



11261
1973

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES

SINTESIS DE ANTICUERPOS EN LA REACCION
INFLAMATORIA AL CISTICERCO DE LA
Taenia solium EN MUSCULO PORCINO

TESIS DE MAESTRIA
EN CIENCIAS BIOMEDICAS:
INMUNOLOGIA
SYLVIA PAZ DIAZ CAMACHO

MEXICO, D. F.

FALLA DE ORIGEN

1983



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.

CONTENIDO

	Pag.
Lista de Abreviaturas	1
Resumen y Conclusiones	2
Introducción	4
Antecedentes	12
Objetivo	20
Material y Métodos	21
Resultados	41
Discusión	56
Bibliografía	62

LISTA DE ABREVIATURAS

- As..... extracto antigénico crudo de Ascaris suum
- BSA..... albúmina sérica bovina
- CKS..... fracción de antígeno de cisticercos enteros
- CM..... medio de cultivo incubado sin cápsulas
- Ct..... extracto antigénico crudo de Cysticercus tenui-
collis
- DEAE.... dietilaminoetil
- DID..... doble inmunodifusión
- DMSO.... dimetil sulfóxido
- E..... fracción de antígeno de escólex
- FITC.... isotiocianato de fluoresceína
- IEF..... inmunoelectroferesis
- L..... fracción de antígeno de fluido vesicular
- Og..... extracto antigénico crudo de O. gutturosa
- P..... fracción de antígeno de pared
- SP..... medio de cultivo incubado con cápsulas
- SSA..... solución salina amortiguada
- SSBH.... solución salina balanceada de Hanks
- Tc..... extracto antigénico crudo de Trypanosoma
cruzi

RESUMEN Y CONCLUSIONES

El cisticerco de Taenia solium induce una reacción inflamatoria granulomatosa en sus huéspedes intermediarios (hombre y cerdo) reacción en la cual frecuentemente se observan - abundantes células plasmáticas. El papel que las células - plasmáticas desempeñan en esta compleja reacción tisular ha sido poco estudiado.

Mediante la técnica de inmunofluorescencia directa usando antígenos fluoresceinados del parásito, se encontró que en el granuloma que rodea al cisticerco en músculo de cerdo, había células morfológicamente similares a células plasmáticas, que fijaban específicamente a estos antígenos. Adicionalmente se investigó la síntesis de novo de inmunoglobulinas dentro de la reacción granulomatosa, cultivando in vitro las cápsulas inflamatorias. Se encontró que dentro del granuloma se sintetizan anticuerpos dirigidos contra - antígenos presentes en extractos crudos de pared, escólex y fluido vesicular del cisticerco, así como contra el antígeno B purificado del mismo parásito.

Se demostró además que las células plasmáticas del granuloma sintetizan al menos tres clases de inmunoglobulinas por cinas: IgG, IgM e IgA.

Usando la técnica de inmunofluorescencia indirecta fue detectado el factor C3 del complemento en las fibras del tejido conectivo de la reacción inflamatoria, en algunas zonas de la superficie del tegumento parasitario y ocasionalmente en células mononucleares similares a macrófagos.

Se concluye: 1) que en la reacción granulomatosa que rodea al cisticerco de T. solium en músculo esquelético de cerdo se lleva a cabo una síntesis activa de anticuerpos dirigidos contra el parásito; y 2) que el factor C3 de complemento de cerdo está presente en esa reacción y que posiblemente hay células que lo sintetizan localmente.

INTRODUCCION

I.- GENERALIDADES.

A) Taxonomía del cisticerco de Taenia solium

Reino: Animalia

Subreino: Metazoa

Phylum: Platyhelminthes

Clase: Cestoda

Orden: Cyclophyllidea

Superfamilia: Taenoidea

Familia: Taenidae

Género: Taenia

Especie: Solium

Etapa larvaria: Cysticercus cellulosae

B) Historia

El cisticerco de la Taenia solium (algunas veces referido como Cysticercus cellulosae) es conocida desde los tiempos de Moisés. Aristóteles y Aristófanes en el siglo V A.C., lo descubrieron en la lengua del cerdo y lo describieron como semejante al granizo. Paracelso encontró cisticercos en cerebros de pacientes epilépticos en la primera mitad del siglo VI, en estudios de autopsias. Gessner y Rumbler en 1558 -

comunicaron la presencia de cisticercos en el hombre y en 1818, Fisher y Redon le dieron el nombre de - Cysticercus cellulosae por su localización preferente en tejido conjuntivo de humanos y cerdos.

Kuchenmeister (1855) y Leuckart (1856), investigaron el ciclo biológico de Taenia solium y descubrieron - que el cisticerco observado en los tejidos del cerdo, era el estadio larvario infectante para el hombre. Kuchenmeister encontró un parásito adulto en el intestino de un reo condenado a muerte a quien había alimentado con carne de cerdo cisticercoso, citado en 1 y 2.

En 1840, Verco extrajo por vez primera un cisticerco intracraneal. Posteriormente varios autores, Askanary (1850), Marwald (1895), Wallenberg (1904), describieron la sintomatología y las lesiones originadas por la presencia de el cisticerco de Taenia solium en - cerebro y Bruns (1906) considera esta sintomatología como diagnóstica de la Cisticercosis del cuarto ventrículo, citado en 3 y 4.

C) Morfología y Ciclo Biológico

La Taenia solium adulta vive adherido a la pared del -

intestino delgado del hombre, siendo su único huésped definitivo. Mide de 2 a 7 m y consta de: a) un escólex, cuadrangular de 1 mm de diámetro, con 4 ventosas de 0.5 mm de diámetro y un rostelo armado con una doble corona de ganchos grandes y pequeños que miden - 160 a 180 y 110 a 140 μ m de longitud respectivamente; b) el cuello es corto, sin segmentaciones y de la mitad del grosor del escólex; c) el estróbilo que consta de una serie de segmentos fusionados llamados proglótidos. Los proglótidos más cercanos al cuello (in maduros) son más anchos que largos y presentan rudimentos de los órganos genitales en desarrollo. Hacia la parte media del estróbilo se encuentran los proglótidos maduros que son casi cuadrados y que contienen los testículos y un ovario trilobulado.

