

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

29



**AISLAMIENTO DE ANTIGENOS POSIBLES
CAUSANTES DE BAGAZOSIS**

T E S I S

Que Para Obtener el Título de:

QUIMICO FARMACOBIOLOGO

ORIENTACION BIOQUIMICO - MICROBIOLOGICA

P r e s e n t a

ALFONSO ENRIQUE ISLAS RODRIGUEZ

México, D. F.

1978



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CLAS TESIS 1978
ABO M. C. 208 ~~ADONDA~~ 235
FECHA _____
PREC _____



BIBLIOTECA DE QUIMICA - D. I. P.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



QUIMICA FARMACOLOGICA

QUIMICA FARMACOLOGICA

QUIMICA FARMACOLOGICA

QUIMICA FARMACOLOGICA

QUIMICA FARMACOLOGICA

QUIMICA FARMACOLOGICA

A MARIANA

A LA BEBE:
PAULA EUGENIA

A LOURDES
QUE ME HA DADO
TRIPLE SATISFACCION

A LOS ORIGINADORES DE MI EXISTENCIA

ALFONSO Y LOURDES

A MIS COMPAÑEROS

PATRICIA, TERE Y GERARDO

AGRADECIMIENTO

Con todo cariño un gran reconocimiento
a todas las personas que han sabido vivir
y han ayudado a la culminación de una
etapa más en mi vida

EN ESPECIAL

DRA. SILVIA CONDE MATA

MAESTRA MAGDALENA ACOSTA

PAGINA I

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

TITULO DEL TEMA: AISLAMIENTO DE ANTIGENOS POSIBLES
CAUSANTES DE BAGAZOSIS.



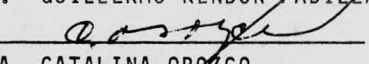
NOMBRE DEL SUSTENTANTE: ALFONSO ENRIQUE ISLAS RODRIGUEZ.

CARRERA: QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO.

ORIENTACION BIOQUIMICO MICROBIOLOGICA.

AÑO 1978.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE
SEGUN EL TEMA

PRESIDENTE: 
PROFA. MAGDALENA ACOSTA SEGURA.
VOCAL: 
PROF. GUILLERMO RENDON PADILLA.
SECRETARIO: 
PROFA. CATALINA OROZCO.
1er. SUPLENTE: _____
PROFA: ERNESTINA BALLESTEROS.
2do. SUPLENTE: _____
PROFA: SOCORRO CAO.

SITIO DONDE SEDESARROLLO EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE ENFER
MEDADES PULMONARES S.S.A.

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL SUSTENTANTE:
ALFONSO ENRIQUE ISLAS RODRI
GUEZ.

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL ASESOR DEL TEMA: 

C O N T E N I D O

	PAG.
Introducción	1
CAPITULO I GENERALIDADES	4
CAPITULO II ESTADO DE HIPERSENSIBILIDAD	11
CAPITULO III PLAN DE TRABAJO EXPERIMENTAL	21
CAPITULO IV MATERIAL Y METODOS	22
CAPITULO V RESULTADOS	39
CAPITULO VI RESUMEN Y DISCUSION	47
CAPITULO VII CONCLUSIONES	50
CAPITULO VIII BIBLIOGRAFIA	51

AISLAMIENTO DE ANTIGENOS POSIBLES CAUSANTES DE BAGAZOSIS

INTRODUCCION:

Dentro de las enfermedades pulmonares, la ba-
 gazosis, ha empezado a ser estudiada desde 1950 (8) y poste-
 riormente considerada (6, 9, 10, 11, 12, 20, 41), como una -
 enfermedad ocupacional muy importante; debido al crecimiento
 de la industria azucarera y al hecho de que no siguen las -
 medidas de protección suficientes los trabajadores de ésta.

Después del proceso de extracción de sacarosa,
 la caña de azúcar queda reducida a bagazo, el cual es utili-
 zado como forraje para el ganado, manufactura de papel, subs-
 tituto de la madera, etc., siendo esta la razón de que el ba-
 gazo se almacene. Sin embargo, el almacenamiento del bagazo
 debido a las condiciones de temperatura y a la humedad, pro-
 picia el crecimiento de hongos en la superficie de éste. El
 bagazo es acomodado en forma de pacas, o bien, molido y acu-
 mulado en pilas para posteriormente envasarlo en sacos. En-
 una u otra forma este material libera micropartículas, que -
 son inhaladas constantemente por los trabajadores. La conta-
 minación con micropartículas llega a ser tan importante que-
 se observa continuamente una cortina de polvo.

El Instituto Nacional de Enfermedades pulmona-
 res S. S. A., así como el Hospital de Enfermedades del Tórax

I.M.S.S., por medio de sus consultas externas, así como de sus interconsultas han logrado diferenciar los cuadros de alveolitis (32, 20) producida por el bagazo, o bien, por otros inductores denominándose por su etiología alveolitis alérgica extrínseca, entre ellas se pueden citar: la alveolitis de los cuidadores de palomas, la llamada "pulmón del granjero", producida por el heno mohoso de las granjas, así como "el pulmón de Nueva Guinea", producido por el polvo mohoso de los techos de las casas, la alveolitis por serrín mohoso, queso mohoso, polvo de pituitaria, etc. Todas las micropartículas descritas en los casos anteriores tienen la misma característica, es decir; que se trata de un polvo muy fino en esos medios ambientes. Anteriormente la alveolitis alérgica extrínseca era agrupada con otras enfermedades pulmonares en una sólo entidad patológica la cual tiene varios sinónimos: fibrosis intersticial difusa idiopática, neumonitis intersticial clásica o usualmente, neumonitis intersticial descamativa, Síndrome de Hamman-Rich, alveolitis fibrosante (difusa - criptogénica).

La diferenciación de la alveolitis de otras enfermedades pulmonares se hace clínicamente, confirmándose por los rayos X en donde se observan estas lesiones en los alveolos. También se puede establecer el tipo de entidad histopatológica mediante biopsia pulmonar (6).

La inhalación de las micropartículas causa una respuesta alérgica de hipersensibilidad a nivel pulmonar (5, 29, 30, 34, 37, 42) que es producida por el antígeno que probablemente reside en la micropartícula. En este estudio se trata de comprobar que existe respuesta inmune de los trabajadores del bagazo, por medio de ciertas pruebas de precipitación, con lo que se pretende demostrar la presencia de anticuerpos humorales.

Así también la prueba puede, junto con otros -
exámenes de gabinete, apoyar el diagnóstico de alveolitis alér
gica extrínseca.

CAPITULO I

GENERALIDADES

1.- Alveolítis Alérgica Extrínseca.

Es una neumopatía producida por la inhalación de polvos orgánicos (20), y que según Farreras, se trata de una entidad patológica aún no bien delimitada que incluye - por un lado, las neumoconiosis secundarias a la inhalación de productos orgánicos, como son la bisinosis producida por la inhalación de polvos de algodón, y la cannabosis producida por la inhalación de bagazo de cáñamo y por el lado en el que modernamente se agrupan una serie de enfermedades bajo el nombre de alveolítis alérgicas extrínsecas, entre las - cuales se encuentra la bagazosis, motivo de nuestro estudio, así como el pulmón del granjero que es la más conocida.

Entre las primeras: neumoconiosis clásicas producidas por polvos orgánicos, las mejor estudiadas son: - la bisinosis y la cannabosis. A esta última se le ha descrito con el nombre de enfermedad de los trabajadores del cáñamo y la cual cursa como una afección respiratoria con crisis asmátiformes agudas y enfisema broncogénico, debido a la inhalación del polvillo del cáñamo. Los cuadros asmáticos suelen ocurrir los Lunes, después de que los obreros han permanecido alejados del trabajo el fin de semana, y al momento de inhalar nuevamente el polvo, se desarrolla la crisis.

Lo anterior determina en los empleados en tales labores una muerte precóz, siendo la edad media en la que fallecen 40 años, el motivo del fallecimiento es la insuficiencia cardíaca derecha, la tuberculización secundaria o una

neumonía intercurrente. Más que una coniosis es una broncopatía asmática irritativa producida por el polvo. La inhalación del polvo crea un síndrome disneico; se presenta ingurgitación de la mucosa ocular, cefalea y hasta fiebre con escalofríos.

No existen imágenes radiológicas, características de estas neumopatías, siendo la clínica y la alteración funcional, así como los antecedentes laborales, los que ayudan en el diagnóstico. Se duda si el mecanismo de estas enfermedades es una reacción alérgica en las manifestaciones que se presentan los primeros días de la semana como sucede en el caso antes descrito.

Alveolítis Alérgica Extrínseca (A.A.E.)

Se conoce con este nombre una serie de enfermedades secundarias debidas también a la inhalación de polvos orgánicos pero que por afectar a individuos no atópicos, no se produce el problema a nivel de la mucosa bronquial -- con el consiguiente cuadro asmático o pseudoasmático, debido a anticuerpos circulantes o "reaginas" IgE, sino a nivel de la pared alveolar (alveolítis), estando mediados por otro tipo de anticuerpos que a diferencia de las reaginas son precipitantes y pueden identificarse por inmunoelectroforesis con el suero de los pacientes.

Es decir, que la inhalación de polvos orgánicos podría producir más bien una afección bronquial con cuadro asmático, o bien, una afección alveolar con cuadro de fibrosis intersticial. (20), (alveolítis alérgica). Como se comprende es difícil diferenciar un proceso de neumoconiosis orgánica simple o de alveolítis alérgica extrínseca. Entre estas últimas figuran las siguientes "el pulmón de granjero", "el pulmón de los descortezadores de arces", " el pulmón de -

criador de pájaros", la bagazosis, "el pulmón de los cultivadores de setas", "el pulmón de los cultivadores de la malta", "el pulmón del procesador del polvo de hipófisis", "el pulmón del lavador de quesos", y otros cuadros menos corrientes en nuestro ambiente

ETIOLOGIA DE LA A.A.E.

