 horas a 4°C. Posteriormente se dejó tiñendo toda la noche con Azul de Coomassie y se destiñó el exceso de colorante con ácido acético al 10% con varios cambios.

Una vez que se obtuvo la banda bien reconocida se procedió a elaborar una serie de geles preparativos de poli(acrilamida), con geles separadores al 10% y concentradores al 5%, con 3 mm de espesor, de acuerdo a la técnica de Laemmli (1970). En uno de los carriles extremos se colocó 5 μ l de control de peso molecular bajo (Bio-Rad) y en el carril central se colocó 200 μ l de la muestra de GSH-Px.

En un trabajo previo (Moyao, 1989) se observó que ésta enzima purificada a partir de T. crassiceps tiene un peso molecular aproximado de 31,000 D. Cada gel se visualizó mediante acetato de sodio (CH_3COONa) 4 M y con ayuda de una lámpara de luz indirecta y fondo oscuro (Immuno-Illuminator, Hyland Inc.).

Se obtuvo un total de 24 geles los cuales rindieron 24 tiras de geles que contuvieron exclusivamente a la GSH-Px se lavaron varias veces con agua destilada y desionizada a las que se les agregó mertiolate 0.02% y se guardaron en refrigeración hasta su uso.

1.3.6 Electroelusión.

A un cilindro de vidrio de 4 cm de diámetro y 12 cm de largo se le selló la parte inferior con parafilm (PARAFILM "M", American National Can) y se agregó la mezcla de reactivos para preparar gel concentrador de poliacrilamida al 5% dejando que polimerizara por espacio de 1 hora, se desprendió cuidadosamente el parafilm, en la parte inferior del cilindro se colocó una membrana de diálisis (SPECTRUM, Medical Instrumentries, Inc.) a la cual se le agregaron aproximadamente 5 ml de amortiguador para electroforesis. Posteriormente cuatro de las bandas cortadas y conservadas, como se describió anteriormente, se pasaron varias veces a través de una jeringa de 20 ml sin aguja, hasta que se obtuvieron pequeñas fracciones de dicha banda, se les agregó aproximadamente 4 ml de amortiguador de corrida para electroforesis (ver apéndice) y se colocaron dentro del cilindro de vidrio con mucho cuidado de que

el gel previamente formado no se desprendiera, también aquí en la parte superior se acomodó el electrodo negativo. El cilindro se sujetó a un soporte universal por medio de unas pinzas. La bolsa de diálisis de la parte inferior del cilindro se sumergió en un vaso de precipitado con 80 ml de amortiguador para electroforesis, dentro del cual se colocó el electrodo positivo. Los electrodos se conectaron a una fuente de poder durante 6 horas a una corriente de 10 mA a 4°C.

Antes de desmontar todo el sistema se invirtieron los polos durante media hora. La bolsa de diálisis se separó del cilindro, se cerró y se dializó contra cinco litros de Tris (hidroximetil) aminometano 0.02 M, pH 7.2 con 0.2% de azida de sodio a 4°C. Se realizaron cinco electroeluciones más.

Las fracciones obtenidas posteriores a la dialización se concentraron a través de una membrana YM-10 y se obtuvieron 450 µl como volumen final. 50 µl de la proteína purificada se corrieron en un gel analítico de poliacrilamida de 0.75 mm de grosor teniendo un control de peso molecular bajo (Bio-Rad).

2. EMPLEO DE TECNICAS ENZIMATICAS

2.1 ELISA-rápido

Desde hace varios años en México y sobre todo para estudios serológicos, una de las técnicas comúnmente empleadas es el ELISA. Esta técnica fué estandarizada por Espinoza y col., 1981 para el diagnóstico de la cisticercosis humana.

Se empleó una placa con pozos de Immulón tipo I (Dynatech Laboratories, Inc.) los cuales tienen 300 μ l de capacidad. Se incubaron 100 μ l/pozo del antígeno (1 μ g/ml) en amortiguador de carbonatos (0.03M Na₂CO₃, 0.069M NaHCO₃, 0.0061M NaN₃ 0.02g, pH 9.6) a 4°C toda la noche. Posteriormente se lavó cada pozo con 100 μ l de amortiguador de fosfatos 0.01M - Tween 20 3% pH 7.2 tres veces por cinco minutos cada una.

La muestra se incubó durante una hora a 37°C. El líquido cefalorraquídeo se diluyó 1:10 ó 1:20 y el suero 1:2000 ó 1:4000, las diluciones se hicieron con amortiguador de fosfatos. Más tarde se lavó igual que antes.

El conjugado IgG de chivo anti IgG humana acoplada a fosfatasa alcalina (Sigma Chemical Company) se incubó durante dos horas a 37°C. La dilución empleada fué de 1:1000. Posteriormente se lavó con amortiguador de fosfatos tres veces durante cinco minutos cada una.

El sustrato utilizado fué el p-nitrofenil fosfato de sodio (Sigma Chemical Company) el que se incubó durante media hora a 37°C. Posteriormente se leyó en el espectro para ELISA a 405 nm.

Para acortar el tiempo en el cual se realiza el ELISA original se procedió a realizar diferentes diseños y modificar algunas variables importantes para poder lograrlo.

El primer diseño consistió en modificar las concentraciones de antígeno. La placa en donde se realiza la técnica de ELISA está dividida en columnas (numeradas de 1 a la 12) y renglones (designados por las letras A-H) lo cual hace más fácil el

reconocer la ubicación de una determinada muestra. En los renglones A y B así como E y F se agregó una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ de extracto crudo y en los renglones restantes una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$. En ambas concentraciones el antígeno se diluyó en amortiguador de carbonatos y se incubó a 4°C durante toda la noche, posteriormente se lavó con amortiguador de fosfatos y se incubaron sueros positivos (3) y negativos (2), que anteriormente habían sido probados por el ELISA original. Dichos sueros se diluyeron 1:16, 1:64, 1:256 y 1:1024 en amortiguador de fosfatos y se incubaron durante 30 minutos a 37°C . Se lavó y se añadió el conjugado el cual de los renglones A a D se diluyó 1:1000 y del renglón E al H fué diluído 1:250, se incubó a 37°C durante 30 minutos. Finalmente se agregó el sustrato que se incubó durante 15 minutos a 37°C . Posteriormente se leyó en el espectrofotómetro a 405 nm.

Un segundo ensayo consistió en evaluar LCR en las mismas condiciones en las que se valoró anteriormente el suero. Se valoraron LCR positivos (4) y negativos (2) los cuales anteriormente habían sido probados con el ELISA original, esto se realizó con tres diferentes diluciones: Sin diluir (SD), 1:10 y 1:50 y todas las demás condiciones fueron las mismas que en el ensayo descrito anteriormente.

Se diseñó un tercer ensayo para evaluar nuevamente sueros positivos (3) y negativos (2) en donde todas las reacciones se llevaron a cabo en un sólo día. Las condiciones que se manejaron fueron las mismas que se describieron anteriormente excepto el antígeno pues se incubó durante 30 minutos a 37°C y el conjugado

se empleó diluido 1:500.

Siguiendo este procedimiento, el cual nos permitió realizar la técnica de ELISA en el mismo día y en un máximo de 3 horas y media se evaluaron 272 sueros y 332 LCR en un total de 35 ensayos.

2.1.2 ELISA ASTRA.

El doctor Anand Kumar quien labora en el ASTRA Research Centre de la India nos obsequió una serie de placas con antígeno de secreción y excreción de larvas de Taenia solium (SE-Ts) acoplados así como el resto de reactivos y el procedimiento a seguir para realizar el inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana en nuestro país. La placa con 96 pozos con 300µl de capacidad cada uno, se incubó a temperatura ambiente durante una hora con líquido cefalorraquídeo el cual se diluyó con amortiguador ASTRA 1:5, 1:25 y 1:125. Más tarde se lavó con agua destilada tres veces durante cinco minutos cada una, se incubó durante una hora a temperatura ambiente la anti IgG humano peroxidasa ASTRA, se lavó con agua destilada tres veces durante cinco minutos cada una, se agregó el sustrato que es la tetrametil benzidina (TMB) 1X (ASTRA) y se incubó durante 10 minutos. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 1N y más tarde se leyó a 450 nm.

Se realizaron 3 ensayos siguiendo las indicaciones de ASTRA en los que se evaluaron LCR (12 negativos y 12 positivos) que anteriormente habían sido valorados por ELISA-rápido. Este grupo

de investigación en la India recomienda usar LCR, sin embargo nosotros quisimos experimentar también con el suero (12 negativos y 12 positivos) para así poder compararlo con nuestra técnica y poder determinar cual de los dos procedimientos es más útil para un pronto y certero diagnóstico de neurocisticercosis. Cada una de las muestras valoradas con el sistema de ASTRA también fueron probadas una vez más con el ELISA-rápido.

Posteriormente debido a una posible contaminación de los reactivos de ASTRA se empleó únicamente su placa y los reactivos así como el procedimiento que se siguió fueron los empleados rutinariamente en el laboratorio.

Más tarde se realizaron dos ensayos con cada placa, en las que las muestras se evaluaron primero con la metodología señalada por ASTRA empleando todos sus reactivos excepto el conjugado pues se empleó la anti IgG humana acoplada a fosfatasa alcalina así como la peroxidasa, posteriormente las mismas muestras fueron probadas en el ELISA-rápido utilizando extracto crudo como antígeno.

Se probaron 11 sueros positivos y 9 sueros negativos además de 17 LCR positivos y 13 negativos, con un total de tres ensayos ASTRA así como 3 ensayos ELISA-rápido.

2.1.3 ELISA-rápido empleando como antígeno

Glutación Peroxidasa (GSH-Px).

Una vez purificada la Glutación Peroxidasa se usó en ensayos inmunoenzimáticos para evaluar su capacidad antigénica mediante el reconocimiento de anticuerpos anti-cisticerco.

El primer ensayo consistió en colocar a cada pozo de Immulón I (Dynatech, Co) 3 μ l de Glutación Peroxisada diluido con 97 μ l de amortiguador de carbonatos, lo cual se hizo en 8 pozos, y se dejó incubando durante 48 horas a 4°C. El procedimiento que se realizó posteriormente fue el anteriormente descrito con el Extracto Crudo.

Un segundo ensayo se realizó empleando 38 pozos de Immulón I en las mismas condiciones que las descritas anteriormente.

2.2 INMUNOELECTROTRASFERENCIA

2.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Se elaboraron geles de poliacrida separadores al 10% y concentradores al 5%, ambos siguiendo la técnica de Laemmli (1970) y las muestras se trabajaron como se describe en el apéndice.

La fracción denominada LL-GP resultante de la purificación de glicoproteínas descrita anteriormente se corrió en un gel de poliacrilamida, colocando en cada carril distintas cantidades de dicha fracción y en un extremo del gel se colocó una referencia del peso molecular preteñido (BRL).

El gel concentrador se corrió a 20 mA durante 1 hora y el gel separador a 100 mA durante 2 horas a 4°C, posteriormente se tiñó con azul de Coomasie y se destiñó con ácido acético al 10%

(Apéndice).

En el gel resultante se observó que las bandas reportadas por Tsang (1989) para el comportamiento de las glicoproteínas puras era el correcto se procedió a elaborar geles preparativos, es decir, que en lugar de que el gel concentrador tenga carriles para incorporar diferentes cantidades o muestras solo posea un carril para el control de peso molecular bajo (CPMB) y todo lo demás para una misma muestra y, posteriormente la proteína pueda ser transferida a un papel de nitrocelulosa.

2.2.2. Transferencia

Todos los geles que se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en una cámara de electrotransferencia de acuerdo a la técnica de Towbin y colaboradores (1979).

Los geles electrotransferidos fueron geles preparativos de acrilamida al 10% de 0.75 mm. La cantidad óptima registrada para transferir es de 20-80 ng/μl/mm.

El gel que ha sido previamente corrido en la cámara de elctroforesis se coloca cuidadosamente entre papel de nitrocelulosa y papel filtro como se indica en el siguiente diagrama:

La cámara se llena con amortiguador de transferencia (Tris 0.025M, Glicina 0.192M, Metanol al 20%; pH 8.3) se deja correr

TRANSFERENCIA DE PROTEINAS.