Al final del estróbilo se encuentran los proglótidos - grávidos que son más largos que anchos y cuyo parénquima está ocupado principalmente por un saco uterino central que presenta de 7 a 13 ramificaciones laterales - repletas de huevecillos. Estos huevecillos escapan - del útero a través del poro genital antes o después - que los proglótidos grávidos sean liberados. Adicionalmente pueden liberarse al desintegrarse los proglótidos en heces fecales.

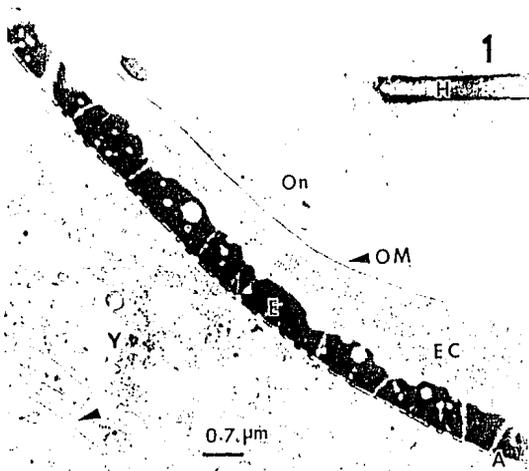
Los huevecillos son esféricos, miden de 31 a 45 μ m de

diámetro y de acuerdo a Laclette y Cols (1982) presentan una capa externa o vitelo, un embrióforo denso y estriado con una membrana interna. Al centro se encuentra una oncosfera o embrión hexacanto con 3 pares de ganchos (5), (Fig. 1A). Cuando el hombre o el cerdo ingieren huevecillos, al llegar al duodeno o yeyuno se desintegra su cubierta liberándose las oncosferas. Estas, ayudadas por sus ganchos y por secreciones lípticas, atraviesan la pared intestinal, hasta llegar a vénulas mesentéricas a través de las cuales son transportadas a todo el cuerpo, pudiéndose instalar en tejido muscular esquelético, subcutáneo, ojo y sistema nervioso central.

El gusano vesicular requiere para su completo desarrollo de un lapso de 60 a 70 días, e induce en el huésped una reacción inflamatoria granulomatosa que ha sido poco estudiada.

El cisticerco de la Taenia solium puede ser redondo u ovoide y mide de 3 a 18 mm de diámetro. Su color es blanco lechoso, está constituido por una bolsa llena de líquido. En algún punto la membrana de la bolsa se pliega hacia adentro dando origen a un canal en espiral que en el extremo tiene un escólex con 4 ventosas y una doble corona de ganchos. Estas

Fig. 1.- A) Micrografía electrónica de transmisión de un huevo inmaduro de T. solium. La cápsula se indica con una flecha. Y, vitelo; E, embrióforo; EC, célula del embrióforo; OM, membrana oncosferal; On, oncosfera; H, gancho. Cortesía del Dr. J.P. Laclette (5). B) Micrografía electrónica de barrido de un cisticerco evaginado de T. solium. V, ventosa; G, gancho. Aumento 110x. Cortesía del Dr. J.P. Laclette.



características se observan con facilidad al microscopio óptico comprimiendo el parásito entre 2 portaobjetos (6,7), (Fig. 1B).

D) Frecuencia

La cisticercosis tanto humana como porcina es muy frecuente en países en desarrollo como México, Filipinas, países de Centro y Sudamérica, India, Nueva Guinea y otros (8-12).

Desde el punto de vista veterinario, causa graves pérdidas económicas y un déficit en la producción de carne ya que una gran cantidad de cerdos sacrificados son decomisados por haber padecido la enfermedad. En nuestro país, Mazotti (1954) encontró que la frecuencia de la cisticercosis en cerdos de diferentes localidades de la República era de 4.6% (13). Hernández y cols. en un estudio realizado en San Luis Potosí, encontraron que de 6,615 cerdos examinados macroscópicamente, el 4.3% presentaba cisticercosis. Este porcentaje aumentó al 24.9% al estudiar los sueros mediante fijación del complemento y aunque esta prueba no es muy sensible indica que a la inspec

ción ocular se escapa un gran número de cerdos infectados (14). En el estado de Sonora, en un período de siete y medio años (agosto de 1967 a diciembre de 1974) de 289,737 cerdos sacrificados e inspeccionados macroscopicamente el 0.54% resultó infectado, representando una pérdida económica de \$1'300,000.00 (15). En el rastro municipal de Ecatepec, Estado de México, se analizaron por inmunolectroforesis 3,000 sueros de cerdos, obteniéndose una positividad de 38.6%; sin embargo, por inspección sanitaria, únicamente el 0.3% de estos cerdos fueron decomisados (16). Existen en la literatura muchos más estudios que nos hablan de la frecuencia de la cisticercosis porcina en nuestro país (17-21) y los resultados varían dependiendo de las zonas estudiadas y del método empleado para detectar la parasitosis. Estudios realizados por Acevedo (22) indican que las pérdidas por cisticercosis porcina en 1980 ascendieron a \$998,142,070.00

La cisticercosis humana en México es una enfermedad importante por su alta prevalencia y por la severidad de sus manifestaciones clínicas, principalmente cuando la larva se localiza en el sistema nervioso central, causando serios cuadros neurológicos, invalidez

y muy a menudo la muerte (23-25). Además, es uno de los padecimientos más costosos desde el punto de vista terapéutico y es frecuentemente un problema de diagnóstico para el médico.

Se desconoce la frecuencia real de la cisticercosis humana por varios motivos, entre los que se pueden mencionar: a) la variable localización del parásito, por lo que el diagnóstico parasitoscópico únicamente se realiza mediante intervención quirúrgica; b) no existe todavía un método de diagnóstico inmunológico con un 100% de eficiencia; c) cuando el parásito se localiza en ciertos tejidos como muscular o subcutáneo la infección puede cursar en forma asintomática. Sin embargo, existen numerosos reportes que dan idea de la frecuencia de este padecimiento en nuestro medio. Robles en 1940 (26), de 100 operaciones realizadas en pacientes con presunto tumor cerebral, encontró cisticercosis en el 25% de los casos. Costero (27), en 1946 informó que la cisticercosis era causa de muerte en 3.6% de autopsias realizadas en el Hospital General de México. En 1961, Briceño y cols. (28) reportaron cifras semejantes al estudiar 97 autopsias, de las cuales el 3.5% presentaban a el

cisticercos de Taenia solium. Macías y Maqueo (29) en 1958 informaron que de 884 autopsias realizadas en el Hospital de Nutrición, 2.8% presentaba cisticercosis.