Existen varios aspectos etiológicos en alveolitis alérgica extrínseca que deben tomarse en consideración, puesto que serán base de este estudio experimental. - El trabajador en constante contacto con las micropartículas que miden 10 micras , provenientes del bagazo de la caña de azúcar, llega a tener el cuadro referido anteriormente, sin embargo, estas micropartículas se encuentran probablemente combinadas con otras que proceden de hongos contaminantes, los cuales crecen en la superficie de las pacas de bagazo. Así pues, tiene que considerarse la posibilidad de que el antígeno o sustancias inductoras de la A.A.E. residan, o bien, en el bagazo propiamente dicho, así como en este hongo o en ambas.

B A G A Z O S I S

Es la enfermedad alveolitis alérgica extrínseca, debida a la inhalación de micropartículas, propia de los trabajadores de la caña de azúcar y que se debe a las complicaciones progresivas del aparato respiratorio. Los cuadros de A.A.E. difieren como hemos dicho de los de "asma", propiamente en el tiempo de generación de la crisis, las crisis de A.A.E. se manifiestan más tardíamente (5, 6, ó más horas) después de la exposición del antígeno en cuestión, existiendo un trastorno general marcado, habiendo problemas de tipo restrictivo respiratorio.

H O N G O D E L B A G A Z O

Desde 1962, Pepys (36) empezó a relacionar a los hongos presentes, tanto en el heno como en el bagazo directamente con la producción de enfermedades pulmonares, así en el principio de las investigaciones se le atribuyó papel etiológico al género actinomicetes. Después, en 1963, la Estación Experimental de Rothamsted ha hecho referencia a Termoactinomicetos implicados en dichas enfermedades (15), estos son: Actinomicetos termofilos y mesofilos, presentes en el heno, que al tener contacto con algunas personas les produce una enfermedad ocupacional ("pulmón del Granjero"), enfermedad que clínicamente es muy parecida a la producida por el bagazo de caña. La Estación Experimental Inglesa más recientemente, en 1971 (25) reporta Actinomicetos presentes en el propio bagazo de caña, describiéndolos como nuevas especies de Actinomicetos monospóricos termofilos, siendo estos: Micromonospora vulgaris, Termoactinomicetes vulgaris y Termoactinomicetes sachari, también estudiados ampliamente por Wayne, Salvagio y Buechner (50). A estos dos últimos actinomicetos se les atribuye directamente de ser los causantes de la A.A.E. producida por el bagazo de caña (25) debido a la formación de bandas de precipitación frente al suero de pacientes con bagazosis, cuando se prueban por los métodos de doble difusión de Ouchterlony (33) y por inmunoelectroforesis frente a antígenos extraídos de estos hongos (33, 45) .

Aunque para aclarar la responsabilidad etiológica entre T. vulgaris y T. sachari, Lacey (25) reporta datos muy importantes, con extractos de estos hongos obtenidos en medios de cultivo diferenciales confrontados por separado con el suero de pacientes con bagazosis.

Los cultivos en medios apropiados, permitieron a Lacey establecer diferencias entre ambas especies de Termoactinomicetes. A pesar de que ambas especies producen es

poras individuales en micelio aéreo, en T. sachari las esporas están contenidas en una estructura especializada llamada esporófora y en T. vulgaris están dispersas. En cuanto al micelio aéreo T. Sachari lo tiene en forma de penacho y T. vulgaris lo tiene largo. Cabe recordar que el micelio es el conjunto de hifas que son la "unidad funcional" del hongo (actinomiceto). Así pues, mientras T. sachari tiene hifas aéreas esparcidas cortas y un penacho, T. vulgaris -- las tiene abundantes, largas y en forma de arco, en cuanto a la lisis del micelio aéreo, en el caso de T. sachari ocurre rápidamente (máximo 3 días), pero en T. vulgaris no se ha visto esta lisis. Por otro lado, el pigmento soluble de -- T. sachari es amarillo-café y T. vulgaris no lo forma. En cuanto a las actividades bioquímicas de ambos, observamos -- que T. sachari no asimila la sacarosa, T. vulgaris si lo hace, pero en el caso de arabinosa la asimilación es inversa.

Cuando se utilizaron diferentes medios de -- cultivo como: agar nutriente, glucosa y agar extracto de le vadura, se hallaron los siguientes resultados: En agar nutriente, T. sachari, tuvo un crecimiento bueno con abundantes esporas con micelio aéreo blanco o canela. En agar nutriente, glucosado, T. sachari creció moderadamente formando colonias color olivo con autólisis y abundante esporulación con micelio aéreo blanco esparcido pero limitado a sectores, T. vulgaris presentó un crecimiento muy bueno con abundante esporulación y micelio aéreo blanco.

En agar extracto de levadura T. sachari da -- un crecimiento bueno con abundante esporulación, depositándose esporas en el agar dando la apariencia de colonias -- bacterianas de color café, también presentan micelio aéreo, mientras que T. vulgaris presentó un crecimiento pobre con esporulación reducida, con micelio aéreo esparcido y blanco. Ambas especies crecen perfectamente a temperatura de culti

vo de 55°C. Por último, Lacey (25) reportó la prueba de -
inmunolectroforesis en la cual encuentra para T. sachari
la presencia de 3 arcos de precipitación que denominó x, y
y z de los cuales el más común al hacer reaccionar el ex-
tracto frente al suero de los pacientes fue el arco x

. En el caso de T. vulgaris solamente encontraba en
algunas ocasiones el arco, y lo cual significa un cruce en
tre ambas especies de Termoactinomices, el cual está deter-
minado de esta manera, por lo que la mejor forma para dife-
renciar éstas después es la: I.E.F.

CONTENIDO DE POLISACARIDOS DEL BAGAZO

En este aspecto la literatura reporta datos,
que van desde un análisis muy general de la composición tí-
pica del bagazo que es como sigue: Según Vázquez (49).

COMPOSICION TIPICA DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZUCAR (En Cuba)

Fibra	48%
Sustancias solubles	3%
Humedad	49%

Así como otro tipo de análisis que dan un -
concepto incompleto de la química de los constituyentes de
la fibra vegetal (49).

C O M P O S I C I O N T I P I C A

Grupos constituyentes de la fibra de caña -
en el orden de extracción.

Hemicelulosas	29%
Lignina	19%
Celulosa	52%

Lo que se puede apreciar a primera vista es el alto contenido entre hemicelulosa y celulosa.

El siguiente cuadro ha sido repetidamente publicado y muestra la composición química un poco más detallada de bagazo entero, fibra y médula (49).

ANALISIS QUIMICO DEL BAGAZO

Componente	Bagazo Entero	Fibra de Bagazo	Médula de Bagazo
Celulosa.....	46%	56.60%	55.5%
Hemicelulosas..	24.50	26.11	29.30
Grasas y Cera..	3.45	2.25	3.55
Ceniza.....	2.40	1.30	3.02
Lignina.....	19.95	19.15	22.50
Sflice.....	2.00	0.45	2.42

Por último de la misma referencia, se menciona la siguiente composición del bagazo:

Hemicelulosas	26%
Lignina	18%
Celulosa	49%
Sustancias nitrogenadas	2%
Azúcares	6%
Cenizas	2%

II.- Estado de Hipersensibilidad.

Para empezar a revisar estas reacciones antígeno-anticuerpo, es necesario referir que el primero en utilizar el término alergia fué Von Pirquet en 1900 (52), sin embargo, este término se aplicó para explicar que se trata de una respuesta inmune, la cual podía inducir estado de protección, o bien, un daño al organismo. Posteriormente el término alergia se aplicó a los estados inmunológicos en donde la reacción Ag-Ac produce daño tisular y se comenzó a emplear este término como sinónimo de estado de hipersensibilidad con reacción de tipo inmediato, dentro de las cuales encontramos (de acuerdo a la clasificación de Coombs y Gell) a los tipos I,II,III e Hipersensibilidad con reacción tardía, dentro de la cual encontramos el tipo IV. Roitt (39), describió la que él ha denominado como el tipo V o estimulatoria, sin embargo, Escobar (52) considera que el tipo V debe reservarse para otros tipos verdaderamente diferentes a los anteriores, pues clasifica al caso expuesto por Roitt como perteneciente al tipo II, sólo que en lugar de ser citotóxico es decir, anticuerpos de tipo Ig G dirigidos contra célula para lizarla por medio del complemento, es estimulante de la función celular (anticuerpo anti tiroides LATS).

TIPO I Anafiláctica (37b, 34, 39, 5, 42, 52).

Cuando un individuo se ha sensibilizado debido a que ha tenido contacto con un antígeno, y al entrar en contacto de nuevo con ese antígeno se produce la reacción antígeno anticuerpo. En el caso del tipo I puede ser muy enérgica produciéndose paro respiratorio o paro cardíaco que se presenta en minutos.

El antígeno en este caso llamado alergeno, induce la síntesis de anticuerpos IgE denominadas " Reaginas", los cuales se van a fijar por su Fc a células cebadas que tienen receptores de membrana para este Fc, cuando el individuo tiene contacto de nuevo con el alergeno, éste se une -- con el anticuerpo previamente fijado a la célula con receptores para él (cebadas y leucocitos basófilos) este hecho - hace que la célula cebada o el leucocito basófilo desestabilice su membrana por un mecanismo complejo y de lugar a la liberación de: Histamina, que es una amina vasoactiva y que se encuentra en muchos tejidos y que tiene como función con traer al músculo liso.