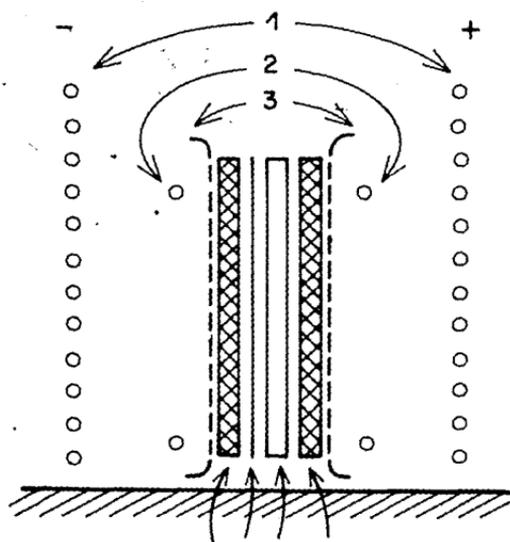


FIG. 8 TRANSFERENCIA DE PROTEINAS DE UN GEL
A UNA MEMBRANA DE NITROCELULOSA (NIC) POR
CORRIENTE.

durante una hora a 1 Ampere.

La membrana de nitrocelulosa resultante de la electrotransferencia se colocó entre dos piezas de papel filtro previamente humedecido con amortiguador de fosfatos más acida de sodio (NaH₂PO₄) y se guardó dentro de una bolsa de plástico cerrada hermeticamente, la cual se conservó a -10°C.

2.2.3 Reaccion antígeno-anticuerpo con glicoproteínas.

La membrana de nitrocelulosa a la que se le transfirieron las proteínas se puso a temperatura ambiente para que pudiera descongelarse lentamente y las proteínas no sufrieran daño alguno. Una vez que la membrana se descongeló, se procedió a cortarla en tiras de 3mm de ancho. El lugar en donde se encontraba el peso molecular se cortó y se tiñó con la técnica de Auro dye forte. Al comprobar que si se transfirieron las proteínas, se procedió a realizar la reacción antígeno-anticuerpo.

La muestra, ya sea suero y/o líquido cefalorraquídeo diluido en amortiguador de fosfatos/ Tween-20/leche descremada en polvo (AF/T-20/L), se incubó en placas acanaladas de Accutran (Schleicher & Schuell) en las que pueden ser puestas 8 muestras a la vez, una en cada canal de la placa, el cual tuvo una cantidad de 500 µl, y en donde se colocó una tira de nitrocelulosa a la que previamente se le transfirieron proteínas. Las muestras se diluyeron como se indica en la siguiente tabla:

MUESTRA	MUESTRA (μ l)	AF/T-20/L (μ l)	DILUSION
SUERO	5	495	1:100
LCR	50	450	1:10

Todo esto se dejó incubar durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó 4 veces durante cinco minutos cada vez con AF/T-20. Se agregó el conjugado Anti IgG Humana/peroxidasa diluido 1:1000 en AF/T-20 en las siguientes proporciones según el número de tiras:

No. TIRAS	16	35	55	75	95
AF/T-20 (ml)	20	40	60	80	100
Conjugado (μ l)	10	20	30	40	50

Se dejó incubar una hora a temperatura ambiente, se lavó 3 veces, cinco minutos cada vez con AF/T-20 y dos veces cinco minutos cada una con AF. Se incubó el sustrato 30 minutos a temperatura ambiente, el sustrato se preparó como sigue: se elaboró una solución stock de DAB (3,3'-diaminobencidina, Sigma) con una concentración de 50mg/ml y se mezcló con AF y una solución al 3% de H₂O₂ como se indica a continuación:

NO. DE TIRAS	25	35	45	55	65
AF(ml)	15	20	25	30	35
DAB stock (μ l)	150	200	250	300	350
3% H2O2 (μ l)	15	20	25	30	35

La reacción se detuvo en cuanto se empiezan a visualizar las bandas con AF, posteriormente se lava exhaustivamente con agua destilada y se secan las tiras en papel filtro.

2.2.4 Reacción antígeno-anticuerpo GSH-Px.

Se utilizó a la GSH-Px pura para correr un gel de poliacrilamida (gel concentrador al 5% y el separador al 10%) de 0.75 mm de grosor. El gel posteriormente fué transferido a una membrana de nitrocelulosa. Más tarde se llevó al cabo la reacción antígeno-anticuerpo empleando sueros de conejos previamente inmunizados con GSH-Px y como controles sueros de conejos preinmunizados. El procedimiento realizado para la reacción antígeno-anticuerpo con glicoproteínas, descrito anteriormente, fué, en general, el mismo que se siguió para la GSH-Px. La dilución de los sueros fué 1:50, 1:100, 1:500 y 1:1000 mientras que el conjugado se empleó diluido 1:1000.

En las tiras no es necesario que los anticuerpos, presentes en las muestras, reconozcan todas las 7 bandas características de éste antígeno, sólo con que reaccionen con una banda es suficiente para determinar que el paciente posee anticuerpos contra T. solium. Debido a que ésta técnica no puede ser cuantificada (por ejemplo, por un espectrofotómetro)

debe tenerse cuidado de observar las tiras así como poseer una buena referencia de los pesos moleculares sobre todo de los que están en la zona registrados como específicos de ésta enfermedad y que abarca de 13 a 50 kilodaltons (kD).

III. RESULTADOS.

III.1 ANTIGENOS

III.1.1 EXTRACTO CRUDO

A partir de 30 g de larvas de I. solium se obtuvieron 200 mg de extracto total en un volumen final de 20 ml es decir la 1500 veces menos de la masa original. El extracto resultante se empleó como antígeno en ELISA-rápido.

III.1.2 GLICOPROTEINAS

De los 37.67 g de larvas de T. solium se obtuvo 100 ml de la fracción 250 KG-PS, ésta se concentró a 22 ml y se combinó con 70 ml de la fracción 250 KG-SUP formando la fracción LL-P. La fracción LL-P se concentró a 17 ml para cromatografiarse en la columna de LL-S, obteniéndose 156 mg en 13 ml de la fracción LL-GP. La fracción LL-GP fué sometida a electroforesis en GDPA analíticos uno de ellos con 1800 ng/mm de gel y los otros dos con 50 ng/ml/mm de gel, se transfirieron a una membrana de NIC. Las membranas fueron cortadas en tiras de 3 mm de ancho cada una y se sometieron a diversas reacciones antígeno-anticuerpo (FIG. 1 y 2).

Se observó que al utilizar una concentración mayor de 50 ng/ml /mm se obtuvo mucho fondo (fig. 1).

III.1.3 GLUTATION PEROXIDASA

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos de la purificación de la GSH-Px a partir de metacéstodos de T. solium y T. crassiceps.

	NO. DE CROMATOGRAFIA	MASA (g)	VOLUMEN (ml)	VOLUMEN CON ACTIVIDAD	CON DE GSH-
Px(μ l)					
<u>Taenia</u>	1	125	115	600	
<u>solium</u>	2	100	95	550	
	3	150	140	650	
<u>Taenia</u>	1	160	150	500	
<u>crassiceps</u>	2	160	152	450	

TABLA 2. Valores que se obtuvieron en masa y volumen durante el proceso que se empleó para purificar la GSH-Px, así como el volumen final después de haber sido concentrado.

En las figuras 3, 4, 5, 6 y 7 se observa el comportamiento que siguieron los extractos tanto de T. solium como de T. crassiceps en cromatografía en una columna de OAE-Cellex para detectar a la GSH-Px, en las figuras 3 y 4 también puede observarse la conductividad (mS) la cual siempre tuvo un comportamiento lineal.

En la figura 8 se observa el resultado de una electroforesis en gel de poliacrilamida (EGPA) analítico de 0.75 mm, en donde se analizaron las fracciones con actividad de GSH-Px resultantes de la cromatografía del homogenado de metacéstodos de T. crassiceps así como el CPMB. En ésta figura puede observarse claramente la banda que corresponde a la GSH-Px que tiene un PM alrededor de 31,000 D. Por arriba de éste peso se observan claramente algunas bandas muy bien definidas y por debajo de la GSH-Px hay algunas bandas no muy bien delineadas. El carril en el que se distingue más claramente a la proteína es donde se colocaron 20 µl de la muestra.

En la figura 9 se observa el resultado de una EGPA, en el primer carril se encuentra el CPMB y en el siguiente el comportamiento electroforético que presentaron 50 µl de la fracción concentrada resultante de la electroelución la cual se distingue como una banda muy bien definida localizada entre las bandas que corresponde a los 31,000 y 45,000 daltons.

III.2 TECNICAS INMUNOENZIMATICAS

III.2.1 ELISA RAPIDO EMPLEANDO EXTRACTO CRUDO.

Con los resultados obtenidos de 3 diseños realizados con diversas variables (figuras 10, 11 y 12) se determinó que las condiciones más indicadas para el ELISA-RAPIDO son: una dilución suero 1:64 y 1:256, LCR sin diluir (SD) y 1:10; dilución del

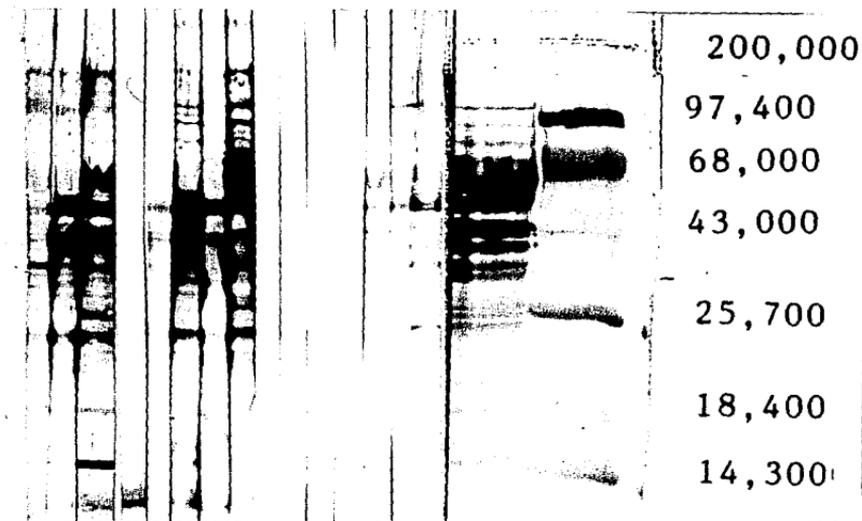


FIG.1 IET de LL-GP, cada una de las tiras contiene 1800 ng/ml/mm de glicoproteinas (LL-GP).

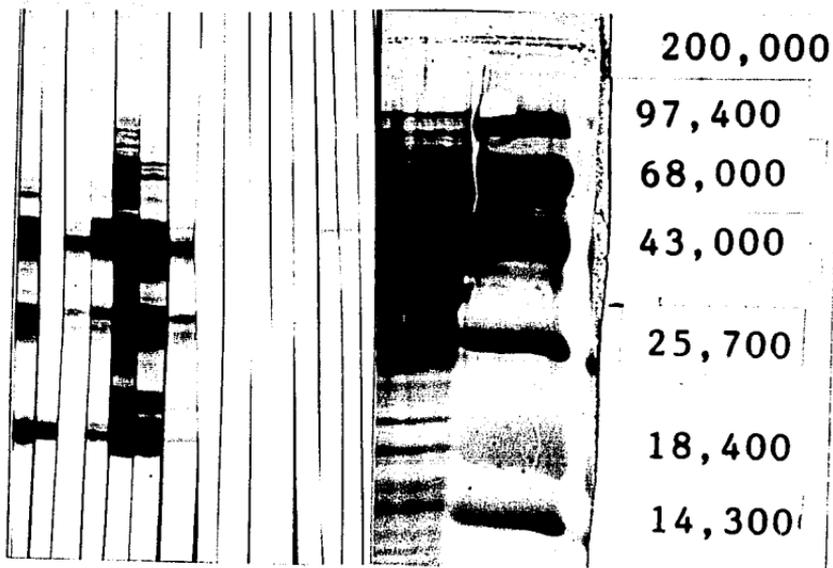


FIG. 2 IET de LL-GP, cada tira tiene 50 ng/ml/mm de glicoproteinas (LL-GP).