Para terminar, los datos recopilados por Flisser (30) de autopsias en adultos en distintos centros -- hospitalarios de México, desde 1901 hasta 1976 muestran frecuencias que oscilan entre 0.57% (Hospital Civil de Guadalajara, Jal.) hasta 3.6% (Hospital General, SSA México, D.F.).

Se han realizado también estudios seroepidemiológicos, utilizando diversas pruebas inmunológicas y todas - ellas muestran frecuencias variables (31-33); sin embargo, los estudios de Flisser y cols. señalan que cuando menos el 1% de la población mexicana ha tenido contacto con este parásito (34).

II. ANTECEDENTES.

Desde hace mucho tiempo las reacciones inflamatorias granulomatosas, se han considerado como reacciones - tisulares complejas. Algunos autores (36-38) piensan

que la hipersensibilidad del huésped desempeña un papel central en la formación del granuloma y los clasifican en inmunológicos y no inmunológicos o de cuerpo extraño. El tipo de organización de las células mononucleares fagocíticas que aparecen en el infiltrado, permiten distinguir a la inflamación granulomatosa de la reacción inflamatoria crónica simple (39,40). Asimismo, en la literatura se encuentran un sinnúmero de definiciones para describir una reacción granulomatosa (41-43). Sin embargo, tratando de establecer una definición amplia se encuentra que la mayoría de los autores coinciden en lo siguiente: un granuloma es una respuesta inflamatoria crónica, local inducida por sustancias poco solubles y que se caracteriza por acumulación de células mononucleares fagocíticas maduras, altamente organizadas, pudiendo o no observarse otros tipos celulares como linfocitos o células plasmáticas.

El cisticerco de la Taenia solium en el hombre y en el cerdo induce una reacción inflamatoria crónica local, que puede ser considerada como un granuloma inmunológico por el tipo de células que presenta (44). Sin embargo, no existen datos contundentes que demuestren que el granuloma siguió a una hipersensibili

dad del huésped. Se ha sugerido que la reacción inflamatoria sucede a una hipersensibilidad del huésped debida a la liberación de fluido vesicular (45).

Adicionalmente el extracto antigénico inoculado intraperitonealmente en cobayos atrae linfocitos "T" identificados indirectamente por la producción de linfocinas (46).

Willms y Merchant (44) han descrito la reacción inflamatoria que rodea al cisticerco de la Taenia solium localizado en músculo esquelético de cerdo encontrando que existen diversos tipos celulares: macrófagos - células epitelioideas, células gigantes; eosinófilos - y neutrófilos; linfocitos y células plasmáticas; estas últimas localizadas algunas veces cerca del parásito y otras alejadas. Durante el desarrollo del presente proyecto, se ha observado que este infiltrado no es constante en cuanto a número y tipo celulares. Algunos granulomas contienen un gran número de células plasmáticas y otros poca cantidad de ellas. Esta variabilidad no es tan sorprendente si se considera que el granuloma probablemente es un fenómeno dinámico - sometido a múltiples factores moduladores, entre ellos, la naturaleza del antígeno que lo produce, factores -

inmunes del huésped, interacciones célula-célula tra-
ducidas en emisión y recepción de señales facilitado-
ras o inhibitorias y aún factores locales proporcio-
nados por el tejido en el cual se desarrolla.

Los cambios en la dinámica y funcionalidad de las -
células participantes en el granuloma, pueden ser
decisivos para definir su evolución.

El granuloma generado por el cisticerco de la Taenia
solium ha sido poco estudiado porque no se cuenta con
un modelo experimental. Sin embargo, estudios realiza-
dos en granulomas experimentales por S. mansoni (47),
S. japonicum (48), BCG (49), H. capsulatum (50) y -
otros (51,52) han aportado valiosa información al res-
pecto. En general, en granulomas inducidos por hueve-
cillos de S. mansoni (cuya formación precede a reac-
ciones de hipersensibilidad tardía), se ha observado
que las células que predominan en etapas iniciales -
son células mononucleares principalmente Linfocitos.
Casi simultáneamente aparecen mononucleares grandes,
incluyendo macrófagos, células epitelioides y fibro-
blastos (estos últimos iniciando la producción de -
colágena). El número de mononucleares grandes perma-

nece constante por largo tiempo, pero los linfocitos tienden a disminuir al mismo tiempo que se observa un aumento en el número de eosinófilos. Tiempo después, los eosinófilos disminuyen, quizá como resultado de la disminución de ESP (Eosinophil Stimulated Promoter), ECF-P (Eosinophil Chemotactic Factor-Precursor) o bien por inhibición de anticuerpos circulantes (53-56). Inmunoblastos, células plasmáticas, células gigantes y neutrófilos aparecen generalmente en etapas medias o finales de la formación del granuloma. Examinando suspensiones celulares obtenidas de granulomas disgregados, se observa que en el período de máxima respuesta granulomatosa predominan los linfocitos "T", mientras que en la etapa crónica se encuentran linfocitos "T" y "B" en igual número (57). Presumiblemente los linfocitos "B" sirven como precursores de células plasmáticas localizadas en el infiltrado (58). Se ha demostrado que la previa sensibilización del huésped acelera la formación del granuloma (53) y la aparición de anticuerpos circulantes propicia cambios en los tipos celulares (47).

Las células plasmáticas objeto del presente estudio, se han identificado también en cortes histológicos -

de granulomas humanos inducidos por el cisticerco de la Taenia solium localizado en tejido muscular esquelético (2), subcutáneo (59), sistema nervioso central (60) y aún en fluido cerebro espinal de pacientes cisticercosos (61). Sin embargo, existe poca información acerca del papel que desempeñan en esta compleja reacción tisular. La síntesis de inmunoglobulinas y de anticuerpo por células plasmáticas de granulomas mantenidos in vitro ha sido estudiada en M. leprae (62), S. mansoni (63), S. japonicum (64). En biopsias de reacciones granulomatosas inducidas por M. leprae se ha demostrado que se sintetizan anticuerpos antibacilo principalmente de la clase IgG (65). En los granulomas a S. mansoni y S. japonicum se sintetizan anticuerpos específicos contra el parásito además de otras inmunoglobulinas (63,64).