Sustancia de reacción lenta de la anafilaxia (SRLA) que es un lípido-ácido de peso molecular 400 y que se sintetiza ac tivamente, durante el fenómeno anafiláctico, teniendo como función la contracción prolongada del músculo liso. Factor quimiotático de Eosinófilos de la Anafilaxia (ECF-A), se tra ta de un péptido de peso molecular de 500 ó 600 que se ha lla almacenado en forma de precursor y que atrae a eosinófi los que secretan prostaglandinas E₁ y E₂. Factor de agrega ción de plaquetas (PAF) de peso molecular bajo que se une a la albumina y que se une a las plaquetas propiciando la liberación de serotonina que es otra amina vasoactiva. Todo el mecanismo referido es aplicable al ser humano, no a otras - especies.

Esta unión de la IgE con la célula cebada - y/o leucocito basófilo es muy estable y puede durar hasta 6 semanas (52). Hamburger, recientemente (52) ha aislado a un pentapéptido de la Fc de la IgE el cual es específico -- para el receptor de membrana de la célula o leucocito basófilo, sin embargo, al fijarse pentapéptido y receptor no ocurre la liberación de mediadores antes descrita lo cual - tiene un potencial clínico terapéutico importante, por ejem plo en asma bronquial.

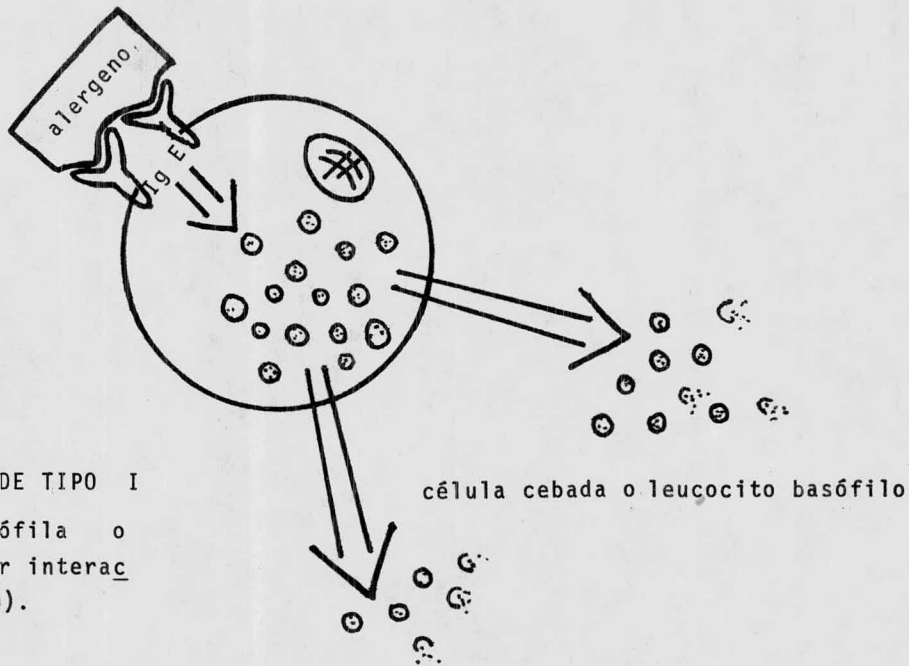


fig 1
HIPERSENSIBILIDAD DE TIPO I
(Degranulación basófila o
células cebadas por interacción Ig E-alergeno).

Puede suceder que el receptor para Ig E sea ocupado por un Ig G STS (Short Term Sensitizing) pero esta unión al no ser específica es inestable y dura sólo (8-10) horas, sin embargo, pudiera existir alguna implicación del complemento y por lo tanto de un daño tisular -- mayor.

TIPO II Citotóxica (5, 39, 46, 52).

Se le conoce como tipo citotóxica, aunque también se ha incluido dentro de ésta al tipo estimulatorio (52), que Roitt propone como tipo V. Cuando un antígeno no está presente en la membrana de una célula, la combinación de éste con su anticuerpo puede iniciar una serie de fenómenos que se describen más adelante. Esto sucede cuando existen anticuerpos del tipo IgG o IgM dirigidos contra: auto antígenos (en el caso de drogas ligadas a membrana), iso antígenos (en el caso de incompatibilidad materno-fetal del grupo sanguíneo), o cuando algún proceso infeccioso ha dado como resultado la alteración de componentes de células propias. Así los Ac se van a unir a los antígenos a nivel de la membrana celular involucrada, propiciando que esta unión Ag-Ac active al complemento, dando como resultado la lisis de la célula. Así también los macrófagos efectuarán su labor fagocitaria, digiriendo a la célula (opsonización), como resultado de la atracción por factores quimiotácticos derivados del complemento activado.

La atracción de otras células del aparato inmune como pueden ser los linfocitos (Killer) ocurre de una manera similar propiciando también citotoxicidad hacia la célula.

TIPO III Mediada por complejos inmunes.
(35, 39, 5, 42, 23, 52,).

Es llamada también, mediada por complejos inmunes y aquí cabe recordar la curva de precipitación de antígeno -anticuerpo de Heidelberger que nos muestra progresivamente las concentraciones de anticuerpos en el eje de las ordenadas y de antígeno en el eje de las abscisas; como es sabido en la zona de equivalencia Ag-Ac, los complejos antígeno-anticuerpo son insolubles y causan problemas, - - pues pueden inducir una reacción de inflamación al depositarse estos complejos insolubles en las paredes de los vasos con la posibilidad de activar al complemento, y de esta manera al funcionar las fracciones C_5 , C_6 y C_7 como anafilotoxinas, éstas atraen a los leucocitos polimorfonucleares (PMN) los cuales al tener una vida media corta, mueren y liberan enzimas lisosómicas que rompen paredes de tejidos y vasos, agregando con esto plaquetas que liberan aminas vasoactivas, como la serotonina, complicando con esto el fenómeno, la agregación de plaquetas forma coágulos necrosando el tejido, además de ésto la acción del Factor de Hageman, como precursor de kalicreínas da origen a otras sustancias vasoactivas. Esto sucede en el fenómeno de Arthus el cual fué descrito por Maurice Arthus, al inyectar antígenos solubles intradérmicamente en conejos hiperinmunes - se produce una zona eritematosa rodeando a esta una zona edematosa, caracterizada por la presencia de un infiltrado intenso de leucocitos polimorfonucleares lo cual apoya lo anteriormente descrito. Reacciones del tipo de Arthus - - acontecen intrapulmonarmente y este mecanismo parece ser - el responsable de un buen número de hipersensibilidades -- pulmonares debido a la inhalación de antígenos del medio ambiente como en el "pulmón del granjero".

TIPO II citotóxica

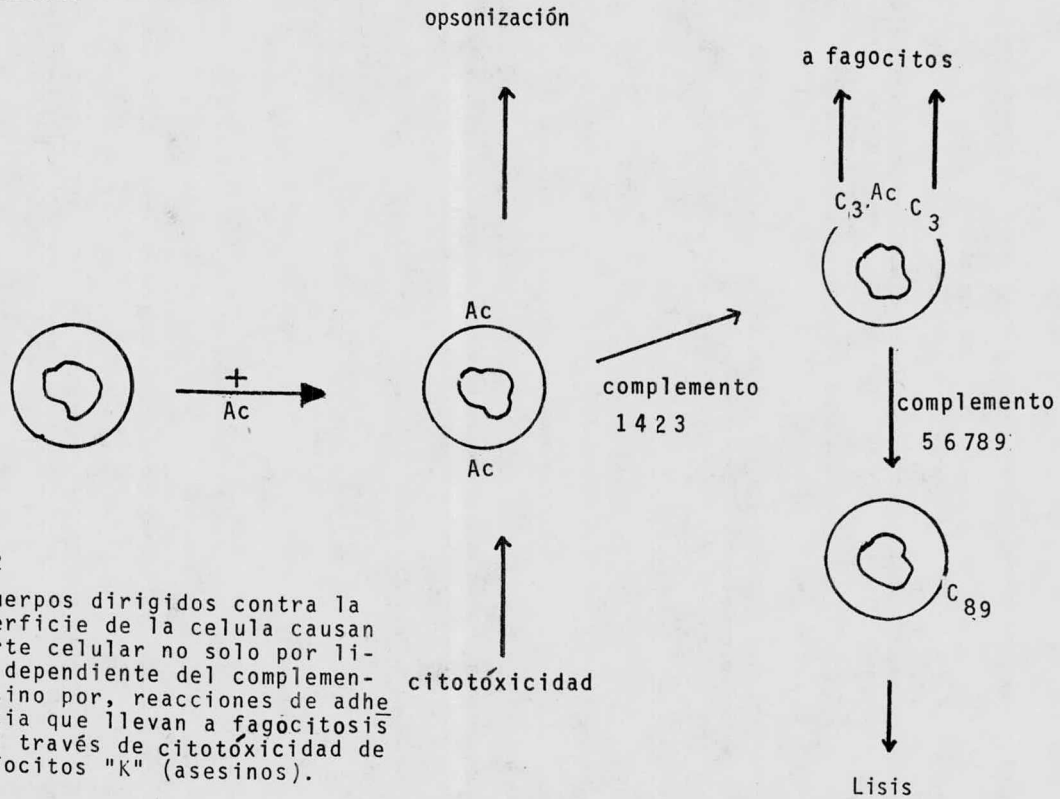
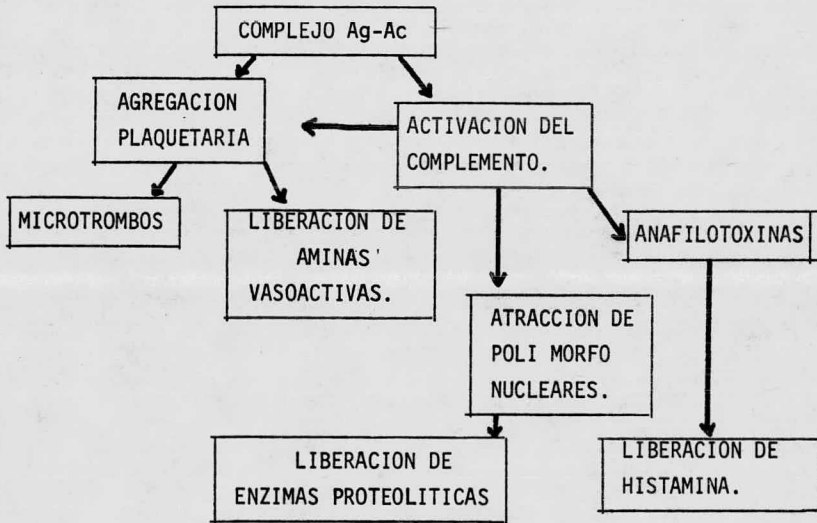