ACTIVIDAD DE GLUTATION PEROXIDASA *Taenia solium*

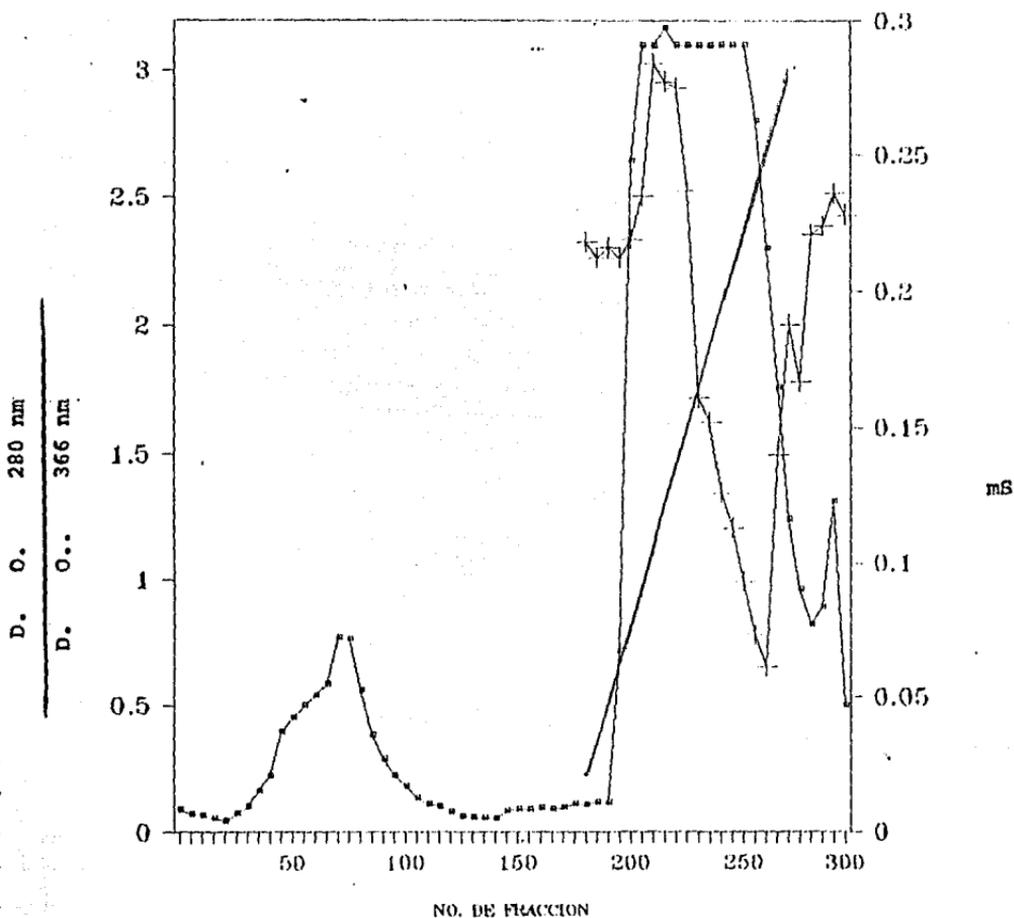


FIG. 3 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO CATIONICO EN OAE-CELLEX DE *T. solium* DONDE SE MUESTRA LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA GSH-PX. DENSIDAD OPTICA (D.O.), CONDUCTIVIDAD (mS).

ACTIVIDAD DE GLUTATION PEROXIDASA Taenia solium.

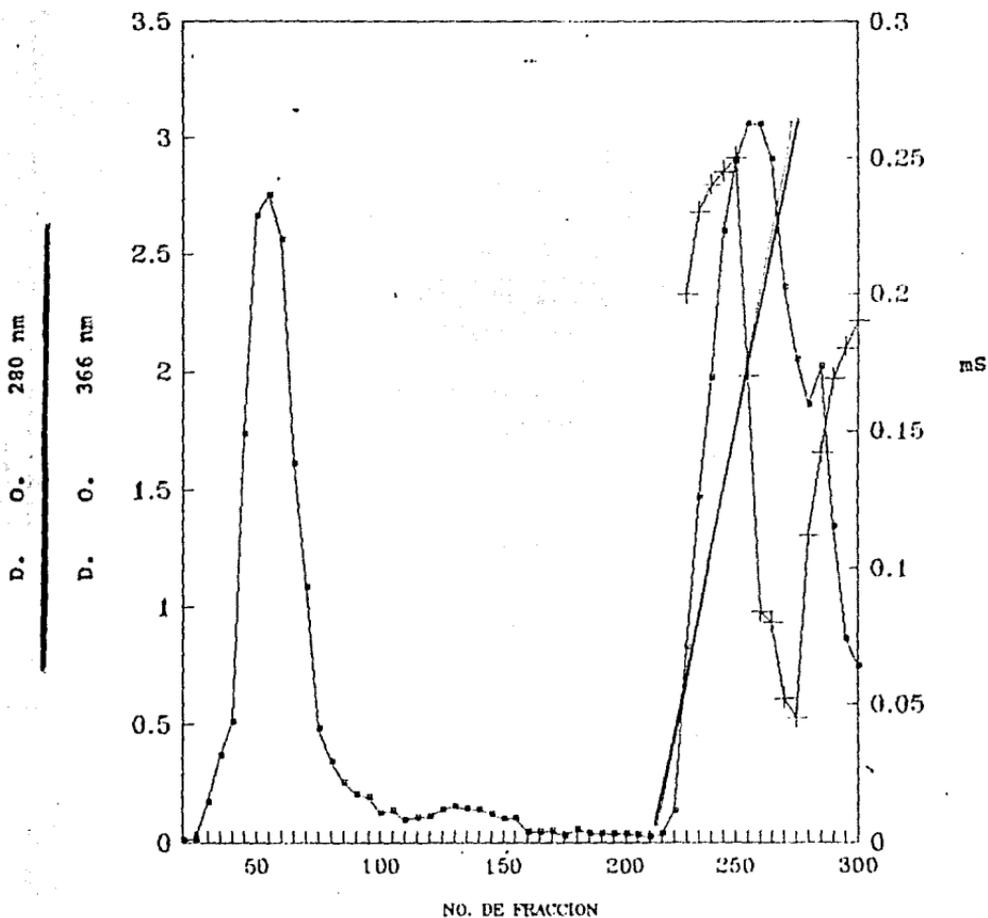


FIG. 4 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO CATIONICO EN OAE-CELLEX DE T. solium DONDE SE MUESTRA LA ACTIVIDAD DE GSH-Px. DENSIDAD OPTICA (D.O.), CONDUCTIVIDAD (mS).

ACTIVIDAD DE GLUTATION PEROXIDASA *Taenia solium*.

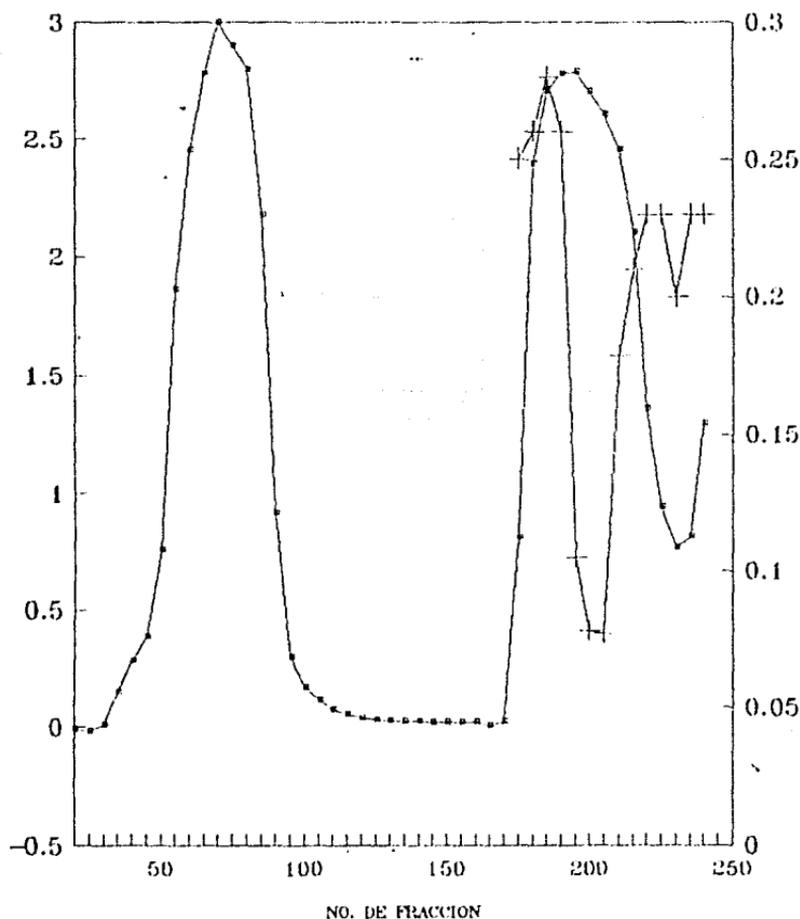


FIG. 5 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO CATIONICO EN QAE-CELLEX DE *T. solium* DONDE SE MUESTRA LA ACTIVIDAD DE GSH-Px. DENSIDAD OPTICA (D.O.), CONDUCTIVIDAD (mS).

ACTIVIDAD DE GLUTATION PEROXIDASA
Taenia crassiceps ORF

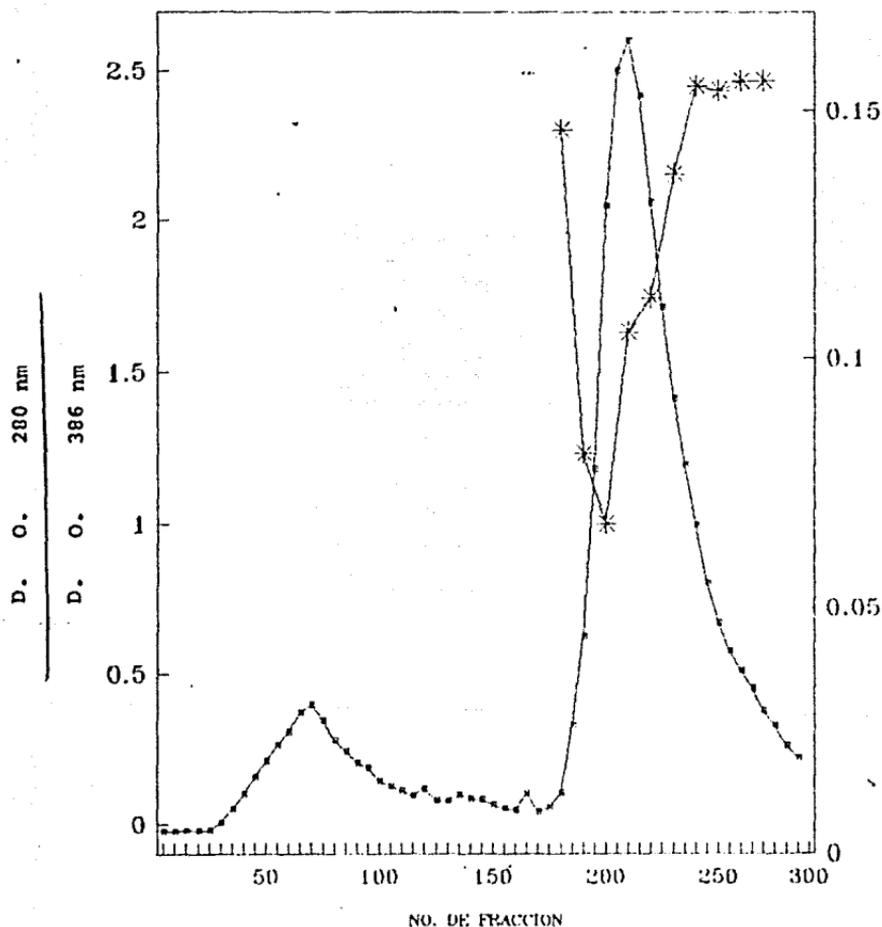


FIG. 6 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO CATIONICO EN QAE-CELLEX DE T. crassiceps CEPA ORF DONDE SE MUESTRA LA ACTIVIDAD DE GSH-Px. DENSIDAD OPTICA (D.O.), C