En el cisticerco de Taenia solium de cerdo, se ha demostrado (66) que el extracto antigénico del parásito tiene un efecto mitogénico sobre linfocitos "B" de ratón. Esto pudiera explicar en parte la presencia de células plasmáticas cerca del parásito. Su función, teóricamente, debería ser, sintetizar anticuerpos en contra del cisticerco, y en unión con factores ---

inmunes allí presentes, resolver la parasitosis. Sin embargo, se ha observado que el gusano vesicular sobrevive y se desarrolla por largo tiempo sin sufrir daño aparente en huéspedes inmunológicamente competentes (67). Esto significa que el parásito evade la respuesta inmune, quizás utilizando algún(os) mecanismo(s) de resistencia propuestos para céstodos (68). Se ha evidenciado por técnicas inmunoenzimáticas y de microscopía electrónica que las microvellosidades que cubren la pared larvaria y que están en contacto más íntimo con la reacción inflamatoria del huésped, fijan en su superficie una proteína antigénicamente similar a la IgG de cerdo (69). Asimismo, se ha reportado la presencia de proteínas del huésped en otras larvas de céstodos: Taenia crassiceps, T. taeniaeformis (70), E. granulosus (71) y en el tremátodo S. mansoni (72). Hasta el momento no se ha podido discernir si estas proteínas son sintetizadas por el parásito o si éste las toma del huésped. Aunque en el caso de S. mansoni se ha demostrado que varios antígenos son tomados del huésped (73).

Por otra parte, existe una gran cantidad de reportes que indican que humanos cisticercosos y cerdos masi-

vamente infectados no presentan en circulación anticuerpos detectables por diversas pruebas inmunológicas: inmunolectroforesis (74), contraínmunolectroforesis (75), doble inmunodifusión (76), fijación de complemento (77), hemaglutinación indirecta (78), inmunofluorescencia (79). Como hipótesis de trabajo, en el presente estudio se postula que la síntesis de anticuerpos dirigidos en contra del parásito, se lleva a cabo a nivel local por células plasmáticas presentes en el granuloma que rodea al cisticerco. Con esta hipótesis no se excluye que la ausencia de anticuerpos circulantes puede deberse a muchos otros factores como son: tolerancia inmunológica, síntesis de anticuerpos bloqueadores, bloqueo de anticuerpos circulantes por exceso de antígeno, etc.

Al intentar aclarar un poco el papel que desempeñan las células plasmáticas localizadas en la respuesta inflamatoria que rodea al cisticerco de la Taenia solium en el cerdo, hemos tratado de contestar las siguientes preguntas: ¿existe una síntesis local de inmunoglobulinas?, si la hay, ¿éstos son anticuerpos dirigidos contra el parásito? ¿qué clase de inmunoglobulinas son sintetizadas? ¿los anticuerpos sintetizados fijan complemento?.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue: demostrar o descartar que las células plasmáticas localizadas en la reacción inflamatoria que rodea al cisticerco de Taenia solium en músculo esquelético de cerdo sintetizan anticuerpos específicos - contra el parásito.

MATERIAL Y METODOS

Cisticercos con y sin cápsula inflamatoria fueron obtenidos de carne de cerdos cisticercosos de 6 a 8 meses de edad. La edad de los cisticercos aparentemente variaba de un cerdo a otro por observación del tamaño del parásito e infiltrado que lo rodeaba. Para obtención de las fracciones de antígenos, los cisticercos sin cápsula inflamatoria fueron obtenidos de carne de 3 cerdos cisticercosos. Para las pruebas de detección de IgG porcina se obtuvieron 28 cisticercos con cápsula inflamatoria de 7 cerdos parasitados (4 cisticercos de cada cerdo). Para las pruebas de detección de anticuerpos anti-cisticerco se obtuvieron 48 cisticercos con cápsula inflamatoria de 6 cerdos parasitados (8 cisticercos de cada cerdo). Finalmente, para las pruebas de detección del factor C3 del complemento se obtuvieron 15 cisticercos de 5 cerdos infectados (3 cisticercos de cada cerdo). Las cápsulas inflamatorias se obtuvieron disecando cisticercos con cápsula inflamatoria separando después la larva; se usaron 8 cerdos parasitados y cada experimento se realizaba con cápsulas obtenidas de cisticercos de un solo cerdo. El isotiocianato de fluoresceína (FITC), los aminoácidos puros y la albúmina sérica bovina (BSA) fueron obtenidos de Sigma; el Tissue Teck de American Optical; la Metionina-S³⁵ (actividad específica = 1363.8 Ci/m mole) se obtuvo de New England Nuclear; -

los estándares de proteínas de bajo peso molecular se obtuvieron de Bio-Rad. La IgG de conejo anti C3 de cerdo se obtuvo de Cappel Laboratories y la IgG de cabra anti-IgG de conejo - fluoresceinada fue obtenida de Behring Werke. Todos los demás reactivos químicos usados fueron de grado analítico.

1. OBTENCION DE LAS FRACCIONES DE ANTIGENOS.

Se obtuvieron las siguientes fracciones de antígenos: cisticercos enteros (CKS), pared (P), escólex (E) y fluido vesicular (L). Cisticercos enteros sin cápsula inflamatoria a los cuales se les había eliminado el fluido vesicular por medio de punción fueron homogenizados en un polytrón (Brinkman Instruments) durante 1 a 2 minutos a máxima potencia. El medio de homogenización consistía en una solución salina amortiguada (SSA) 0.2M pH 7.2 que contenía antibióticos (0.2% de penicilina y 0.2% - de estreptomicina) e inhibidores de enzimas proteolíticas; - 0.1% p/v, p-hidroximercuribenzoato (PCMB); 0.02% p/v de fenil metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) y 10 mM de ácido etilén diamino tetracético (EDTA). El material homogenizado se dejó durante 12 horas a 4°C con agitación continua y se centrifugó a 30,000 x g durante 1 hora a 4°C. Después de eliminar la capa lipídica superior, el sobrenadante (CKS) fue dividido en alícuotas y almacenado a -20°C hasta su uso.