Fig. 2

Anticuerpos dirigidos contra la superficie de la célula causan muerte celular no solo por lisis dependiente del complemento sino por, reacciones de adherencia que llevan a fagocitosis o al través de citotóxicidad de linfocitos "K" (asesinos).

fig 3
TIPO III
mediada por complejos inmunes



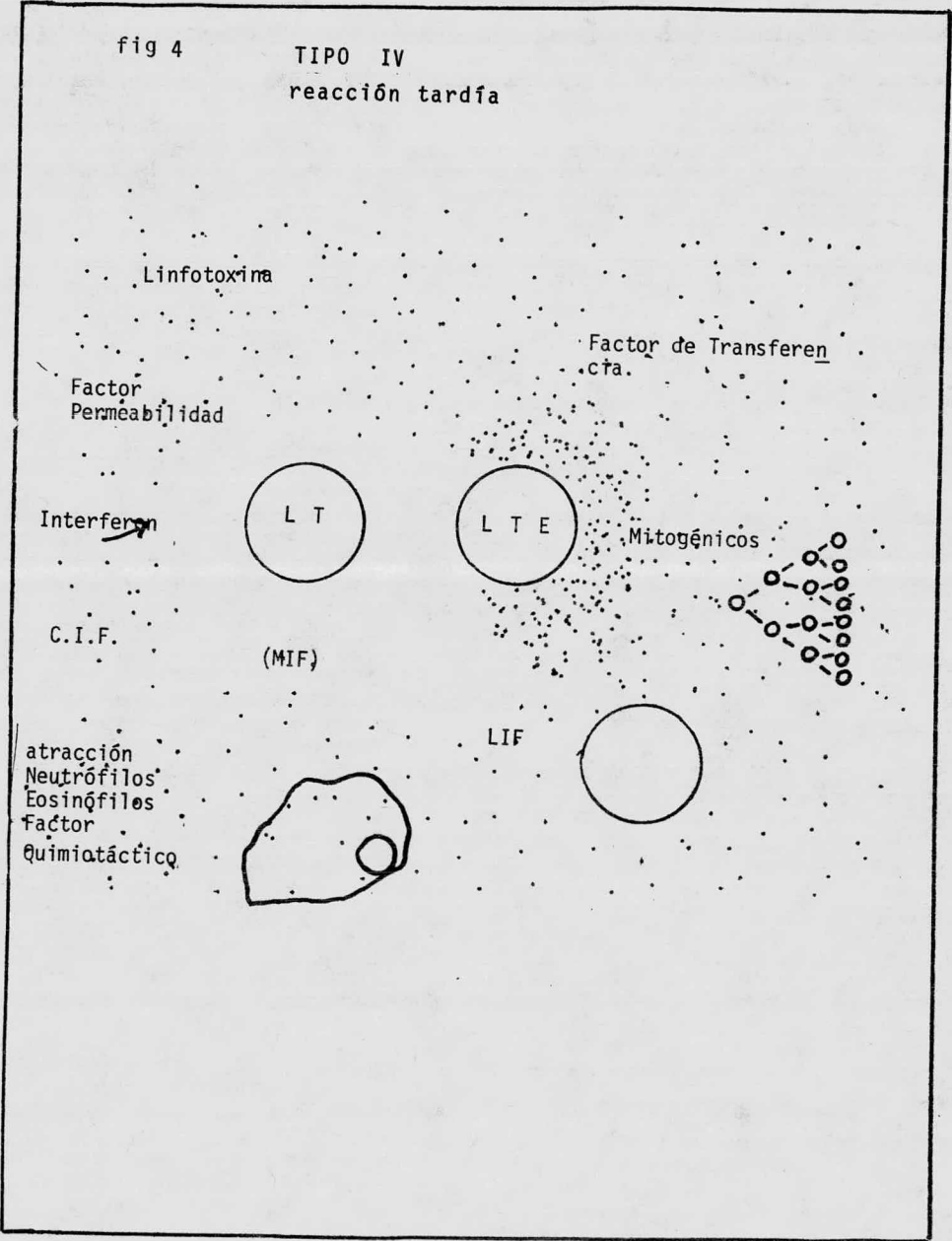
TIPO IV Mediada por células.
(39, 5, 42, 26, 17, 28, 31, 52,)

Este tipo de reacción se presenta en bacterias, virus, y en hongos, así como en agentes químicos aplicados tópicamente (sobre la piel) y en caso de incompatibilidad de transplante de tejidos. Estas reacciones tienen aplicaciones diagnósticas como la reacción de Mantoux en la cual se inyecta tuberculina en la piel de un individuo previamente infectado con micobacterium, lo cual lo ha inducido a un estado de inmunidad mediada por células (IMC), dicha reacción está caracterizada por un eritema y una induración que aparecen 48 horas después de la inyección. Histológicamente, durante la fase temprana se puede observar un gran contenido perivascular de células mononucleares, seguido por una exudación de células mono y polimorfonucleares, en la fase final de la reacción predominan células mononucleares más un infiltrado consistente en linfocitos. Este hecho es de gran valía, pues contrasta perfectamente con el carácter "polimorfonuclear" esencial de la reacción de Arthus. Por el tiempo de su aparición en un individuo previamente sensibilizado se le denomina "respuesta de tipo retardado".

Cuando el antígeno entra en contacto con el sistema inmune, éste va a activar principalmente a los linfocitos T los cuales se van a diferenciar en las mal llamadas células linfoblásticas y en linfocitos T de memoria, esto es posible mediante la ayuda de los monocitos (macrófagos) que son los que van a exponer al antígeno procesado -- después de presentarlo en su membrana al L-T. La célula T efectora, linfocito sensibilizado o programado es la encargada de producir las llamadas linfocinas que van a actuar directamente de las siguientes formas: El factor de inhibi--

ción de la migración (MIF) va a impedir que los macrófagos - presentes en el lugar donde existe este factor se vayan a -- otro lado y actúen donde son necesitados. Existe una linfocina quimiotáctica, atrayendo a neutrófilos, eosinófilos y - mononucleares. Las llamadas factor de inhibición de la mi-- gración de los leucocitos (LIF) y factor de la inhibición de la migración del complemento (CIF). La linfocina mitogénica que tiene acción directa sobre los linfocitos T estimulando- activamente su división. La linfoxina, y por último, una- linfoxina de gran potencial terapéutico, que es el factor de- transferencia que transmite la información del antígeno a -- otros linfocitos que no han tenido contacto con el macrófago- antígeno ampliando así la respuesta. Incluyendo también en- este grupo una linfocina de respuesta contra virus, conocida como el Interferón. Todas las moléculas descritas anterior- mente como linfocinas tienen un peso molecular que oscila en tre 20 000 y 80 000.

fig 4 TIPO IV
reacción tardía



III. PLAN DE TRABAJO EXPERIMENTAL

El bagazo contaminado se sometió primeramente a desengrasado y después se extrajo con solución de Coca, -- que es empleada generalmente para la extracción de algunos vegetales. En este extracto se determinó la cantidad de -- proteínas totales y se estudió la movilidad electroforética de sus componentes. Con el mismo extracto se llevaron a cabo reacciones antígeno-anticuerpo por los métodos de doble-difusión en gel, por la técnica de Ouchterlony y contra inmunoelectroforesis (C.I.E.F.) haciéndolo reaccionar con el suero de pacientes con bagazosis. A los sueros de los pa--cientes se les determinó por inmuno-difusión radial (I.D.R.) IgG, IgA, IgM e IgE.

IV. MATERIAL Y METODOS MATERIAL BIOLÓGICO

1. B A G A Z O

Fué obtenido del Ingenio de Zacatepec "Emilia no Zapata" en el Estado de Morelos, Méx., colectándose diversas muestras de bagazo.

2. S U E R O S

Los sueros estudiados procedían de trabajadores del Ingenio de Oacalco en el Estado de Morelos, Méx., - que tienen contacto directo con el bagazo y de dos personas que acudieron a la consulta externa del I.N.E.P. a los cuales se les diagnosticó Alveolitis Alérgica Extrínseca por bagazo. En total nueve sueros.

EXTRACCION DEL MATERIAL ANTIGENICO

Fundamento

La extracción del posible material antigénico del bagazo requirió de un proceso de desengrasado, que consiste en hacer varios lavados del material con éter hasta eliminar completamente la grasa, este proceso se verifica en 3 días cambiando el éter diariamente con un volumen de disolvente igual al peso del material por desengrasar.

Se procede a colocar el bagazo en solución ex

tractora de Coca uno a uno (peso/volumen) durante 48 horas, a temperatura ambiente.

Debido al pequeño grado de alcalinidad de esta solución se tiene la seguridad de que todo el material hidrosoluble, proteínas y polisacáridos, pasarán a la solución extractora.