ACTIVIDAD DE GLUTATION PEROXIDASA *Taenia crassiceps* ORF

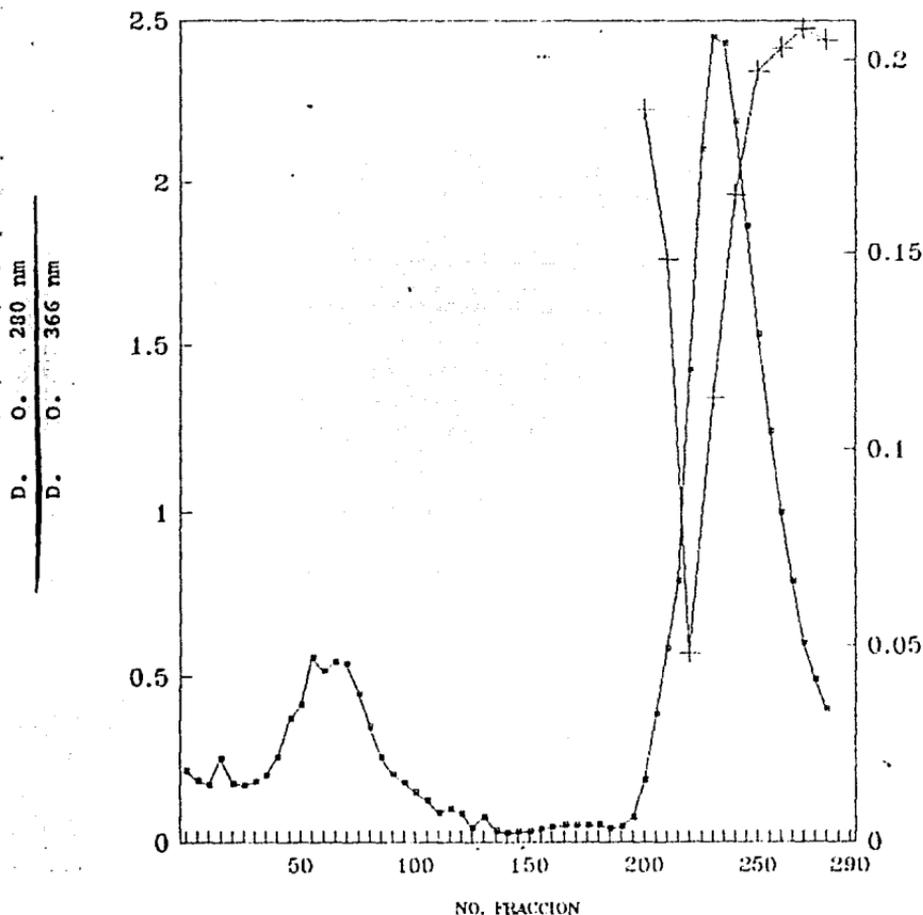


FIG. 7 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO CATIONICO EN QAE-CELLEX DE *T. crassiceps* CEPA ORF EN DONDE SE MUESTRA LA ACTIVIDAD DE GSH-Px. DENSIDAD OPTICA (D.O.).

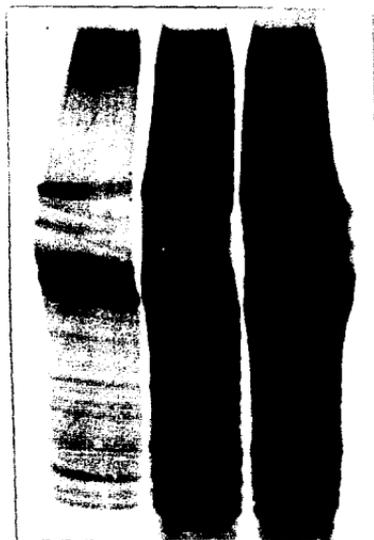


FIG. 8 Electroforesis en gel de poliacrilamida (EGPA) de la fracción resultante de la cromatografía en QAE-Cellex con actividad de GSH-Px.



FIG. 9 Electroforesis en gel de poliacrilamida (EGPA) de la fracción concentrada de GSH-Px después de ser electroeluida.

ELISA RAPIDO

SUERO

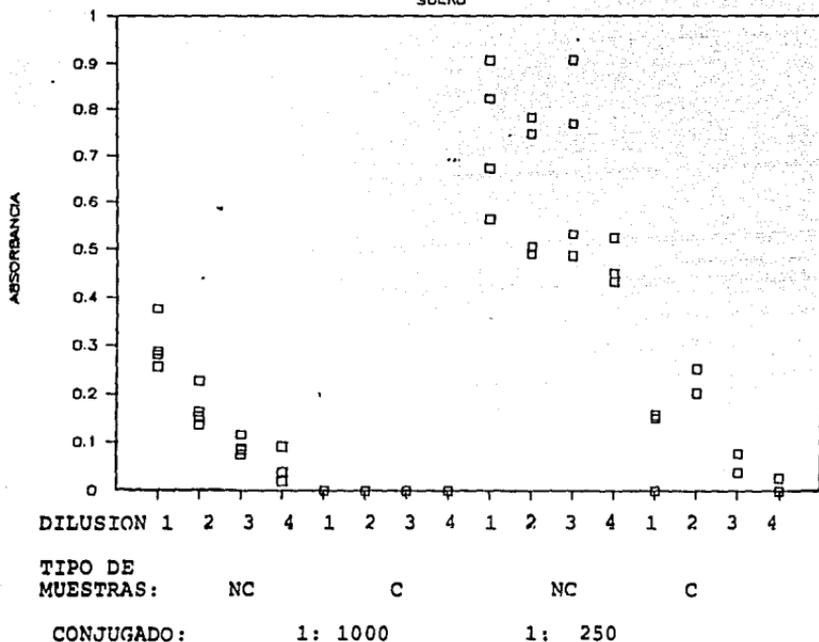


FIG. 10 VALORES DE ABSORBANCIA OBTENIDOS EN EL PRIMER DISEÑO (VER TEXTO), REALIZADO PARA DISMINUIR EL TIEMPO DE PROCESAMIENTO DEL ELISA ESTANDARIZADO POR EZPINOZA Y Col., 1982. NEUROCISTICERCOSIS) (NC), CONTROL (c).

DILUSION : 1 = 1:16 3= 1:256
 2 = 1:64 4= 1:1064

ELISA RAPIDO

LCR

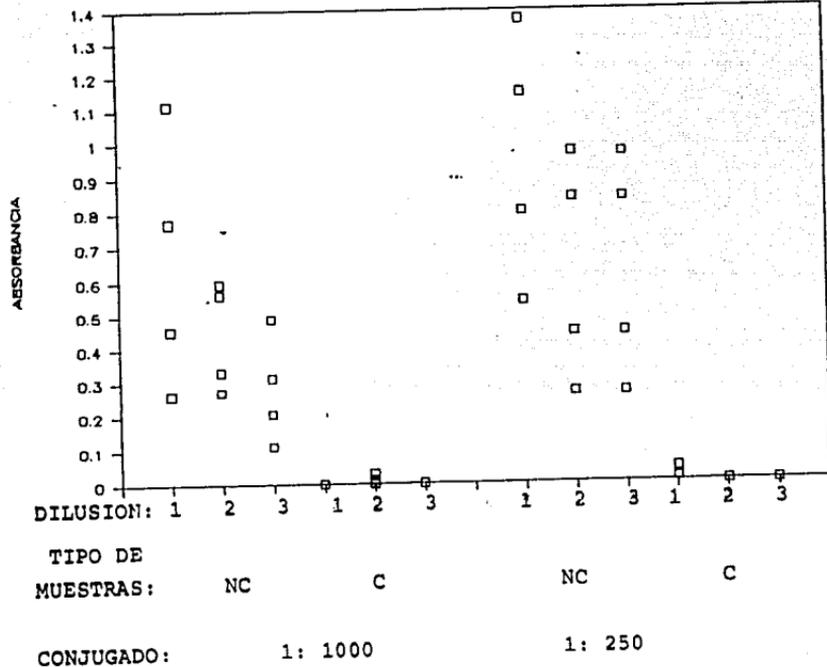


FIG. 11 VALORES DE ABSORBANCIA OBTENIDOS EN EL SEGUNDO DISEÑO REALIZADO CON LA FINALIDAD DE DISMUIR EL TIEMPO DE ELABORACION DEL ELISA ESTANDARIZADO POR ESPINOZA Y Col., 1982, PARA EL DIAGNOSTICO DE LA CISTICERCOSIS HUMANA. NEUROCISTICERCOSIS (NC), CONTROL (C).

DILUCION:

- 1 = SIN DILUIR
- 2 = 1: 10
- 3 = 1: 50

ELISA RAPIDO

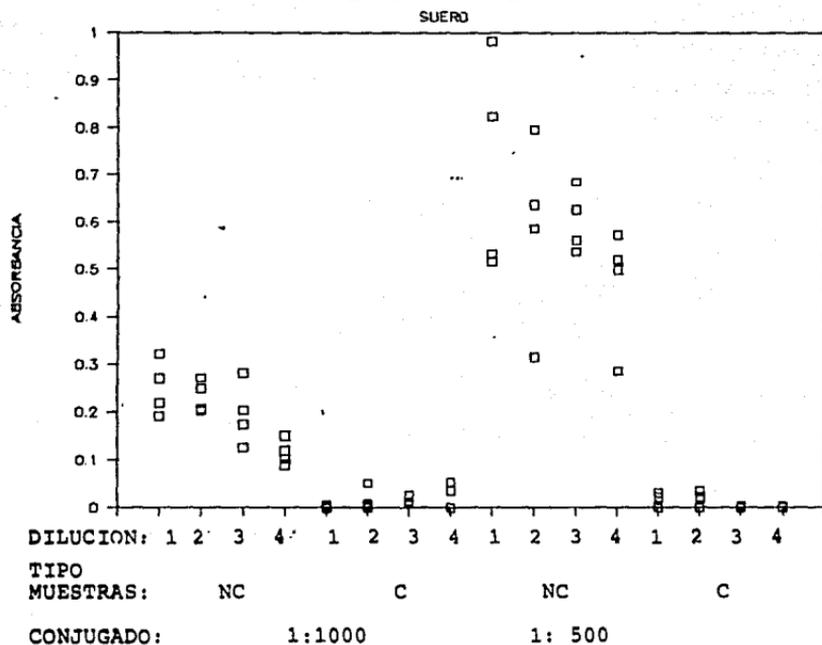


FIG. 12 VALORES DE DENSIDAD OPTICA OBTEDIDOS EN UN ULTIMO DISEÑO ELABORADO CON LA FINALIDAD DE DISMIUIR EL TIEMPO DEL ELISA ESTANDARIZADO POR ESPITROZA Y Col? 1982? PARA EL DIAGNOSTICO DE LA CISTICERCOSIS HUMANA, NEUROCISTICERCOSIS (NC), CONTROL (C).

DILUCION: 11 = 1:16 2 = 1:64
 3 * 1:256 3 = 1:1064

ELISA - rápido.

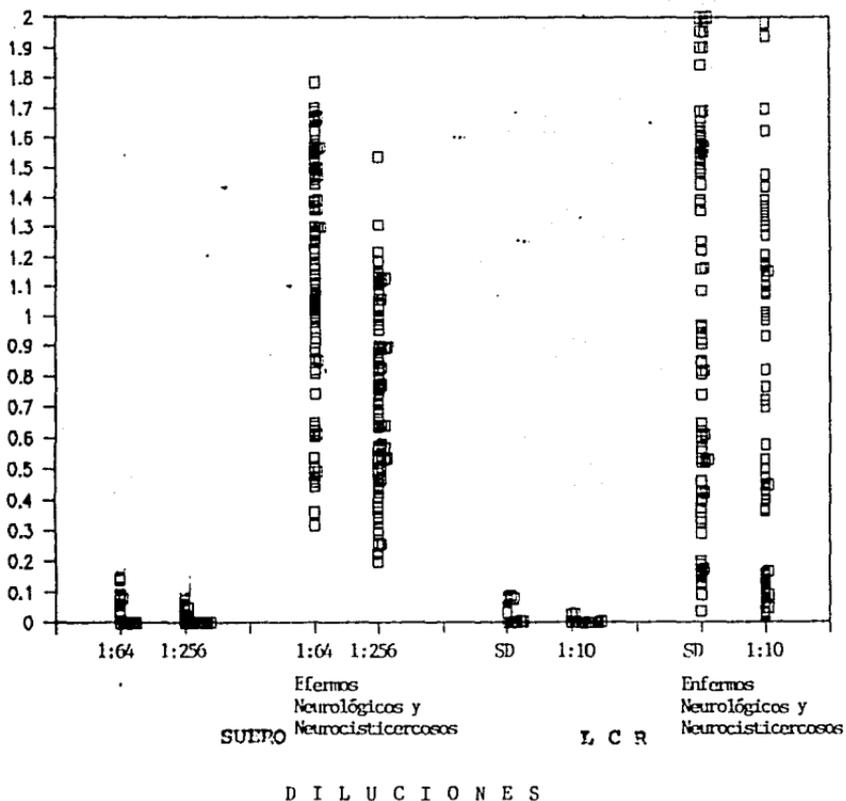


FIG. 13 VALORES DE ABSORBANCIA EN MUESTRAS DE SUEIRO Y LIQUIDO CEFALORRACUIDO (LCR) OBTENIDOS POR ELISA - rápido.

conjugado 1:500 así como incubaciones por 30 minutos a 37°C.