Fig. 2.- Esquema que muestra el protocolo seguido para -
obtener las fracciones de antígenos del cisticerco de T.
solium.

OBTENCION DE ANTIGENOS

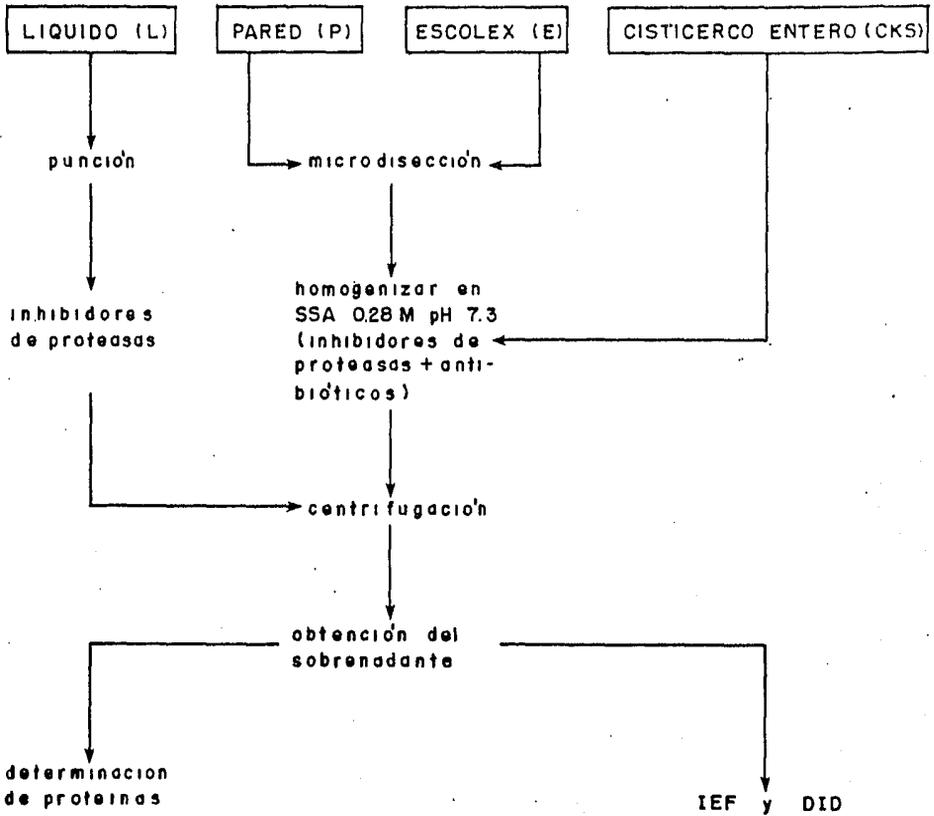


Fig. 2

Para la obtención de las fracciones P y E, la pared vesicular era separada del escólex por microdissección y ambos materiales (pared y escólex) eran procesados por separado como se describió para la fracción CKS.

El líquido vesicular obtenido por punción de cisticercos enteros, fue centrifugado a 30,000 x g durante 30 minutos a -4°C para eliminar restos tisulares, y el sobrenadante (L) se almacenó en alícuotas a -20°C hasta su uso (Fig. 2).

Antígeno B (80) del cisticerco de la Taenia solium fue amablemente donado por G. Guerra. Extractos antigénicos crudos de A. suum (As), O. gutturosa (Og), y C. Tenuicollis (Ct) fueron preparados por S. Guevara y el extracto antigénico de T. cruzi por A. González. A todas las fracciones se les determinó concentración de proteínas por el método de Lowry - (81).

2. PURIFICACION DE LA IgG PORCINA.

Del suero porcino se extrajeron las gamaglobulinas, mediante

la técnica de precipitación con sulfato de amonio (82) - seguida por una cromatografía en columna de DEAE-celulosa (83). En resumen, a 30 ml de suero porcino se le adicionaron 19.98 ml de sulfato de amonio saturado (concentración final 40%).

En caso necesario el pH se ajustaba a 7 con NaOH 0.1N. La mezcla se agitó en baño de hielo durante 30 minutos y se centrifugó a 10,000 x g durante 15 minutos a 4°C. El precipitado obtenido se resuspendió en SSA pH 7.2 en el volumen original del suero. Usualmente, esta operación se repetía 3 veces, hasta obtener un precipitado completamente blanco.

El sulfato de amonio se eliminó dializando exhaustivamente contra SSA 0.015 M pH 7.2 y el sobrenadante se pasó por una columna de 25 ml de DEAE-celulosa equilibrada con SSA 0.015M pH 8 (83). La absorbancia a 280 nm de las fracciones obtenidas fue determinada en un espectrofotómetro. Se graficó densidad óptica contra el número de fracción y se unieron las -

correspondientes al primer pico de elución que contenía el material no unido a la resina. Se comprobó que la fracción tenía un grado de pureza satisfactorio por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS) (Fig. 3a) (84); la concentración de proteínas se cuantificó por el método de Lowry (81).

3. OBTENCIÓN DE IgG DE CONEJO ANTI IgG DE CERDO

Se inmunizaron subcutáneamente conejos normales con fracciones de IgG de cerdo obtenidas como se describió anteriormente de acuerdo al siguiente protocolo:

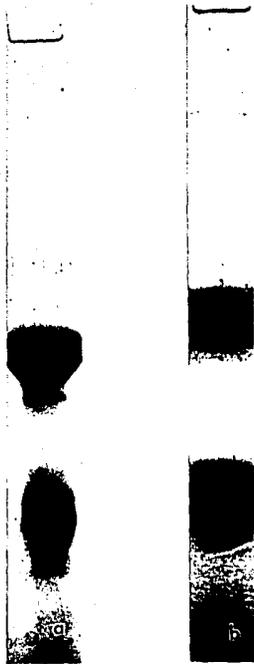
día 0 0.5 mg de IgG de cerdo en adyuvante completo de Freund (ACF).
día 7 1 mg en ACF
día 21 1 mg en ACF
día 28 Sangrado