Material y Equipo

Agitador magnético
Balanza
Matraces Erlenmeyer de 250 ml
Matraces Erlenmeyer de 1000 ml
Probetas de 1000 ml y de 500 ml
Embudos de 10 cm de diámetro

Reactivos

Eter dietílico
Solución de Coca (21) :

NaCl	5.0 g
NaHCO ₃	2.75 g
Fenol	4.0 g
H ₂ O destilada c.b.p.	1000 ml

La solución tiene -
un pH de 8.2

Técnica

Se emplea la técnica de extracción seguida -

por el Dr. García Procel del Departamento de Alergia del -
I.M.S.S. (21) (Técnica de Coca y Cooke).

- 1) Se pesan 10 g de la muestra de bagazo, se coloca en un matraz Erlenmeyer de 250 y adicionar 10 ml de éter sulfúrico.
- 2) Se somete a agitación magnética, cambiando el éter diariamente, durante 3 días.
- 3) Se filtra la suspensión en un embudo con teniendo cuatro capas de gasa y se pasa el bagazo desengrasado a un matraz Erlenmeyer de 250 ml.
- 4) Se adiciona 10 ml de solución de Coca y se somete a agitación magnética, durante 3 días a temperatura ambiente.
- 5) Se filtra por papel Whatman No. 1, recogiendo el filtrado.

Las muestras se procesaron por duplicado para comparar resultados.

CONTENIDO DE PROTEINAS DEL BAGAZO

Se utilizó un método para determinar nitrógeno total realizando primero la digestión de materia orgánica y con el reactivo de Nessler se hizo el desarrollo de color.

Fundamento.

La materia orgánica se oxida por medio de digestión con ácido sulfúrico,

utilizando como catalizadores: sulfato de cobre y peróxido de hidrógeno, el contenido de polipéptidos es oxidado, con la consiguiente formación de bióxido de carbono, bióxido de azufre, agua y $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$. Al enfriarse se desarrolla la - reacción de color con la adición de el reactivo de Nessler (ioduro de potasio, iodo, mercurio, almidón) al formarse en medio básico un complejo colorido cuya intensidad de color es proporcional al contenido de nitrógeno procedente de la muestra original de proteínas. Esto se puede leer en un colorímetro en rango visible. Paralelamente se construye una curva estándar con diferentes concentraciones de sulfato de amonio

Material y Equipo

Espectrofotómetro
Tubo de digestión
Matraces de 250 ml
Pipetas de 10 ml
Pipetas de 5 ml
Pipetas de 1 ml
Tubos de ensayo de 15 x 100 mm
Cubetas

Reactivos

H_2SO_4
 H_2O_2 , 20 vol
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
NaOH
Reactivo de Nessler

SOLUCION DE NESSLER

A

Se disuelven 15 g de yoduro de potasio Q.P. en 10 ml de H₂O destilada y se añaden 11.3 g de cristales de iodo; agitar hasta disolver en un frasco hermético de reactivo o un matraz, se pesan 15 g de Hg metálico puro y se vierte casi toda la solución de iodo agitando el frasco bajo agua corriente para conservar fría la solución hasta que el líquido sobrenadante ha perdido su color ámbar. Se filtra la solución en un frasco volumétrico de 100 ml; se prueba una gota de solución haciendola reaccionar con una gota de almidón o papel reactivo; si no se obtiene color azul se añade más iodo gota a gota hasta que la mezcla dé una reacción débil con el almidón; se afora a 100 ml con H₂O destilada.

B

Se disuelven 50 g de lentejas de NaOH puro en H₂O destilada y se afora a 500 ml, se mezcla 100 ml de solución A con 485 ml de B y se deja a temperatura ambiente algunos días, si se forma un precipitado, se decanta.

El líquido sobrenadante claro, se conserva en un frasco de vidrio ámbar, y esto constituye el reactivo de Nessler.

Técnica

Se colocan 5 ml del problema en un tubo de paredes gruesas, se añaden unas gotas de ácido sulfúrico - concentrado y se calienta suavemente hasta eliminar toda - el agua, se añaden 3.0 ml de ácido sulfúrico concentrado y unos cristales de sulfato de cobre y con precaución cinco gotas de peróxido de hidrógeno, 20 vls, se calienta hasta que el contenido del tubo sea transparente y ya no salgan humos blancos. Se deja enfriar a temperatura ambiente, se mide el volumen de material digerido, se toma 1 ml y se -- añaden 4 ml de agua destilada; 3 ml de hidróxido de sodio- 2N y 2 ml de reactivo de Nessler, se deja reposar 10 minutos y se mide el color con una longitud de onda de 420 nm.

Se prepara una solución de sulfato de amonio puesto previamente a peso constante: conteniendo 41.6- mg en 1000 ml de H₂O que corresponde a una concentración de 0.01 mg de nitrógeno /ml y de ésta se toman- 0.1, 0.4, 0.6, 0.8 ml y se completa el volumen a 5 ml con agua destilada y se sigue la técnica antes descrita, para- obtener la curva de calibración.

El blanco lo constituye una mezcla de 3 ml de NaOH, 2 ml de reactivo de Nessler y 5 ml de agua.

ELECTROFORESIS (27)

Fundamento

La electroforesis es el movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico. Para que éste se lleve a cabo se requieren de tres elementos: Un campo eléctrico, una partícula cargada y un medio en el cual se pueda llevar a cabo la migración, debido al movimiento cinético de los coloides, descrito por Reuss en 1809. La primer condición para que una molécula pueda migrar en un campo eléctrico es que ésta tenga cargas eléctricas. Las proteínas, debido a que presentan la característica de ser anfóteras es decir, tienen aminoácidos ácidos y aminoácidos básicos, pueden tener cargas dependiendo del pH de la solución. Si el pH es ácido hay predominio de cargas positivas y en pH alcalino hay más cargas negativas. Los pH alrededor de 8 son los adecuados para el estudio de las proteínas y los materiales de soporte para llevar a cabo la separación electrofóretica más empleados, son: el papel filtro, membranas de acetato de celulosa y geles de almidón, acrimilada o agar.

Material y Equipo

Equipo de electroforesis :
Fuente de poder, cámara y densitómetro
Matraces Erlenmeyer de 1000 ml
Aplicador de muestras
Cajas de tinción
Membranas de acetato de celulosa de 7 x 5 cm

Reactivos

Acido acético al 5%
Rojo de Ponceau al 5% en agua destilada
Metanol (grado analítico)
Solución amortiguadora de acetato veronal pH
8.8
Fuerza iónica 0.075 (obtenido de fuente comercial)

Técnica

Se colocan 5 microlitros de la muestra del extracto de bagazo en el portamuestras, se depositan por medio de un dispositivo sobre la membrana de acetato de celulosa, previamente equilibrada en solución amortiguadora durante 20 minutos. Se repite este procedimiento dos veces y se coloca la membrana de acetato de celulosa de cara hacia abajo sobre la cámara, la cual se encuentra llena con la solución amortiguadora y se establece el contacto con la membrana mediante dos tiras de papel filtro, a manera de puente. Se hace pasar una corriente eléctrica de 29V/cm durante 18 minutos, al tér-

mino se procede a colocar la membrana de acetato en colorante rojo de Ponceau durante 6 minutos, posteriormente se hacen tres lavados en ácido acético al 5%, de 2 minutos cada uno, se coloca la membrana en metanol durante 2 minutos y por último se colocan en un baño de acético-metanol (1:4) durante 5 minutos. Al finalizar este proceso, la membrana quedará lista para ser leída en el densitómetro de donde se obtiene gráficamente el resultado.

ESTUDIO INMUNOQUIMICO CON MATERIAL
EXTRAIDO

De acuerdo al plan de trabajo experimental, se procedió a probar el material extraído, contra el suero de 9 pacientes con alveolitis alérgica extrínseca (A.A.E.) por bagazo. Para lo anterior se emplearon los métodos de doble difusión de Ouchterlony (D.D.) y contraⁱⁿmuno^{electro}foresis (C.I.E.F.) (33).

Doble difusión de Ouchterlony (D.D.)

Fundamento

La reacción de precipitación antígeno-anticuerpo puede llevarse a cabo en geles o en tiras de acetato de celulosa, debido a que tanto el antígeno como el anticuerpo migran en el seno del gel siguiendo la ley de Fick (33).

En el método de Ouchterlony en gel se preparan placas en las que se hacen cortes circulares, se retira el gel de agar y los pozos así obtenidos se llenan con el Ag y el Ac como indica la figura 5. La placa se deja de 24 a 48 horas a temperatura ambiente y durante este tiempo el Ag y el Ac difunden desde el pozo en forma radial y al entrar en contacto se lleva a cabo la reacción de inmunoprecipitación formándose líneas apreciables a simple vista.

El método puede llevarse a cabo también en tiras de acetato de celulosa, pero tiene el inconveniente de que es necesario al final de la reacción lavar las tiras con solución salina isotónica para eliminar las proteínas que no reaccionaron y teñir con rojo de Ponceau haciendo -

con esto observables las líneas de precipitación.

Material y Equipo

Agitador magnético (opcional)
Balanza
Matraces Erlenmeyer de 250 ml
Matraces Erlenmeyer de 500 ml
Pipetas de 10 ml
Cajas de plástico desechables
Capilares
Horadores de 4 mm de diámetro
Nivel

Reactivos

Agarosa
Fenol
Amortiguador de dietilbarbiturato-acetato
pH 8.2 fuerza iónica 0.1:

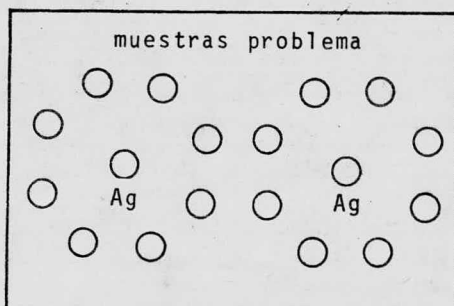
13.38 g de dietilbarbiturato de sodio
8.83 g de acetato de sodio (trihidratado)
Agua destilada c.b.p. 1 litro
Aproximadamente 180 ml de ácido clorhídrico
0.1 Mol/litro

Técnica

Se pesan 2 g de agarosa y se mezcla con 50-ml de solución amortiguadora de dietilbarbiturato-acetato, pH 8.2, fuerza iónica 0.1, y 50 ml de agua destilada se calienta hasta obtener una solución clara. Después se agrega unos cristales de fenol como conservador, con una pipeta calentada previamente se vacían 3 ml sobre una caja de plástico desechable colocada en una superficie nivelada. Después de que el agar solidifica, se colocan las cajas en el refrigerador en una cámara húmeda hasta que se usen.