El valor del punto de corte obtenido fué de 0.2 el que se determinó a una serie de valores sacandoles el promedio y sumandoles tres veces su desviación estandard (fig. 13).

III.2.2 ELISA-ASTRA

En las figuras 14 y 15 se observa que los valores de absorbancia de sueros y LCR, respectivamente, se encuentran muy por arriba del punto de corte previamente establecido, incluyendo los controles negativos.

Las gráficas 16 y 17 muestran la absorbancia de muestras de suero y LCR de pacientes con neurocisticercosis (NC) y de muestras control (personas sanas), denotadas por la letra C, las cuales fueron evaluadas empleando como conjugado anti IgG humana acoplada a fosfatasa alcalina.

Las figuras 18 y 19 muestran el comportamiento que presentan las muestras cuando se emplea como conjugado a la peroxidasa. La primer gráfica corresponde a muestras de LCR, puede observarse claramente que la cantidad de anticuerpos detectada en la placa para ELISA-RAPIDO es mayor que para las muestras correspondientes a la placa de ASTRA. La siguiente gráfica corresponde a muestras de suero, en donde puede advertirse que los mayores valores de absorbancia corresponden a las muestras que fueron evaluadas con la placa de ASTRA aunque también los controles tienen valores mayores al punto de corte.

ELISA ASTRA

SUERO

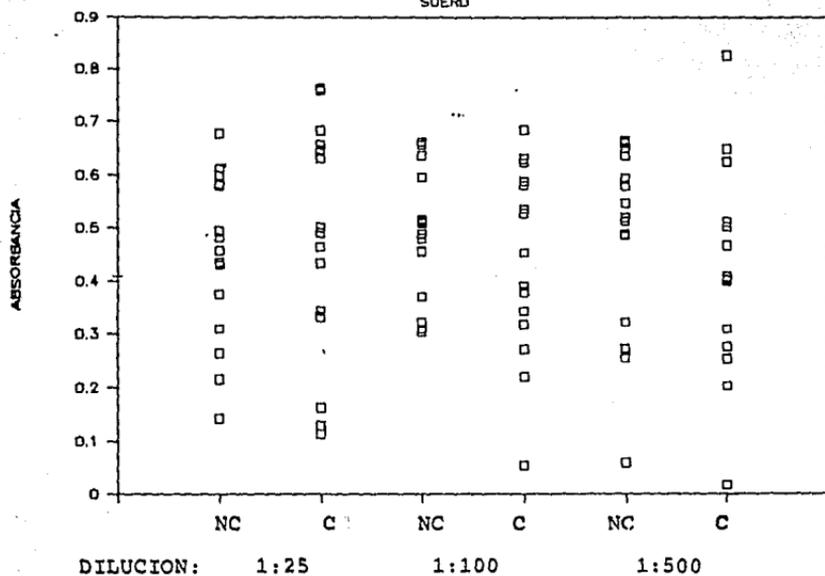


FIG. 14 VALORES DE ABSORBANCIA OBTENIDOS EN MUESTRAS DE SUERO EMPLEANDO EL ELISA DESCRITO POR ASTRA. EL S STRATO SOLO SE INCUBO 2 MINUTOS.

ELISA ASTRA

LCR

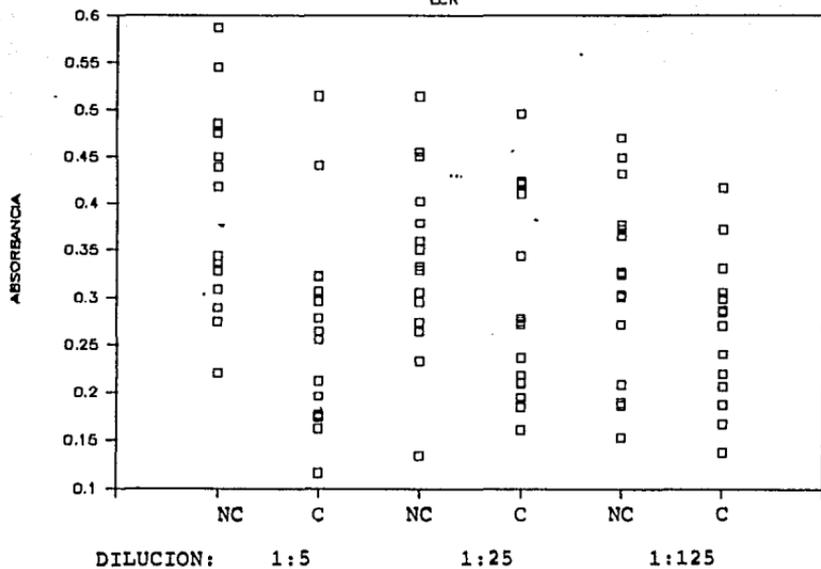


FIG. 15 VALORES DE ABSORBANCIA OBTENIDOS EN MUESTRAS DE LCR EMPLEANDO EL ELISA DESCRITO POR ASTRA. EL SUSTRATO SE INCUBO 2 MINUTOS.

ELISA RAPIDO

LCR

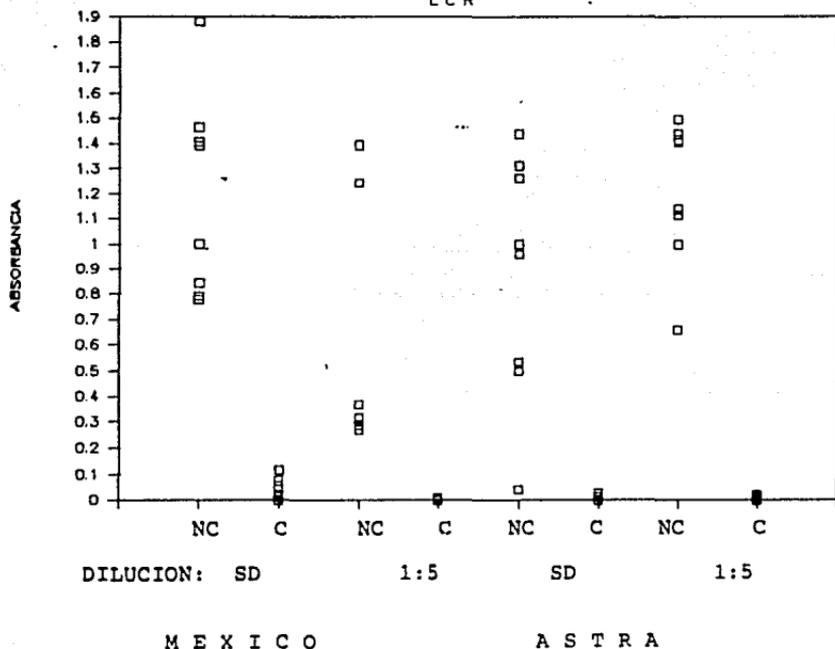


FIG. 16 VALORES DE ABSORBANCIA OBTENIDOS EN MUESTRAS DE LCR EN DONDE SE COMPARARON LOS ANTIBIENOS DE ASTRA Y MEXICO. SE EMPLEO COMO SUSTRATO A LA p-nitrofenil fosta to de sodio.

ELISA RAPIDO

SUERO

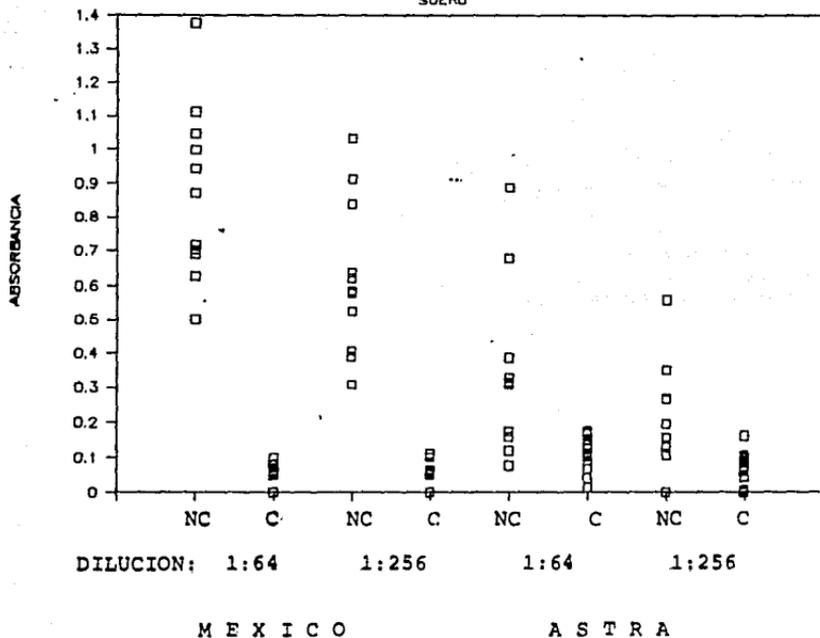


FIG. 17 VALORES DE ABSORBANCIA OBTENIDOS AL EVALUAR MUESTRAS DE SUERO COMPARANDO TANTO EL ANTIGENO DE ASTRA COMO EL DE MEXICO. SE EMPLEO COMO SUSTRATO p-nitrofenil fosfato de sodio.

ELISA RAPIDO

LCR

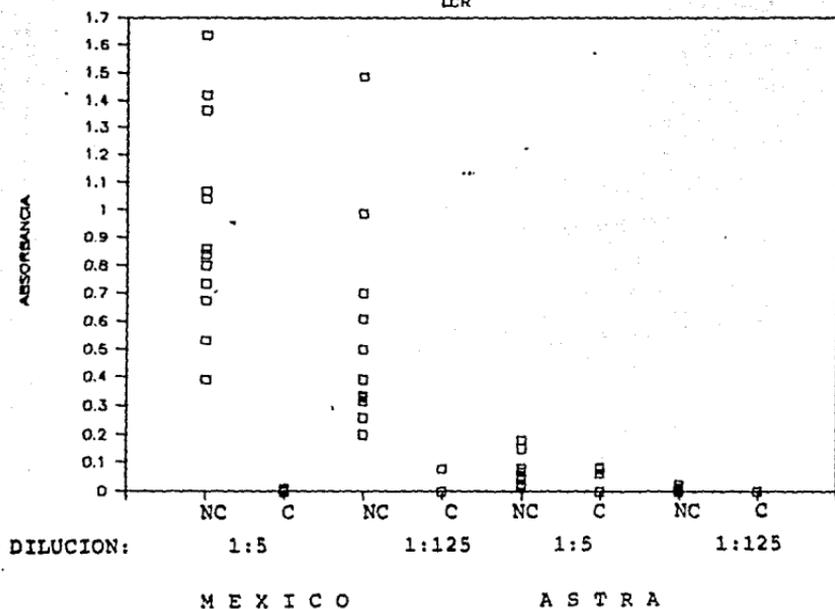


FIG. 18 VALORES DE ABSORBANCIA OBTENIDOS AL EVALUAR MUESTRAS DE LCR COMPARANDO EL ANTIGENO DE MEXICO Y EL DE ASTRA. COMO SUBSTRATO SE EMPLEO peroxidasa.

ELISA RAPIDO

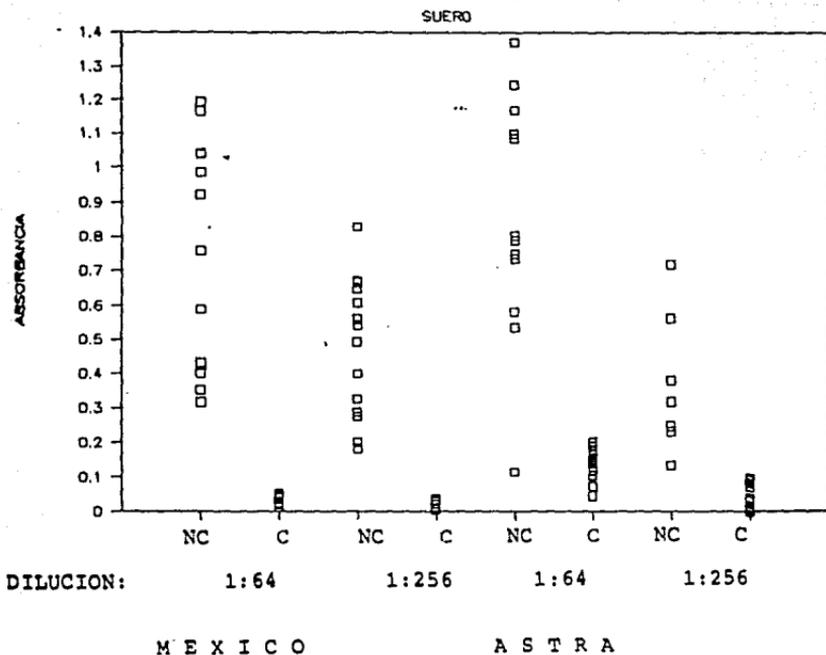


FIG. 19 VALORES DE ABSORBANCIA OBTENIDOS AL EVALUAR MUESTRAS DE SUERO COMPARANDO EL ANTIGENO DE ASTRA Y EL DE MEXICO. COMO SUSTRATO SE EMPLEO PEROXIDASA.