La purificación de las IgG de los sueros hiperinmunes se -- llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento que para las IgG porcinas (Fig. 3b). Para demostrar su actividad de anti-IgG porcina, se realizaron pruebas de inmunoelectroforesis (IEF) y de doble inmunodifusión (DID) en contra de suero de cerdo

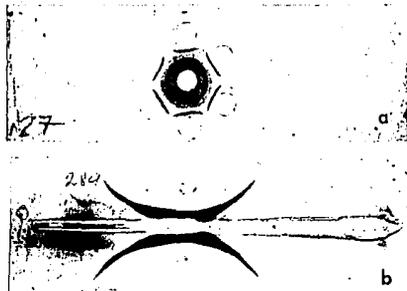
Fig. 3.- Electroforesis en geles de poliacrilamida de las IgGs purificadas por precipitación con sulfato de amonio y cromatografía a través de una columna de DEAE-celulosa: a) IgG porcina y b) IgG de conejo con actividad de anti IgG porcina. Tinción con azul brillante de Coomassie.

Fig. 4.- Doble inmunodifusión (a) e inmunolectroforesis (b) en las que se enfrentó IgG de conejo anti-IgG porcina (pozo central y canal central) contra suero de cerdo normal (pozos periféricos e inferior y superior).

3



4



normal, obteniéndose en ambos casos una sola banda de precipitación (Fig. 4).

4. CONJUGACION DE LAS FRACCIONES DE ANTIGENOS CON ISOTIOCIANATO DE FLUORESCEINA (FITC).

Para llevar a cabo el acoplamiento se siguió el método descrito por Rinderknecht (85). Se mezclaron 5-10 mg de proteína de alguna de las fracciones de antígenos con 2 ml de amortiguador carbonato-bicarbonato de sodio 0.015 M pH 8.5 y 5-10 mg de celita que contenfa 10% de isotiocianato de fluoresceina. La mezcla se agitó 3 minutos a 4°C; se centrifugó a 6000 x g durante 3 minutos y el sobrenadante se pasó por una columna de 2.8 x 18 cm de Sephadex G-25, usando como eluyente SSA 0.2M pH 6.5 Las fracciones se leyeron en espectrofotómetro a 493 y 276 nm. Se graficó densidad óptica contra número de fracción y se seleccionaron las correspondientes al pico de proteína acoplado a fluoresceina (Fig. 5). Se calcularon las relaciones F: P molar, F:P µgr/mg y concentración de proteínas de las fracciones, usando el monograma ideado por Wells y cols. (86). Para las tinciones de cortes se usaron las fracciones con F:P molar de 1-3; F:P µgr/mg 3-9 y concentración de proteínas de 1-3 mg/ml. Albúmina sérica bovina también fue acoplada a FITC siguiendo el mismo

Fig. 5.- Perfiles de elución de las fracciones de antígenos del cisticerco acopladas a isotiocianato de fluoresceína, a través de columna de Sephadex G-25. Cisticercos enteros (CKS), excólex (E), pared (P) y fluido vesicular (L).

ANTIGENOS ACOPLADOS A ISOTIOCIANATO DE FLUORESCINA (FITC).

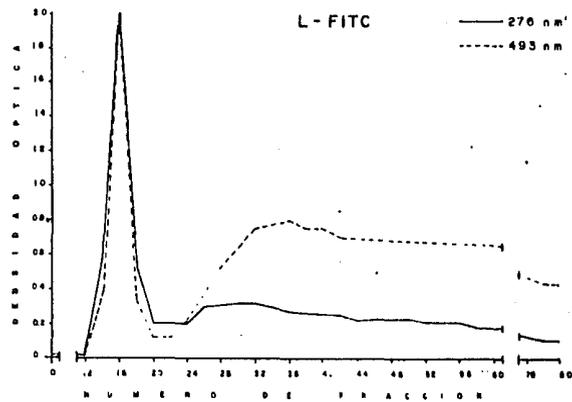
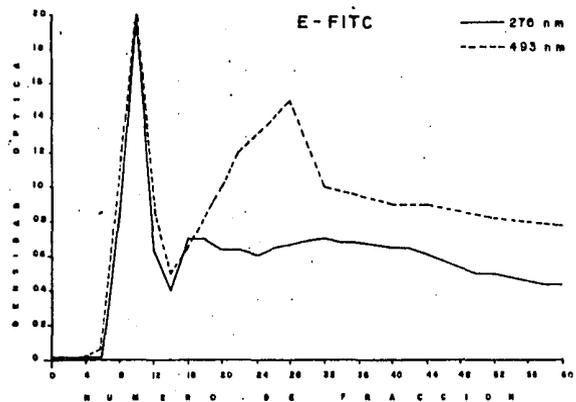
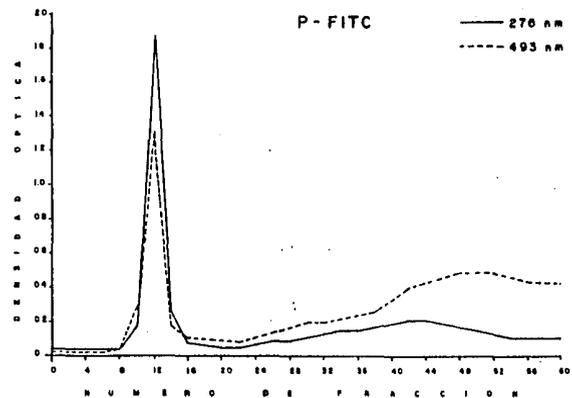
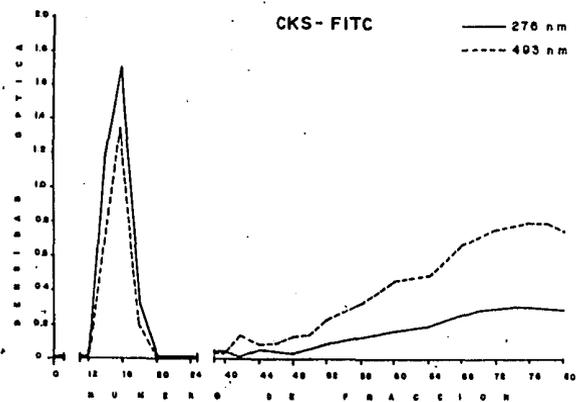


Fig. 5

procedimiento, para ser usada posteriormente en algunos controles experimentales.