Posteriormente se hacen cortes en el agar con el horador y se retiran por succión los cilindros de agar cortado, así se obtienen los pozos para colocar el antígeno frente al anticuerpo a una distancia de aproximadamente 4 mm, cuando se desean probar varias muestras simultáneamente o cuando se incluye en la reacción un testigo, la disposición de los cortes es en forma de roseta.

Fig. 5



CONTRAINMUNOELECTROFORESIS
(C.I.E.F.)

Fundamento

Este método utiliza las propiedades de inmunoprecipitación descritas anteriormente en la técnica de doble difusión de Ouchterlony, pero ésta es acelerada por la corriente eléctrica, teniendo la ventaja de que la reacción se puede llevar a cabo en dos horas a lo sumo, observándose entonces las bandas de precipitación. Además, debido a que la difusión de los reactivos es solo en un sentido y no radial como en la técnica de Ouchterlony la sensibilidad del método es mayor. Este método utiliza el efecto electroendósmotico, en el que por la diferencia en concentración iónica en la placa y el amortiguador, el agua de éste se protona y migra "arrastrando" a los anticuerpos, dirigiéndose hacia el polo negativo para entrar en contacto con el antígeno y formar así líneas de inmunoprecipitación.

Material y Equipo

Agitador magnético (opcional)

Balanza

Placas de vidrio de 7 x 5 cm.

Tiras de papel filtro Whatman No. 1 de
5 x 3 cm.

Equipo de Electroforesis :
Fuente de poder, cámara
Matraces Erlenmeyer de 250 ml
Matraces Erlenmeyer de 500 ml
Pipetas de 10 ml
Cajas de plástico desechables
Capilares
Horadores de 4 mm de diámetro
Nivel

Reactivos

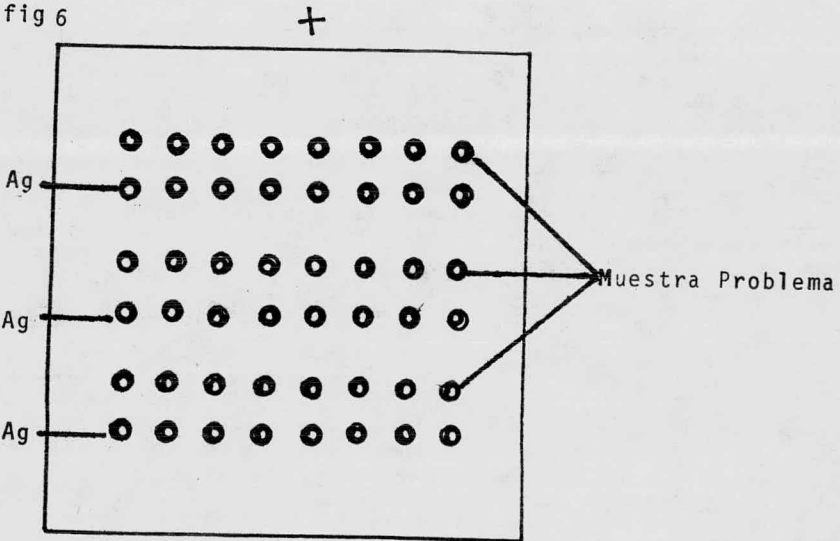
Los mismos que para DD además de :
Agarosa al 2% en agua destilada (Sellador)
Solución amortiguadora de dietilbarbiturato acetato de sodio, pH 8.2, fuerza iónica 0.1, (Este amortiguador se diluye 1:10 para la preparación del gel de agarosa (fuerza iónica 0.01), y 1:2 para las cámaras de electroforesis (fuerza iónica 0.05).

Técnica

Preparación de la agarosa: Se pesan 1.5 g de agarosa y se disuelven en 100 ml de solución amortiguadora de fuerza iónica de 0.01. Se calienta esta mezcla con el objeto de disolver la agarosa, se pasan 20 ml a cada placa colocada en una superficie perfectamente nivelada, una vez solidificado se perforan los pozos como indica la figura y se sella cada pozo con una gota de agarosa lí-

quida. Se colocan el Ag y el Ac en las posiciones indicadas, y establece el puente con unas tiras de papel (mechas), haciendo contacto con la solución amortiguadora, se aplica una corriente de 4 a 6 V. por cm. lineal 45 a 60 minutos, se eluye el material que no reaccionó con solución salina isotónica, 2 horas. Se tiñe con rojo de Ponceau 0.5%, 20 minutos; se elimina el exceso de colorante con solución de ácido acético al 15% hasta que la placa quede sin colorante y las bandas perfectamente coloreadas.

fig 6



DETERMINACION DEL CONTENIDO DE
GAMMAGLOBULINAS EN EL SUERO DE LOS PACIENTES CON -
ALVEOLITIS ALERGICA EXTRINSECA POR INMUNO DIFUSION
RADIAL (I.D.R.)

Fundamento

Las placas para inmuno-difusión radial contienen en el gel el anticuerpo específico monovalente contra una determinada proteína, en este caso anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM ó anti-IgE humanas, al combinarse este anticuerpo con su antígeno específico, se logra una reacción de inmuno precipitación en forma radial, la cual se mide cuando la reacción (Ag-Ac) llega a su punto final siendo el cuadrado del diámetro del halo formado, proporcional a la concentración del antígeno. Las placas utilizadas comunmente tienen 12 pozos (para 12 muestras) en los 3 primeros se colocan estándares de concentración conocida y en los restantes suero problema, con estos primeros 3 puntos se construye la curva de referencia en donde se podrán interpolar los resultados obtenidos en los sueros problema.

Material y Equipo

Micropipetas de 5 microlitros

Pipetas de 1.0 ml en 0.1

Frascos de 10 ml

Reglas de medición de halos

Reactivos.

Placas de inmuno difusión-radial (I.D.R.) - comerciales.

Sueros estándares.

Solución salina isotónica.

Solución de ácido tánico al 4%

Técnica.

Se destapan las placas y se comprueba que no haya agua de condensación en los pozos, en caso de que haya, se deja la caja destapada unos minutos para que se evapore esta agua. La placa de I.D.R. tiene doce pozos, en los tres primeros se colocan 5 microlitros de los estándares y en los siguientes pozos se depositan 5 microlitros de las muestras, cuando se va a determinar IgG, IgA o IgM y 40 microlitros en el caso de IgE. Posteriormente se dejan reaccionar a temperatura ambiente 50 horas para IgG e IgA, 80 horas para IgM y 3 días para IgE. Se lee el diámetro del halo de precipitación formado en milímetros (con aproximación de 0.1mm). En el caso de IgE se requiere de 1 tratamiento con ácido tánico, para esto se coloca la placa en un baño de solución salina durante 3 a 4 días, cambiando la solución frecuentemente para eliminar las proteínas que no reaccionaron, se coloca la placa en ácido tánico al 4% en H₂O destilada, se deja 1 hora y se lava con H₂O destilada 1 hora y se procede a leer.

V R E S U L T A D O S .

Los resultados obtenidos describen en la misma secuela que están propuestas las pruebas en el PLAN DE TRABAJO EXPERIMENTAL.

CONTENIDO DE PROTEINAS DEL
BAGAZO

Con la técnica de extracción empleada (Coca), se preparó un extracto crudo, proveniente del bagazo húmedo contaminado con hongos, obteniéndose :

CONTENIDO DE PROTEINAS DEL BAGAZO

0.65 mg/100 ml



CURVA ESTANDAR PARA PROTEINAS TOTALES

TUBO	ml de SOL 0.01 mg N/ml de sulfato de amonio	AGUA ml	CONC mg de N	D.O.
1	0.01	4.9	0.001	0.071
2	0.40	4.6	0.004	0.204
3	0.60	4.4	0.006	0.292
4	0.80	4.2	0.008	0.367

Fig. 7 CURVA ESTANDAR
PROTEINAS TOTALES NESSLERIZACION

D.O.

04

03

02

01

0.001

0.002

0.003

0.004

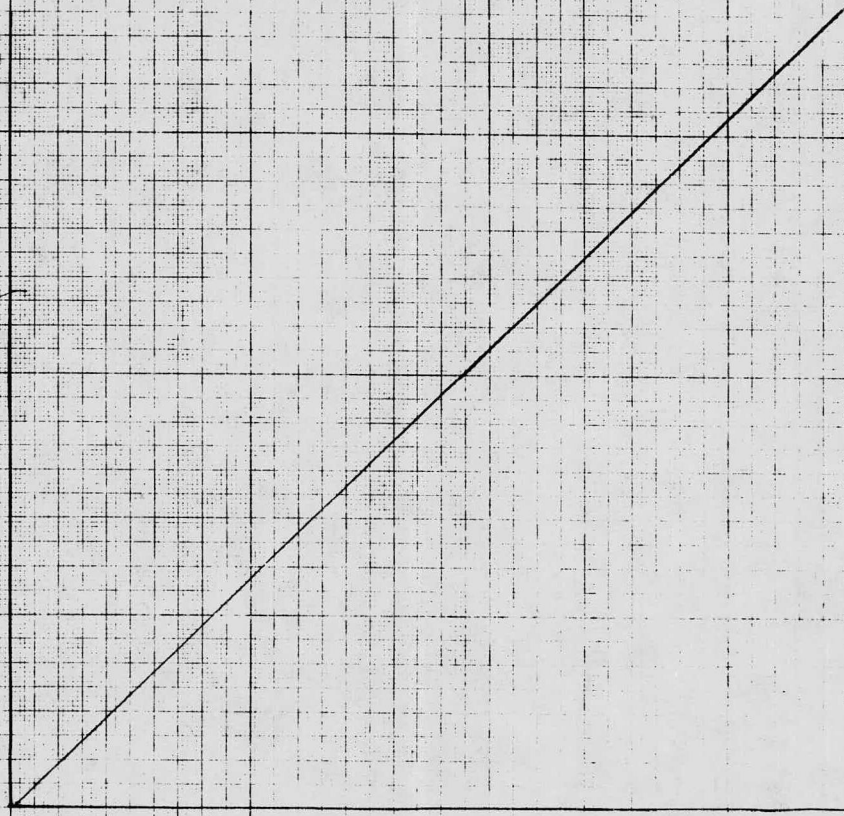
0.005

0.006

0.007

0.008

CONC



ELECTROFORESIS DEL EXTRACTO DE
BAGAZO.