III.2.3 ELISA-rápido empleando Glutación Peroxidasa

En éste ensayo se pudo advertir que los valores de GSH-Px son mayores a los leídos con extracto crudo como se indica en la siguiente tabla:

MUESTRA	NO.	D. O.	D.O.
		EXTRACTO C.	GSH-Px
S	6695	0.455	0.390
S	6761	0.593	1.084
S	6868	1.051	1.353
S-		0.222	0.266
S-		0	0
LCR	6419	0.202	0.519
LCR	6862	0.555	0.310
LCR-	6534	0.018	0

TABLA 2. Comparación de los valores de densidad óptica resultantes del ELISA-RAPIDO con extracto crudo y GSH-Px, Suero (S), Líquido cefalorraquídeo (LCR).

En la figura 20 se muestra la gráfica que relaciona los valores de absorbancia con la muestra de suero y de LCR correspondientes. En ambas gráficas es evidente que los valores más altos de absorbancia se encuentran en donde se empleó extracto crudo. Considerando un punto de corte de 0.2 para el análisis se observa claramente que en donde se empleó GSH-Px, las

ELISA RAPIDO

GSH-Px

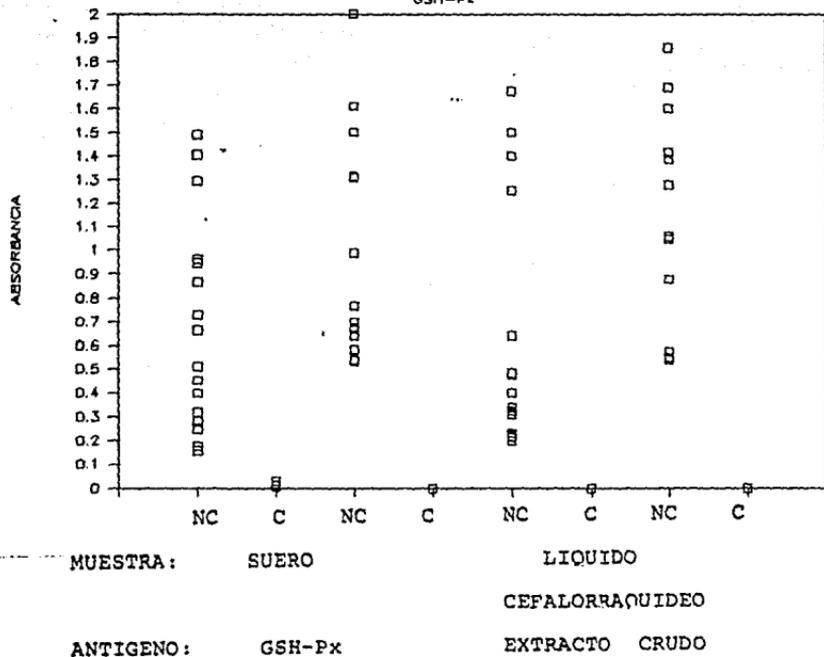


FIG. 20 VALORES DE ABSORBANCIA OBTENIDOS AL COMPARAR LA CALIDAD ANTIGENICA DE GSH-Px CON EL EXTRACTO CRUDO EN MUESTRAS TANTO DE SUERO COMO DE LCR.

muestras registradas como positivas utilizando extracto crudo caen por debajo de nuestro límite. Se obtuvo como resultado que la GSH-Px tuvo un 80% de sensibilidad.

III.2.4 IET

Un total de 16 muestras anteriormente evaluadas por ELISA cuyo punto de corte era dudoso fueron procesadas por IET y se obtuvo que sólo 6 de éstas fueron positivas, 38% (fig. 21).

Con ésta técnica también se empleó GSH-Px como antígeno, se evaluaron muestras de suero de conejos preinmunizados e inmunizados contra GSH-Px, en donde se emplearon diferentes diluciones, y como se observa en la figura 22 el antígeno reconoció únicamente al suero incubado 1:100.

IV. DISCUSION

Se logró hacer más práctico el ELISA original para el diagnóstico de la neurocisticercosis humana pasando de dos días de duración su procesamiento a solamente no más de tres horas, sin detrimento de su especificidad, sensibilidad y costo. Este avance le confiere al ELISA-rápido una ventaja más sobre, por ejemplo, la inmunoelectrotransferencia que además de costosa es de un procedimiento complicado y de largo procesamiento.

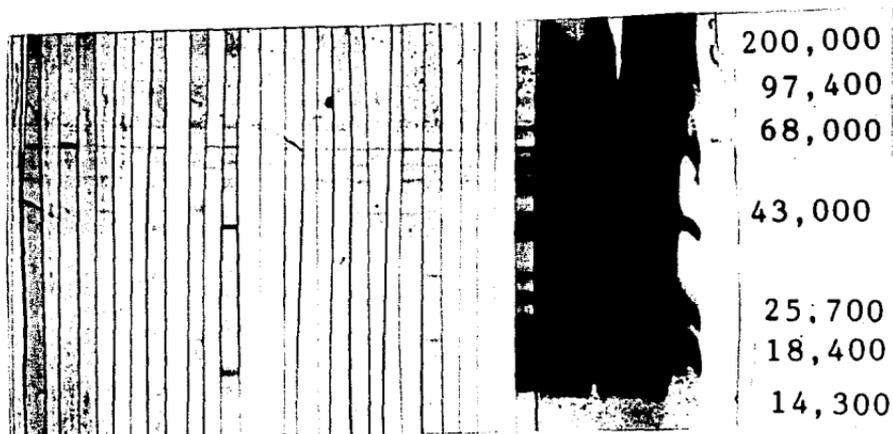


FIG. 21 IET de glicoproteínas revelado con suero (1) y LCR (2) que por ELISA tuvieron un valor de punto de corte dudoso. Se observan el control de peso molecular bajo (PM) y la fracción LL-GP teñidos

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

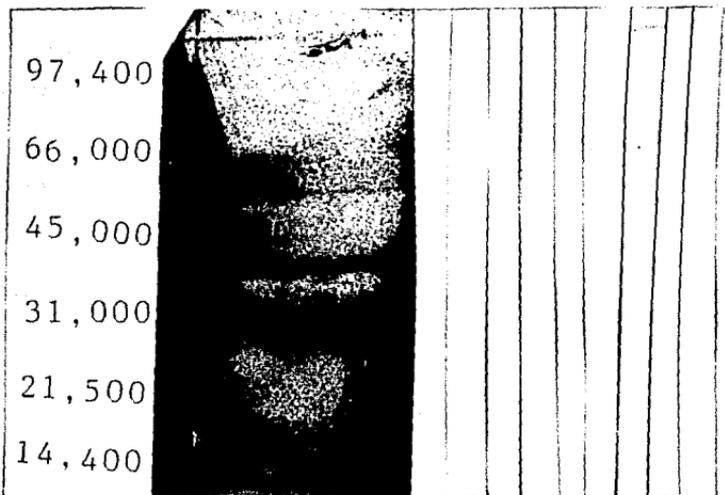


FIG. 22 IET de GSH-Px revelado con suero de conejos preinmunizados (A) e inmunizados (B) con GSH-Px. Los sueros se emplearon, en ambos casos, con diluciones de 1:50, (1), 1:100, (2), 1:500, (3), y 1:1000, (4). (a) Peso molecular

La explicación de haber podido disminuir los tiempos de incubación de los diferentes reactivos en el ELISA-rápido estriba en combinar de forma óptima la temperatura corporal en la reacción antígeno-anticuerpo durante treinta minutos, si la concentración de antígeno no se modificó y la del primero se aumentó un poco más de quince veces más concentrado logran el mismo objetivo pero en tiempo y temperaturas disímiles. El segundo anticuerpo empleado en el ELISA-rápido al doble de la concentración original contribuye a explicar que la concentración del primer anticuerpo en el ELISA-rápido es mayor que en el ELISA original y no sólo que el resultado deba ser un efecto de la temperatura.

El haber obtenido en los controles negativos valores de absorbancia de 0.2 o menor establecen la especificidad de éste método similar a la que si se hubieran empleado diluciones muy altas tanto del primero como del segundo anticuerpo cuya razón de utilizarlas es precisamente disminuir las secciones inespecíficas.

En lo que se refiere al ELISA descrito por ASTRA tal como lo indican las figuras 14 y 15, el tiempo de incubación del substrato no debió de ser de 10 minutos sino necesariamente la reacción tiene que vigilarse, mientras se lleva a cabo y debe detenerse cuando se visualice un tenue fondo de color azul en los pozos de los controles negativos.

Comparando los métodos de ELISA-rápido y el de ASTRA se

puede observar que los valores de absorbancia con extracto crudo en algunos casos son mayores que los obtenidos con la placa de ASTRA, aún los que corresponden a los valores controles, sin embargo en un 80% de las veces sucede lo contrario. El punto de corte estandarizado para el método de ASTRA es de 0.2, igual al del ELISA-rápido.

Es bien sabido que el empleo de un extracto crudo obtenido a partir de metacéstodos de Taenia solium puede presentar reacción cruzada con otros helmintos como por ejemplo Echinochoccus granulosus quien ocupa una posición filogenética muy cercana a la de Taenia solium, esto puede deberse sobre todo a que el extracto está constituido por todo el parásito y no sólo por uno o varios componentes únicos o característicos del helminto.

Por lo anterior en los últimos años se ha hecho necesario el purificar una proteína propia de Taenia solium o por lo menos que cruce con dicha especie y que sea característica del género y no de toda la familia.

La presencia de la enzima Glutación Peroxidasa se determinó tanto en metacéstodos de Taenia crassiceps de la cepa ORF como en los de Taenia solium.

Es de gran utilidad el empleo de antígenos puros como es la GSH-Px que aunque se extrajo a partir de metacéstodos de Taenia crassiceps presentan reacción cruzada con Taenia solium ya que filogenéticamente están relacionadas estas dos especies.

El cisticerco de T. crassiceps comparte gran cantidad de

antígenos con el cisticerco de T. solium, y puede reemplazar a los antígenos de T. solium sin detrimento en la sensibilidad y especificidad en la serología diagnóstica de cisticercosis. Este hallazgo aunado a la facilidad en la obtención de antígenos a partir de los ratones infectados, constituye un avance significativo en el diagnóstico de la cisticercosis. Del gran conjunto de antígenos de T. crassiceps, en los últimos años se han identificado aquellos reconocidos con alta frecuencia por individuos cisticercosos. Esta información podría ser de gran utilidad en la selección de antígenos a ser clonados para utilizarse posteriormente con fines diagnósticos (Sciutto, 1990).

En los resultados obtenidos en el presente trabajo puede observarse que el empleo de GSH-Px como antígeno puro, empleado en ensayos inmunoenzimáticos para la detección de anticuerpos anti-cisticerco puede llegar a tener un gran éxito, principalmente debido a su alto valor de sensibilidad el cual es del 80%.

Comparando los datos de absorbancia obtenidos en el ELISA-rápido empleando extracto crudo con los valores resultantes utilizando la misma técnica pero con GSH-Px es claro el hecho de que se detecta menor título de anticuerpos lo cual puede deberse seguramente a que se trata de un antígeno puro y por ello no puede actuar con otras cosas inespecíficas como sucede con los extractos totales.

La IET es una técnica con una alta sensibilidad y gran poder resolutivo. Se han identificado entre 30 y 50 antígenos

diferentes, la mayoría de ellos de reacción cruzada con otras helmintiasis, por lo que es necesario contar con un método altamente específico.