Dependiendo de su origen, las fracciones fluoresceinadas fueron designadas: CKS-FITC, P-FITC, E-FITC, L-FITC y -BSA-FITC.

5. CONJUGACION DE LAS IgG DE CONEJO ANTI-IgG DE CERDO A FITC.

Se siguió la técnica descrita por Marshall y cols. (87), usando los siguientes reactivos: buffer carbonato-bicarbonato de sodio 0.5 M pH 9-9.5, anti-IgG de cerdo (5-10 mg/ml) y FITC (0.05 mg/ml). La mezcla de reactivos se agitó durante 24 horas a 4°C se dializó contra SSA 0.15 M pH - 7.2 y posteriormente se pasó por una columna de Sephadex G-25 para eliminar el FITC no acoplado. Las fracciones colectadas se leyeron a 276 nm (proteína) y 493 nm (FITC). Se graficaron los valores obtenidos de densidad óptica - contra el número de fracción y se unieron las correspondientes al primer pico de elución (Fig. 6). Se calcularon las relaciones F:P molar, F:P μ gr/mg y concentración de proteína de las fracciones, usando el nomograma de Wells y cols. (86). Para las tinciones de cortes se usaron las fracciones con F:P molar de 1-4; F:P μ gr/mg 3-9 y concen-

Fig. 6.- Perfil de elución de anti IgG porcina acoplada a isotiocianato de fluoresceina, a través de columna de Sephadex G-25.

Anti-IgG de cerdo acoplada a FITC

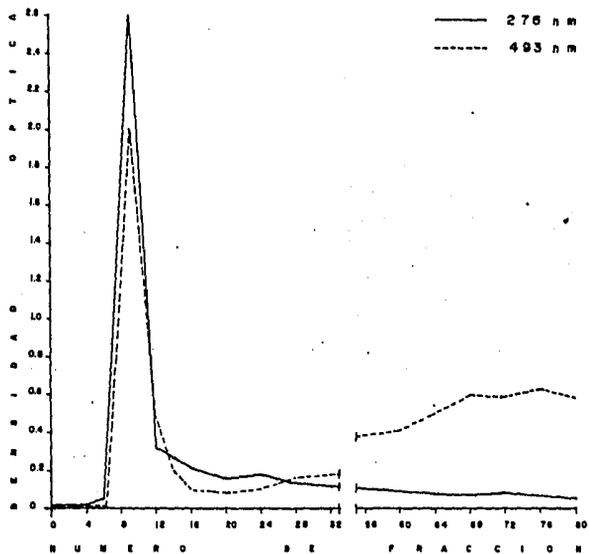


fig. 6

tración de proteínas de 2 a 6 mg/ml.

Con objeto de inhibir reacciones inespecíficas del conjugado, las fracciones de éste fueron absorbidas con polvos cetónicos de hígado de ratón (88) que se obtuvieron de la siguiente manera: se sacrificaron 4 ratones a los cuales se les extrajo el hígado. Los hígados se homogenizaron en alcohol etílico al 70% a 4°C. El homogenado se centrifugó a 10,000 x g durante 15 minutos a 4°C y el material sedimentado se resuspendió en acetona fría, se dejó reposar 20 minutos y se centrifugó nuevamente. La operación se repitió dos veces más y el material sedimentado, se liofilizó y almacenó a -12°C hasta su uso.

La absorción del conjugado se llevó a cabo, lavando e hidratando 100 mg de polvo cetónico con SSA pH 7.6. El sedimento fresco se resuspendió en 1 ml del conjugado y se dejó absorber durante 2 horas a 4°C con agitación continua, evitando la formación de espuma. El sedimento se eliminó centrifugando a 12,000 x g, 30 minutos a 4°C (89).

6. PREPARACION DE CORTES HISTOLOGICOS.

Cisticercos frescos disecados con cápsula inflamatoria fue-

ron incluidos en Tissue Teck sumergiéndolos (envueltos en papel aluminio) en ciclohexano enfriado en una mezcla de hielo seco-acetona. Cortes de 5 μm de grosor fueron obtenidos en un criostato (Crio-Cut II, American Optical) y almacenados a -20°C un máximo de 24 horas. Antes de ser usados, los cortes eran fijados con una mezcla de ácido acético al 5% en alcohol etílico, durante 15 minutos a -20°C .

Cortes de bazo de cerdo normal fueron obtenidos y fijados de la manera descrita anteriormente.

7. INMUNOFLUORESCENCIA DE CORTES HISTOLOGICOS DE CISTICERCOS CON CAPSULA INFLAMATORIA.

a) Detección de IgG porcina: la detección de IgG porcina en los cortes se llevó a cabo, siguiendo el método directo de Coons (88). Los cortes se incubaron con un anti-IgG de cerdo acoplado a FITC, durante 45 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se lavaron con agitación continua con solución de SSA pH 7.2 durante 1 hora con cambios cada 15 minutos y finalmente se montaron en una mezcla de glicerol: SSA pH 7.2 (9:1) y se observaron y fotografiaron en un microscopio de epifluorescencia. Para determinar la fluorescencia inespecífica se usaron cortes preincubados por 45 minutos a temperatura ambiente con -

anti-IgG sin fluoresceinar e incubados con anti IgG-FITC. Para determinar la fluorescencia endógena de los cortes, se incubaron en idénticas condiciones con SSA pH 7.2.