El extracto de bagazo presentó una migración de grupos electropositivos en la zona de la albúmina, siendo ésta la fracción cuantitativamente mayor, además se observó en la zona posterior a las gammaglobulinas dos fracciones adicionales pequeñas; de aquí se puede concluir que el extracto contiene tres fracciones principales de proteínas, una de ellas la más abundante y dos de menor concentración.

Esto se puede apreciar en la gráfica obtenida para el corrimiento electroforético.

fig 8

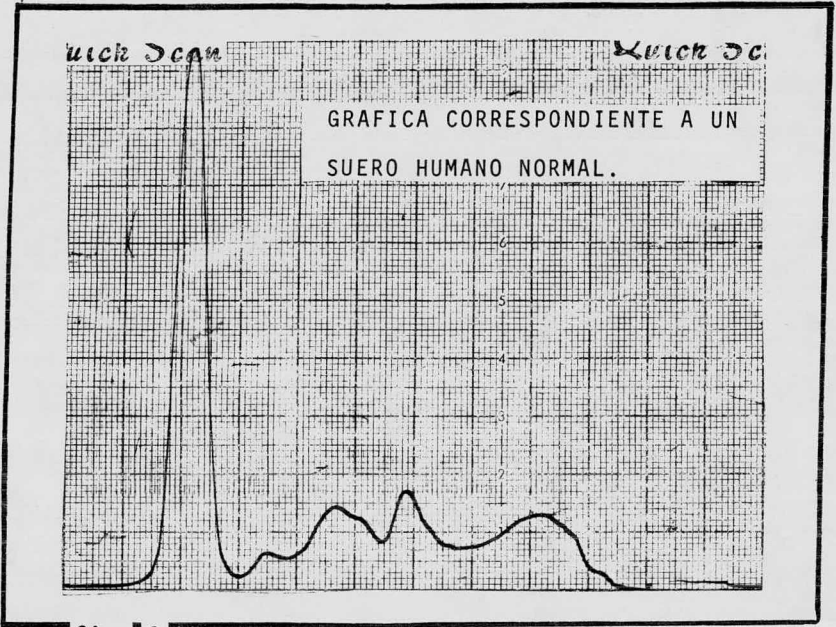
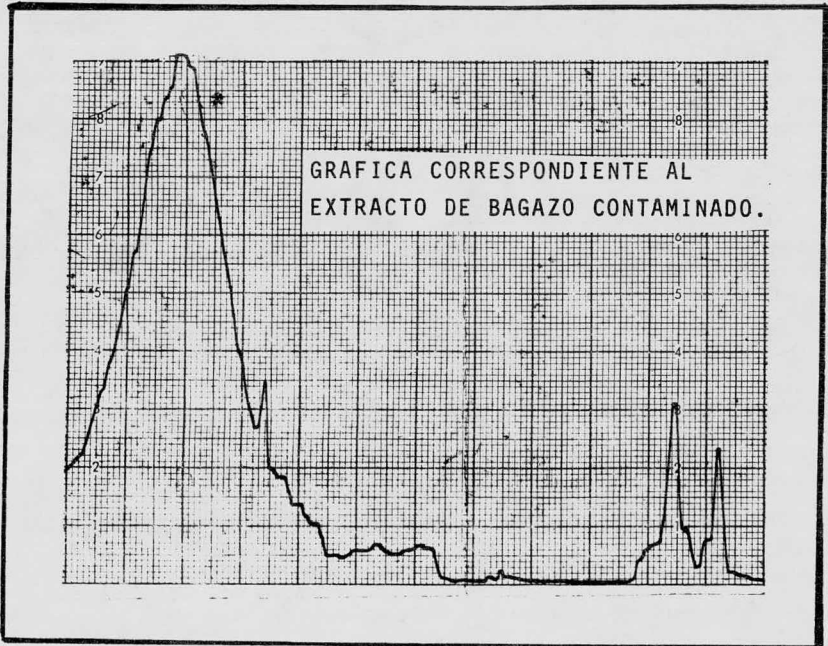


fig "9



ESTUDIO INMUNOQUIMICO DEL MATERIAL

EXTRAIDO

Doble Difusión de Ouchterlony (D.D.)

En ningún caso se encontraron bandas de pre
cipitación mediante la utilización de esta
técnica.

CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (C.I.E.F.)

Se encontraron bandas de precipitación Ag-Ac con el extracto diluído 1:100 y los resultados se enlistan.

	Paciente	Resultado (cief)	Número de bandas
1	C.R.	+	una
2	P.F.	+	una
3	M.C.	+	tres
4	J.H.	+	dos
5	S.F.	+	una
6	CONTROL	-	0
7	Q.D.	+	una
8	D.E.	+	una
9	CONTROL	-	0

INMUNO DIFUSION RADIAL (I.D.R.)

En este estudio se incluyeron los siete sueros que dieron resultado positivo por C.I.E.F. para la determinación de las inmunoglobulinas G, A, M y E, los valores están expresados en mg/100 ml.

Paciente	IgG	IgA	IgM	IgE
1 C.R.	2400	490	110	menor que 0.08
2 P.F.	1370	124	162	menor que 0.08
3 M.C.	2180	206	120	menor que 0.08
4 J.H.	1830	358	182	0.086
5 S.F.	2400	222	132	menor que 0.08
6 CONTROL	1160	238	139	menor que 0.08
7 Q.D.	1830	316	140	menor que 0.08
8 D.E.	1870	510	150	0.094
9 CONTROL	1220	122	117	menor que 0.08

D I S C U S I O N .

Contenido de proteínas del extracto de bagazo : Debido a la composición química del bagazo contaminado era de esperarse que el contenido de proteínas fuera bajo. Como la sensibilidad de la técnica de Biuret no alcanzó a medir el contenido de N_2 de proteína de extracto de bagazo se empleó la técnica de Nesslerización con digestión previa de la materia orgánica.

Electroforesis del extracto de bagazo: En el capítulo de resultados en la parte correspondiente a la electroforesis del extracto, se menciona la presencia de tres bandas principales; una en la zona de la albúmina y dos - más en la zona posterior a la de las gammaglobulinas. Esto se debe sin duda a la presencia de un grupo de sustancias con predominio de cargas negativas que migran hacia el ánodo y otros dos grupos con predominio de cargas positivas que migran hacia el cátodo. Además cabe señalar que la - fracción cuantitativamente más importante (la del corrimiento tipo albúmina), tiene una coloración ámbar durante el transcurso del proceso y antes de colorear con rojo de Ponceau.

Doble difusión de Ouchterlony: No se encontraron bandas de precipitación en la doble difusión lo que seguramente se debió a que en primer lugar la difusión en el gel es radial por lo que los reactivos antígeno y anticuerpo se difunden también hacia la zona en que no van a entrar en contacto, lo que hace que esta prueba, cuando la cantidad de anticuerpo es baja no dé reacción positiva

Contrainmunolectroforesis: Al realizar la reacción, se logra que todo el antígeno migre hacia el anticuerpo y éste hacia el antígeno, lo cual da una mayor sensibilidad al método.

Inmunodifusión radial de los sueros de los trabajadores: Se cuantificaron las inmunoglobulinas: G, A, - - M y E y los resultados se enlistan pero no pueden compararse con los valores normales, puesto que éstos no son conocidos - para la población estudiada y solamente servirían si se les - compara con los dos controles para darnos una idea muy aproximada y carente de valor significativo estadísticamente de las variaciones registradas.

VI RESUMEN .

Se obtuvieron siete sueros de trabajadores del ingenio azucarero de Oacalco Morelos, Méx. y muestras de bagazo húmedo contaminado del ingenio de Zacatepec Morelos, Méx. El bagazo se sometió al método de extracción de Coca, obteniéndose un extracto fenólico. El bagazo se encontraba húmedo y contaminado con hongos probablemente de los géneros *Aspergillus* y *Teramoactinomices* (41). Los trabajadores de los ingenios, frecuentemente se incapacitan a temprana edad para cualquier tipo de trabajo físico debido a que desarrollan una enfermedad llamada alveolítis alérgica extrínseca la cual les reduce su capacidad pulmonar. Se estudiaron los sueros de los siete trabajadores mencionados por el método de contraímmunoelectroforesis se obtuvieron bandas de precipitación antígeno-anticuerpo lo cual demuestra que estos individuos han desarrollado sensibilidad frente al bagazo contaminado con hongos. Será importante conocer el mecanismo de la enfermedad para poder implantar una terapia adecuada. Así también será interesante conocer el tipo de reacción de hipersensibilidad que se lleva a cabo; I, II, III o IV y cuales fracciones antigénicas son las responsables de estas reacciones.