Actualmente es de gran utilidad el contar con un antígeno puro útil para poder ser empleado en ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) los cuales tienen algunas ventajas sobre la IET ya que además de poder ser empleados en estudios epidemiológicos su costo es mucho menor, no obstante que se emplean reactivos de importación, que además se requiere de un espectrofotómetro, y que la prueba debe efectuarse por duplicado. Plancarte y colaboradores en 1982 registran un costo aproximado de 2 dólares además de lo anterior el ELISA-rápido representa una gran ventaja sobre el ELISA original, ya sea siguiendo la técnica descrita por ASTRA o la registrada por México, ya que aquel se realiza en un sólo día y con un tiempo aproximado de 3 horas y media, mientras que éstos tienen un período de duración mayor. Por el contrario la IET es una técnica que requiere de mayor esfuerzo, equipo, reactivos y tiempo; todo lo cual repercute en el costo de la misma.

V. CONCLUSIONES

El inmunodiagnóstico es una de las herramientas de trabajo más poderosas que se utiliza tanto para el diagnóstico clínico como para los estudios de epidemiología.

Los resultados muestran que la detección de

anticuerpos anticisticerco empleando ELISA-rápido e Inmunoelectrotransferencia pueden ser usados para el inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana, obteniéndose datos satisfactorios cuando se emplea extracto crudo y glicoproteínas, respectivamente.

Es de gran ayuda para el diagnóstico clínico el empleo del ELISA como prueba de rutina, por lo menos en México, en donde otras helmintiasis no son tan relevantes, pudiéndose emplear dicha técnica como "prueba tamiz" sobre todo cuando el valor de absorbancia es dudoso y se encuentra en el límite del punto de corte, se puede evaluar la muestra con IET.

Los metacéstodos de Taenia crassiceps cepa ORF poseen Glutación Peroxidasa la cual tiene reacción cruzada con Taenia solium, pudiendo ser un buen recurso para la obtención de antígenos.

La Glutación Peroxidasa puede ser empleada exitosamente como antígeno puro en el Inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana.

En las condiciones en que se empleó la GSH-Px se obtuvo que como antígeno puro tiene un 80% de sensibilidad.

Al comparar la calidad antigénica de GSH-Px con el extracto crudo es claro que la enzima tiene más ventajas, dejando a un lado su gran facilidad de obtención es muy claro que jugando con

... las variables que intervienen en la reacción antígeno-anticuerpo que se lleva al cabo en el ELISA su sensibilidad puede aumentar considerablemente.

V. BIBLIOGRAFIA

Acha, P. y Szifres, B. 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes en el hombre y los animales. 2a. edición. Organización Paramericana de la Salud. Publ. Cient. 503 Washington D.C.

Aluja, A., Escobar, A., Escobedo, F., Flisser, A., Laclette, J.P., Larralde, C., Madrazo, I., Velazquez, V. y Willms, K. 1987. Cisticercosis. Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por Taenia solium. Biblioteca de la salud, Inst. Nacl. Salud Públ. Fondo de Cultura Económica. México. p.115

Cardenas, F., Plancarte, A., Quiroz, H., Rabiela, M.T., Gomez-Leal, A., Correa, D. y Flisser, A. (1989) Taenia crassiceps: Experimental Model of Intraocular Cysticercosis. *Experimental Parasitology*. 69, 324-329.

Cañedo, L., Laclette, J.P., Morales, E. 1982. Evagination of the metacystode of Taenia solium. En: Flisser, A., Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C., Beltrán, F. (eds.). *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press. New York. pp.363-374.

Cho, S., Kim, S., Kong, S., Cho, Y., Suk, J., Choi, K., Ha, Y., Chung, Ch., y Myung, H. 1986. Evaluation of Enzyme-linked Immunosorbent Assay in Serological Diagnosis of Human Neurocysticercosis using paired samples of serum and cerebrospinal fluid. *The Korean Journal of Parasitology*. Vol. 24, No. 1, pp. 25-41.

Correa, D., Morales, Z., Medina, Y., García, C., Medina, E., Mandujano, A., Ortiz, D. y Meza, A. 1991. Teniasis y cisticercosis por Taenia solium. Publicación técnica del INDRE no. 4. Secretaría de Salud.

Cox, F.E.G. 1982. *Modern Parasitology*. Blackwell Scientific Publications. Oxford. p. 126-159.

Cruz, M., Proaño, J. y Stacey, P. 1986. Epidemiología, Clínica y Tratamiento de la Cisticercosis Cerebral. En: *Teniasis-Cisticercosis*. Revista de divulgación científica de Ecuador. Vol. 1, No. 1. Ecuador. pp. 71-78.

Dixon H. Hargreaves W. 1944. Cysticercosis (Taenia solium) a further ten years' clinical study, covering 284 cases; *O.J.M. New Series* no. 52:107-1.021.

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., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. Academic Press. Inc. New York, USA. pp.163-170.

Espinoza, B., Ruiz-Palacios, G., Tovar, A., Sandoval, M., Plancarte, A. y Flisser, A. 1986. Characterization by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of the Humoral Immune Response in Patients with Neurocysticercosis and its Application in Immunodiagnosis. Journal of Clinical Microbiology. 4:536-541.

Flisser, A., Woodhouse, E. y Larralde, C. 1980. Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. Clin. Exp. Immunol. 39:27-37.

Flisser, A. 1988. Neurocysticercosis in Mexico. Parasitology Today 4:131.

Freeman, R.S. 1962. Studies of biology of T. crassiceps (Zeder, 1800), (Rudolphi, 1810) Cestoda. Can. J. Zool. 40:969-990.

Gutierrez, M. 1989. Diagnóstico inmunológico de la cisticercosis. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A., Malagón, F., Perez, M., Rabiela, M.T. (eds.). LIMUSA. México.

Lacleste, 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., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. Academic Press. Inc. New York, USA. 375-388.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 22(15):680-685.

Lamothe, R. 1983. Introducción a la Biología de los Platelminfos. AGT, Editor. México.

Larralde, C. 1989. Inmunodiagnóstico de la cisticercosis: del laboratorio a la industria. En: Cisticercosis Humana y Porcina. Su conocimiento e Investigación en México. Flisser, A. y Malagón, F. (eds.) LIMUSA. México. pp.187-195.

Larralde, C., Montoya, R.M., Sciutto E., Diaz, M.L., Govezensky, T. y Coltorti, E. 1989. Deciphering western blots of tapeworm antigens (Taenia solium, Echinococcus granulosus y Taenia crassiceps) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. Am. J. Trop. Med. Hyg. 40 (3): 282-290

Larralde, C., Siutto, E., Huerta, L., Terrazas, I., Frago, G., Trueba, L., Lemus, D., Lomeli, C., Tapia, G., Montoya, R.M., Diaz, M.L. y Govezensky, T. (1989). Experimental Cysticercosis by Taenia

crassiceps in mice: factors involved in susceptibility. Acta Leidensia, 57, No.2, 131-134.

Leid R.W. 1977. Immunity to the metacestode of Taenia taeniformis in the laboratory rat. Am. Soc. Trop. Med. Hyg. 26(6):54-60.

Leid, R.W., Suquet, C.M. y Tanigoshi, L. (1989). Oxygen detoxifying enzymes in parasites: a review. Acta Leidensia, 57, No.2, 107-114.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Lewis-Farr, A. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.

Malagón, F. (1989) Elementos del binomio teniasis/cisticercosis: una síntesis. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A., Malagón, F., Pérez, M., Rabiela, M. T. (eds.) LIMUSA, México.

Mills, G.C. 1957. Hemoglobin Catabolism I. Glutathione Peroxidase an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. J. Biol. Chem. 229:189.

Mills, G.C. 1959. The purification and properties of Glutathione Peroxidase of erythrocytes. J. Biol. Chem. 243(3):502-506.

Moyao, H. 1990. Purificación y caracterización de la glutatión peroxidasa de cisticercos de Taenia crassiceps. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM

Morera, P. 1989. Los estados larvales de los céstodos de interés en salud pública. II simposio Internacional de cisticercosis.

Nieto, D. 1956. Cysticercosis of the nervous system diagnosis by means of the spinal fluid complement fixation test. Neurology 6:725.

Ortiz, L. 1987 Inmunología. Interamericana. 1a. ed. México.

Organización Mundial de la Salud: (OMS). Infecciones intestinales por protozoos y helmintos. Serie de Informes Técnicos No. 666, Ginebra, 1981.

Placencia M.D., Paredes, V., Madera, A. 1986. Manifestaciones radiológicas de la Neurocisticercosis. En: Teniasis Cisticercosis. Revista de divulgación Científica, Ecuador. 1(1):9-21.

Plagia, D.E. and Valentine, W. 1967. Studies on the quantitative characterization of erythrocyte glutathione

peroxidase. J. Lab. Clin. Med. 70(1):158-169.

Plancarte, A., Espinoza, B. y Flisser, A. 1989. Inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana por el ensayo inmunoenzimático (ELISA). En: Cisticercosis Humana y Porcina. Su Conocimiento e Investigación en México. Flisser, A. y Malagón F. (eds.) LIMUSA, México.

Quiroz, M. 1989. Diagnóstico Inmunológico de la Cisticercosis. En: Cisticercosis humana y porcina: Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A. y Malagón F. (eds.) LIMUSA. México.

Rabiela, M.T., Rivas, A., Rodríguez, J., Castillo, S., Cancino, F.M. (1982). Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis. En: Cysticercosis present state of knowledge and perspectives. Flisser, A., Willms, K., Lacllette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. Academic Press. Inc. New York, USA pp.179-200.

Rodríguez-Carvajal, J., Boleaga-Durán, B. 1982. Neuroradiology of human cysticercosis. En: Cysticercosis present state of knowledge and perspectives. Flisser, A., Willms, K., Lacllette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. Academic Press. Inc. New York, USA pp.139-162.

Rosen, F., Steiner, L., Unanue, E. 1989. Dictionary of immunology. Stockton Press. New York, USA.

Sally, C.J., Chau, J. and Freeman, R.S. 1976. Intraperitoneal passage of T. crassiceps in rats. J. Parasitol. 62(5):837-839.

Sciutto, E. (1990) Aportaciones de la cisticercosis murina experimental por Taenia crassiceps al conocimiento de los factores biológicos que participan en la susceptibilidad a la infección por metacéstodos y al diagnóstico y prevención de la cisticercosis por Taenia solium. Tesis doctoral. Colegio de ciencias y humanidades. UNAM.

Stryer, L., 1985. Bioquímica. Reverté. 2a. edición. Barcelona, España.

Téllez-Girón, E., Ramos, M.C., Alvarez, P., Dufour, L. y Montante, M. 1989. Detection and characterization on antigens from Taenia solium Cysticercus in cerebrospinal fluid. Acta Léidensia. 57, no.2, 101-105.

Towbin, H., Stoehelin, T. y Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 76, No. 9 pp.4350-4354. Sept. 1979. Biochemistry.

Tsang, V.C.W., Brand, J.A. y Boyer, A.E. 1989. An Enzyme-Linked Immuno-electrotransfer Blot Assay and Glycoprotein Antigens for Diagnosing Human Cysticercosis (Taenia solium). The Journal of Infectious Diseases. Vol. 159, no. 1.

Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlett, A. 1976. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Bull. World Health Organ. 53:55-65.

Walls, K. and Schantz, P. 1986. Immunodiagnosis of Parasitic Diseases. Helminthic Diseases, Academic Press, New York, p.301.

Watson, J.M. 1960. Medical Helminthology, Bailliere Tindal and Cox, London.

Woodhouse, E., Flisser, A. y Larralde, C. 1982. Seroepidemiology of human cysticercosis in Mexico. In: Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives. Edited by Flisser, A., Willms, K., Laclette, J., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. Academic Press. Inc. New York, USA. 11-24.

World Health Organization (WHO): Parasit Zoonosis. Technical Report Series no. 637, Geneva, 1979.

Zenteno, G.H. 1982. A classification of human cysticercosis. En: Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives. Edited by Flisser, A., Willms, K., Laclette, J., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. Academic Press. Inc. New York, USA. 107-126.

VI. APENDICE

ENSAYO INMUNOENZIMATICO (ELISA). Voller, 1976.

1. SOLUCIONES.

a) Amortiguador de carbonatos.

Carbonato de sodio (Na ₂ CO ₃) (J.T.Baker) 0.02M	0.159g
Acido carbónico (NaHCO ₃) (J.T.Baker) 0.69M	0.293g
Azida de sodio (N ₃ Na) (J.T.Baker) 0.0061M	0.020g

Aforar a 50ml con agua destilada-desionizada, a pH 9.6.

b) Amortiguador de fosfato de sodio-Tween 20.