VII CONCLUSIONES

1.- El hecho de haber trabajado experimentalmente con sólo nueve muestras séricas, resta a este trabajo significación estadística. Sin embargo, puede servir como base a nivel de estudio piloto para encuestas epidemiológicas con significación.

2.- El hallazgo más importante en este trabajo de tesis fué haber demostrado que los pacientes con Alveolítis Alérgica Extrínseca presentan anticuerpos circulantes frente al extracto de bagazo de caña contaminado con mohos.

3.- Se demostró también que el método de contrainmunolectroforesis (C.I.E.F.) tiene la sensibilidad adecuada para la investigación de estos anticuerpos.

4.- Es necesario continuar con estos estudios para conocer más a fondo los aspectos de los mecanismos de la enfermedad, sobre todo esclarecer que tipo de hipersensibilidad se desarrolla durante la enfermedad. También sería interesante conocer si hay una elevación de IgE significativa, lo que apoyaría la posibilidad de que la enfermedad estuviera mediada por una hipersensibilidad de tipo I. Por último cabría hacer pruebas cutáneas con el extracto fenólico de bagazo así como medir algunos parámetros de la respuesta inmune celular (R.I.C.) para examinar la posibilidad de la hipersensibilidad tipo IV. Por el lado del bagazo, sería interesante distinguir los grupos químicos determinantes antigénicos y saber si como lo ha propuesto Jiménez (51) existe una base proteica de soporte a sacáridos de repetición. Así como identificar los hongos presentes y sus fracciones antigénicas.

VIII B I B L I O G R A F I A

- 1.- Alexopoulos, C.J. 1962. Introductory - Mycology. 2°Ed. Wiley & Sons pbs. New York
- 2.- Amos, W. 1970. The extraction of fungal antigens and their use in serological tests, as an aid to the diagnosis of bronchial disorders. J. Med. Lab. Tech: 1: 27.
- 3.- Baer E.,H. Brodhage, L.P. Garrard, R. - Geigy, O.G. Sell, H.R. Seeliger. 1970. Documenta Geigy, Enfermedades infecciosas y sus agentes patógenos. J.R. Geigy Ed. Basilea Suiza
- 4.- Schwich, G. y K. Storiko. 1964. Hojas de Laboratorio. Behringwerke A.G.
- 5.- Boyd, W.C. 1943. Fundamentos de Inmunología. 3°Ed. Edit. Universitaria. Buenos Aires
- 6.- Bradford, J.K.,J.B. Blaloch and C.M. Wascom. 1961. Bagasse disease of the lungs. Early histopathologic - changes demonstrated by lung biopsy. Am. Rev. Resp. Dis. : 84: 582.
- 7.- Brewer, D.B.,D. Heath, P. Asquith. 1969. Electromicroscopy of desquamative interstitial pneumonia. J. Path. : 97 : 1069
- 8.- Buechner, H.A., A.L. Prevatt, J. Thompson 1950. Bagassosis: a review with further historical data, studies of pulmonary function and results of adrenal - steroid therapy. Am. J. Med. : 25 : 234.

9.- Buechner, H.A., E. Aucoin, E. Vignes, A.J. Weill. 1954. The resurgence of bagassosis in Louisiana. J. of Occup. Med. : 6 : 437.

10.- Buechner, H.A. 1960. Bagassosis a medical enigma. J. Louss. Med. Soc. : 58 : 112.

11.- Buechner, H.A. 1960. Bagassosis peculiarities of its geographic pattern and report of the first case from Perú and Puerto Rico. J. of Am. Med. : 174 : 1237.

12.- Buechner, H.A. 1962. Bagassosis a true pneumoconiosis. Ind. Med. Surg. : 31 : 311.

13.- Buechner, H.A., R.H. Runde. 1963. Bagassosis reported for first time in laboratory workers. J. of Indian Med. Prof. : 10 : 4664.

14.- Cochrane, V.W. 1958. Physiology of fungi. 1a. Ed. Wiley toppan. USA, Japan

15.- Corbaz, P.H., G. Manreen, E. Lacey. 1963. Thermophilic and mesophilic Actinomycetes in mouldy hay. Rothamsted Exp. Station. J. of Gen. Microb. : 32 : 449.

16.- Davies, B., A. Dullbeco. 1972. Tratado de Microbiología. Salvat Ed. 3^o Ed.

17.- Dutton, R.W. and R.I. Mishell. 1967. Cell population and cell proliferation in the vitro response of normal mouse spleen to heterologous erythrocytes. J. of Exp. Med. : 126 : 443.

18.- Dutton, R.W. and R.I. Mishell. 1967. Cell Populations and cell proliferation in the in vitro response of normal mouse spleen to Heterologous erythrocytes analysis by the hot Pulse technique J. of exp med 126:443.

19.- Enciclopedia Salvat. 1972. Salvat Ed. 1, 2. España

20.- Estanislawky E.M. 1976. Fibrosis intersticial difusa del pulmón Neum. y Cir. del Tórax. : 1 : 37.

21.- García-Procel, G. 1974. Preparación de extractos alérgicos. Depto. de Inm. Clin. Comunicación Personal

22.- Hargreave, F.E., J. Pepys and H. Heldford and V. Stevens. 1966. Birds breeder's (fancier's) lung. Lancet. : 1 : 445.

23.- Jerne, N.K., A. Norain, 1963. The agar plaque technique for recognizing antibody producing cells, in cell bound antibody. Wistar Ed. Institute Press. USA.

24.- Jones, B. 1970. Experimental pathology relating to farmer's lung tubercle. Am. J. Of Resp. Dis: 51 : 217.

25.- Lacey, J. 1971. Thermoactinomyces sachari spnov, a Thermophilic Actinomycete causing bagassosis. Rothamsted Exp. Station. J. of Gen. Microbiology. : 66 : 327.

26.- Lamoyi, E. 1975. Trypanosoma cruzi. Protección contra la infección experimental en ratones por medio de inmunización con BCG. Tesis profesional. Facultad de Química. UNAM

27.- Lehninger A. 1972. Biochemistry. The molecular basis of cell structure and function. The John Hopkins Univ. Worth pbs. Inc. USA.

28.- Lynch, R., S. Mellor, S. Spore. 1972. Métodos de laboratorio. Ed. Interamericana. México

29.- McCombs, M.D. 1972. Diseases due to immunology reactions in the lungs 1 : The New England. J. of Med. : 286 : 23.

30.- McCombe, R. 1972. Diseases due to immunology reactions in the lungs. II The New England J. of Med. : 286: 1186.

31.- Mishell, R.I. and R.W., Dutton. 1967. Immunization of dissociated spleen cell cultures from normal mice. J. exp. Med.: 126 : 423.

32.- Morales, M.V. y E. Stanislamsky, B.B. Muñoz y cols. 1974. Revisión de dos casos de enfermedad pulmonar de A.A.E. de los cuidadores de palomas. Neumología y cirugía de torax 35:133.

33.- Ouchterlony, O. 1968. Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Arbor Science Publishers Inc.

34.- Pepys, J. 1967. Hipersensivity to inhaled organic antigens. J. Roy, coll Physc. : 2 : 42.

35.- Pepys, J., M. Turner, P. Dawson and col. 1968. Arthus (type III) skin test reaction in man (clinical and immunology features). Excerpta Med. Int. Cong. Series. : 16 : 221. Rose Ed. Amst.

36.- Pepys, J., R.W. Riddel, K.M. Citron, Y.M. Clayton. 1962. Precipitins against extracts of hay and moulds in the serum of patients with farmer's lung, Aspergillosis, Asthma and Sarcoidosis. Thorax. : 17 : 366.

37.- Pepys, J. 1969. Hypersensitivity diseases of the lungs due to fungi and organic dust basel karger. Am. Review of Rsp. Diseases. : 69 : 1.

(bis)37.- Pepys, J., B.J. Hutch. 1975. Bronchial provocation test in ethiologic diagnosis and analysis of asma. Am. Rev. of Resp. Dis. : 112 : 829.

38.- Reynolds, R., V. Stembridge. 1965. Electron Microscopy of bagassosis in human, presented before the annual meeting of american thoracic. Soc. Chicago USA

39.- Roitt, I. 1973. Essential Immunology, Blackwell Scient pbs. Ed.

40.- Salvaggio, J. 1966, Bagassosis demonstration of precipitins, against extracts of thermophilic Actinomycete in patients, Annuals of int. Med. : 64 : 748.

41.- Salvaggio, J. 1969, Bagassosis demonstration of precipitins against extracts of thermophilic Actinomycetes in patients with bagassosis, Am. J. of Med. : 46 : 538.

42.- Salvaggio, J. 1970, Neumonitis for hipersensitivity, New Eng. J. of Med. : 16 : 283.

43.- Salvin, S. 1963, Immunology of the mycosis, Aller. : 7 : 213.

44.- Shaffer, P. M. Somogy, 1933 Copper, Iodometric reagents for sugar determination, J. of Biol. Chem. 100 : 695

45.- Stenfert, K.N.V. 1969, Handbook of immunodiffusion, British Cim and Iliv and Boyd & Char and Thom Eds. England,USA

46.- Turner, W,M. Warwick. D. Soniach. 1965 Auto-antibodies studies in interstitial pulmonary fibrosis, British Med. J. : 1 : 880.

47.- Tietz, N. 1962 Química Clínica Moderna, 1a. Ed. Interamer. México

48.- Underkofler, L.A. 1943. Semimicromethods for the determination of reducing sugars in fermentation media, IOWA state coll J. Scs 17 : 251

49.- Vázquez, 1931, Producción de azúcar en Cuba Ed. Habana Cuba .

50.- Estrada-Parra S.1977, curso tomado en el I.P.N. en inmunología. Escuela de Ciencias Biológicas comunicación personal.

51.- Jiménez Luis 1977. Comunicación personal.

52.- Escobar G. A. • Comunicación personal.