Cloruro de sodio NaCl (J.T. Baker) 0.015M	16.00g
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄) 0.0014M	0.40g
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄) 0.02M	5.80g
Cloruro de potasio KCl (J.T.Baker) 0.0026M	0.40g
N ₃ Na 0.0061M	0.40g
Tween-20 (Sigma Chemical Co.) 0.05%	1.0ml

Aforar a 2 litros con agua destilada-desionizada, pH 7.2.

c) Amortiguador de dietanolamina al 10%

N ₃ Na	0.2g
Cloruro de magnesio (MgCl ₂ · 6H ₂ O) (J.T.Baker)	100.0g
Dietanolamina (Sigma)	97.0ml
Agua destilada-desionizada	800.0ml

Ajustar el pH a 9.8 con HCl 1N

Guardar a 4°C protegido de la luz.

d) Substrato

Fosfatasa alcalina (Sigma)	20.0mg
Amortiguador de dietanolamina	15.0ml
Agua destilada-desionizada	5.0ml

El amortiguador de dietanolamina debe estar a temperatura ambiente, se prepara la solución antes de agregarse a cada uno de los pozos.

2. CUANTIFICACION DE PROTEINAS.

METODO DE LOWRY (1951).

Se obtiene una curva patrón disponiendo en el eje de las abscisas las concentraciones de 10, 20, 50 y 100 μ g/ml de valores de absorbancia a 600nm de las concentraciones mencionadas una vez realizado el procedimiento que se describe más adelante, con estos valores se calcula la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación lineal.

Para determinar las concentraciones de las proteínas problema, se prueban dos o tres volúmenes diferentes porque no se sabe la concentración de las mismas, en seguida se interpolan los valores de absorbancia obtenidas en la curva patrón.

SOLUCIONES

Amortiguador de fosfatode sodio (AFS) 10X	
Fosfato de sodio dibásico (NaH_2PO_4)	6.9g ₂
Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4)	7.1g
Cloruro de sodio (NaCl)	43.8g

Azida de sodio N (Na)	0.2g
Agua destilada desionizada	400.0ml

Medir pH 7.0 y aforar a 500ml con agua destilada desionizada.

Amortiguador de fosfato de sodio (AFS) 1X

AFS 10X	100.0ml
---------	---------

Aforar a un litro con agua destilada desionizada.

Solución de Lowry

Carbonato de sodio anhidro (Na ₂ CO ₃) 2% en	
Hidróxido de sodio NaOH) 0.1N	9.8ml
Tartrato de sodio y potasio 2%	0.1ml
Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO ₄ · 5H ₂ O) 1%	0.1ml
Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N	0.4g
Agua destilada desionizada	100.0ml

Carbonato de sodio anhidro (Na ₂ CO ₃) 2%	2.0g
Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N	100.0ml
Tartrato de sodio y potasio 2%	2.0g
Agua destilada desionizada	100.0ml

Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO ₄ · 5H ₂ O) 1%	1.0g
Agua destilada desionizada	100.0ml

Solución de Folin

Reactivo de Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Merck) más agua destilada en una proporción de 1:1 de v/v.

PROCEDIMIENTO

1. Agregar a cada tubo el volumen de muestra que se eligió, tanto de la curva patrón como de los experimentales y aforar a 1 ml con AFS 1X. Incluir un tubo solamente con 1 ml de AFS 1X como control o blanco.
2. A todos los tubos (curva patrón, experimentales y blanco) se les adiciona 4 ml de la solución de Lowry; agitar.
3. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Adicionar a todos los tubos rápidamente 0.4ml de la solución de Folin y agitar mucho.
5. Incubar a temperatura ambiente

ELECTROFORESIS (Laemmli,1970).

1. SOLUCIONES

Composición de los geles. concentrador	Gel separador	Gel
	10%	5%
Acrilamida 30%-Bis 0.8%	11.0 ml	3.5 ml
Tris-HCl 2M pH 8.8	6.0 ml	-----
Tris-HCl 2M pH 6.8	-----	0.65 ml
SDS 10%	0.3 ml	0.1 ml
Persulfato de amonio	0.5 ml	0.2 ml
Agua destilada-desionizada	11.2 ml	11.5 ml
TEMED	30.0 µl	10.0 µl

Mezclar, agitar y desgasificar.

- Acrilamida.

Acrilamida (Bio-Rad) 30%	30.0g
N,N'-Metileno-bis-acrilamida (Bio-Rad) 0.8%	0.8g
Agua destilada-desionizada	100.0ml

Se almacena en frio a 4 C.

-Tris-HCl 2.0M pH 8.8

Tris (hidroximetil) aminometano (J.T.Baker)	24.228g
Agua destilada-desionizada	100.0ml

Ajustar el pH con ácido clorhídrico (HCl) concentrado.

-Tris-HCl 2.0M pH 6.8

Tris (hidroximetil) aminometano (J.T.Baker)	24.228g
Agua destilada-desionizada	100.0ml

Ajustar el pH con HCl concentrado.

-Duodecil Sulfato de Sodio (SDS)

SDS (Bio-Rad) al 10%	10.0g
Agua destilada-desionizada	100.0ml

-Persulfato de sodio (Bio-Rad)	10.0mg
Agua destilada desionizada	1.0ml

Se prepara inmediatamente antes de usarse.

Mezcla para solubilizar proteínas

SDS	100.0mg
Mercaptoetanol (Bio-Rad)	100.0µl
EDTA (Sigma)	7.4mg
Glicerina (J.T.Baker)	1.0ml
Tris-HCl 0.05M pH 6.8	aforar a 10.0ml
Azul de Bromofenol (Bio-Rad)	lo suficiente para que de color.
El mercaptoetanol se agrega	al descongelar cada alicuta (10µg/ml).

Tris-HCl 0.05M pH 6.8

Tris (hidroximetil) aminometano	121.14mg
Agua destilada-desionizada	20.0ml
Ajustar el pH con el HCl concentrado.	

Solución madre para el amortiguador de corrida

Tris (hidroximetil) aminometano	12.0g
Glicina (Sigma)	57.6g
Aforar con agua destilada a 1000 ml.	

Amortiguador de corrida o solución de trabajo a pH 8.5

Solución madre	200.0ml
SDS al 10%	8.0ml
Aforar con agua destilada a 1000 ml.	

Solución para teñir geles (Mayer y Lamberts, 1965).

Azul de Coomassie R-250 (Bio-Rad)	1.25g
-----------------------------------	-------

Metanol al 50%	454.0ml
Acido acético al 7%	46.0ml

Se filtra para evitar que los sedimentos del colorante se peguen a los geles.

Metanol al 50%

Metanol Absoluto (J.T.Baker)	250.0ml
Agua destilada	250.0ml

Acido acético al 7%

Acido acético (J.T.Baker)	3.5ml
Agua destilada	46.5ml

Solución para desteñir geles

Acido acético	100.0ml
Agua destilada	900.0ml

PREPARACION DE GELES EN LAMINA.

1. Hacer el gel separador al 10%. El tiempo mínimo para polimerización es de una hora.

2. Hacer el gel concentrador al 5%, antes de que polimerice se coloca el peine que forma o no los carriles del gel. Si se va a preparar un gel analítico se usa un peine para formar varios carriles. Si se va a preparar un gel preparativo para transferencia se usa el peine para formar tres carriles, dos chicos y uno grande. La polimerización tarda una hora.

Preparación de muestras para correr la electroforesis.

Todas las muestras que se vayan a correr en los geles de 0.75 mm de grosor deben tener aproximadamente 30 μ g de proteína por carril, los volúmenes pueden variar pero sin pasar de 75 μ l para un gel de 10 carriles.

3. Las muestras se colocan en tubos de vidrio de 5 ml más la mezcla para solubilizar a las proteínas en una proporción de 1:1 de v/v. Si se requiere un gel reductor se le agrega mercaptoetanol a la mezcla para solubilizar a las proteínas. A todos los geles se les debe poner en uno de sus carriles el control de peso molecular con la mezcla para solubilizar proteínas en condiciones reducidas. Los tubos se tapan, se sellan con papel adhesivo y se ponen en baño "María" durante 5 minutos.

4. Colocar las muestras en los carriles del gel. A los carriles que queden sin muestras se les agregan un poco de la mezcla para solubilizar a las proteínas. Llenar todos los carriles con amortiguador de corrida para electroforesis.

5. Correr las muestras en el gel concentrador a 40 mA y en el separador a 100 mA a 4°C.

6. Al terminar la electroforesis se tiñe al gel con azul de Coomassie; se deja por lo menos 6 horas o toda la noche.

7. Desteñir el gel con ácido acético al 10%; se le hacen los cambios necesarios hasta quedar totalmente transparente y con las bandas de proteína bien definidas.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET). Towbin, 1979;

Tsang y col., 1986.

A) ELECTROFORESIS.

Todas las soluciones y amortiguadores son los mismos que se indican en la parte de electroforesis.

Gel preparativo de transferencia.

1. Preparar el gel separador al 10% de 0.75 mm de grosor.

2. Hacer el gel concentrador al 5%, antes de polimerizar se coloca el peine que forma tres carriles, dos chicos y uno grande. La polimerización tarda una hora.

Preparación de muestras

3. Las muestras se colocan en tubos de vidrio de 5 ml más la mezcla para solubilizar proteínas en una proporción de 1:1 de v/v, no deben de sobrepasar de 800 μ l para el carril grande. Todos los geles deben de llevar en los carriles chicos el control de peso molecular bajo con la mezcla para solubilizar proteínas con mercaptoetanol en la misma proporción. Los tubos se tapan, se sellan con papel adhesivo y se ponen en baño "María" durante 5 minutos.

4. Colocar las muestras en los carriles del gel. Llenar todos los carriles con amortiguador de corrida para electroforesis.

5. Correr las muestras en el gel concentrador a 40 mA y en el separador a 100 mA a 4°C.

6. Cortar un extremo del gel abarcando el control de peso molecular y parte de la muestra.

7. Tefir el gel conazol de Coomasie. Se puede dejar por seis horas o toda la noche.

8. Desteñir el gel con ácido acético al 10%; hacer los cambios necesarios hasta que quede totalmente transparente y con las bandas de proteína bien definidas.

B) TRANSFERENCIA DEL GEL A PAPEL DE NITROCELULOSA.

1. SOLUCIONES.

a) Amortiguador de transferencia

Tris (hidroximatil)aminometano 0.025M	3.0 g
Glicina 0.192	14.48g
Metanol al 20%	200.00ml

Aforar con agua destilada-desionizada a 1 litro y ajustar a un pH de 8.3.

b) Amortiguador de fosfato de (AFS) 1X

AFS 10X (1)	100.00ml
-------------	----------

Aforar a 1 litro de agua destilada.

(1) Amortiguador de fosfato de sodio (AFS) 10x

Fosfato de sodio dibásico (NaH_2PO_4)	6.2 g
---------------------------------------------------------	-------

Agua destilada desionizada	400.00ml
----------------------------	----------

Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4)	7.12g
-----------------------------------------------------------	-------

Cloruro de sodio (NaCl)	43.80g
------------------------------------	--------

Azida de sodio (NaN_3)	0.20g
-----------------------------------	-------

Medir pH 7 y aforar a 500 ml con agua destilada desionizada.

PROCEDIMIENTO

1. Cortar el papel de nitrocelulosa del tamaño del gel y empaparlo con amortiguador de transferencia.

2. Empapar las fibras, rejillas y papel filtro con amortiguador de transferencia.

3. Colocar en el siguiente orden en la cámara de transferencia con amortiguador: dos rejillas, electrodo negativo, una rejilla, fibra, papel "filtro grueso, gel, papel de nitrocelulosa, papel filtro grueso, fibra rejilla, electrodo positivo, tres fibras y la tapa de la cámara. En caso de que sean dos geles se coloca después del segundo papel filtro grueso, fibra, papel filtro grueso, gel papel de nitrocelulosa, papel filtro grueso, fibra, se termina en el mismo orden.

4. Poner la cámara en su caja y conectar los electrodos a la fuente de poder. Correr la transferencia una hora a 1 ampere.

Para asegurar que se realizó adecuadamente la transferencia del gel al papel se corta una tira del papel de nitrocelulosa de 2 X 10 cm se tiñe con amido negro, tinta china o india, y se destiñe con AFS 1X.

5. Guardar el papel de nitrocelulosa con el amortiguador de transferencia o en AFS 1X en congelación colocado entre dos papeles filtro gruesos en una bolsa de plástico, descongelar hasta su uso.