- b) Detección de anticuerpos anti-cisticerco: ésta se llevó a cabo siguiendo el método directo de Coons (88) como se describió anteriormente. Los cortes se incubaron con: CKS-FITC, P-FITC, E-FITC y L-FITC. Como controles se usaron:
- a) cortes preincubados 45 minutos a temperatura ambiente - con antígenos no fluorescentes, lavados y enseguida incubados con fracciones de antígenos fluorescentes;
 - b) cortes - incubados con BSA-FITC;
 - c) cortes preincubados 45 minutos a temperatura ambiente con BSA, lavados y enseguida incubados con fracciones de antígenos fluorescentes;
 - d) cortes incubados con SSA pH 7.2;
 - e) cortes de bazo de cerdo normal incubados con las fracciones: CKS-FITC, P-FITC, E-FITC y L-FITC.
- c) Detección del factor C3 de complemento: la detección de C3 en los cortes se llevó a cabo siguiendo la técnica de inmunofluorescencia indirecta, descrita por Coons (90). Los cortes se incubaron inicialmente con anti C3 de cerdo preparado en conejo (dilución 1:15), durante 45 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda; se lavaron con

agitación continua con una solución amortiguadora de barbituratos pH 7.4 durante 1 hora con cambios cada 15 minutos; se incubaron posteriormente con IgG de cabra anti-IgG de conejo fluorescente (Anti IgG conejo-FITC) diluida 1:20, y se lavaron de manera idéntica. Algunos cortes se contrastaron con 1 a 5 gotas de azul Evans (1:10,000 en SSA pH 7.4) lavándose con SSA pH 7.4 durante 20 minutos con 2 cambios. Los cortes se montaron en una mezcla de glicerol: SSA pH 7.4 (9:1), se observaron y fotografiaron en un microscopio de epifluorescencia.

8. CULTIVO In vitro DE LAS CAPSULAS INFLAMATORIAS.

Fué usada una modificación de la técnica descrita por Hochwald y cols (91). Se disecaron las cápsulas inflamatorias de cisticercos de cerdos recién sacrificados y se lavaron con solución balanceada de Hanks (SSBH) pH 7.6 que contenía antibióticos (100 u/ml de penicilina y 100 u/ml de estreptomomicina). Posteriormente las cápsulas fueron transferidas - bajo condiciones de esterilidad a cajas de cultivo (200 cápsulas por caja) que contenían 12 ml de SSBH al cual se le adicionó, ovalbúmina 0.5%, penicilina 100 u/ml, estreptomomicina 100 u/ml, 1 MCi de metionina-S³⁵ y los restantes aminoácidos (glicina, valina, leucina, alanina, isoleucina, serina,

treonina, cisteina, cistina, glutamina, aspártico, lisina, arginina, ~~gal~~alanina, tirosina, triptofano, prolina, hidroxi prolina e histidina) no radioactivos y a una concentración final de 50 μ M cada uno. Las cajas de cultivo se incubaron 48 horas con rotación continua a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y humedad a saturación. Después de la incubación los cultivos se sometieron a un ciclo de congelación-descongelación y se centrifugaron durante 10 minutos a 10,000 x g a 4°C. El sobrenadante se dializó contra 2 l de SSA 0.01 M pH 7.2 durante 72 horas con 5 cambios para disminuir la fuerza iónica y eliminar metionina-S³⁵ no incorporada a protef-nas. Como control se incubó la misma cantidad del medio de cultivo, en idénticas condiciones pero sin cápsulas inflama-torias.

A continuación se determinó si en el medio de cultivo obteni-do existían protefnas sintetizadas de novo. Para ésto, se - tomaron 100 μ l del medio de cultivo diluido con 0.9 ml de - agua destilada y se les agregó 1 ml de solución decolorante (NAOH, H₂O₂ y metionina) y 1 ml de ácido tricloro acético (TCA) al 25%. Las mezclas se agitaron brevemente y se deja-ron reposar 30 minutos a 4°C; se filtraron a través de fil-tros millipore de 0.45 μ m de diámetro de poro. Los filtros con el precipitado atrapado se lavaron con TCA al 8% y se -

deshidrataron calentando a 200°C por 5 minutos. Los filtros secos se introdujeron en viales que contenían 5ml de 2,5 difenil oxazol, (PPO) al 0.4% en tolueno y la radioactividad se determinó en un contador de centelleo líquido. Generalmente la cantidad de radioactividad incorporada por caja de cultivo variaba entre 8 a 10×10^6 cpm. Finalmente se liofilizaron los sobrenadantes obtenidos del medio cultivo incubado con cápsulas inflamatorias (SP) o sin cápsulas (CM) y antes de su uso se reconstituyeron con 0.1 ml de agua bidestilada estéril por caja de cultivo.

9. INMUNOELECTROFORESIS (IEF) Y DOBLE INMUNODIFUSION (DID).

Las pruebas de IEF y DID se realizaron de acuerdo con los métodos descritos por Garvey (92) y Ouchterlony (93) respectivamente. En ambos casos se usó como soporte para la precipitación, agarosa al 0.9% en amortiguador de barbituratos - 0.02 M pH 8.6 que contenía azida de sodio al 0.2%. Se usaron las siguientes fracciones de antígenos: CKS (6.6 mg/ml), - P (9.5 mg/ml), E (12.7 mg/ml), I (12.4 mg/ml) y antígeno B (1.4 mg/ml), colocando 30 μ l de cada una de ellas en los pozos periféricos (DID) o bien en los pozos superior e inferior (IEF). En el pozo central DID y en el canal central (IEF) se adicionó el medio de cultivo obtenido de la incuba-

ción de las cápsulas (SP) diluido 1:2 con suero de conejo - anti CKS como acarreador para facilitar la precipitación. Para la IEF, éste último paso se realizó después de la separación electroforética de las fracciones de antígeno. Se permitió la difusión durante 24 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. Para eliminar marca libre que pudiera interferir en la interpretación de los resultados, los geles - se lavaron con SSA 0.15 M pH 7.0 durante 72 horas a 4°C con 6 cambios. A continuación los geles se secaron a temperatura ambiente, usando papel absorbente y se tiñeron con amido negro al 10% en ácido acético al 15%.

Los controles se procesaron de la manera descrita anteriormente, substituyendo el medio de cultivo incubado con cápsulas inflamatorias (SP) por el sobrenadante obtenido de la incubación del medio sin cápsulas (CM).

La especificidad de las inmunoglobulinas sintetizadas de novo se determinó substituyendo las fracciones de antígenos del cisticercos por antígenos obtenidos de otros parásitos: A. suum (As, 9.2 mg/ml), O. gutturosa (Og, 6.3 mg/ml), C. tenuicollis (Ct, 5.1 mg/ml), T. cruzi (Tc, 1 mg/ml), y además albúmina sérica bovina (BSA, 3 mg/ml).

Para determinar si ocurría atrapamiento inespecífico de marca en las bandas de precipitación, se mezcló SP con suero hiperinmune anti-As (dilución 1:2) y la mezcla se usó en una IEF en contra de antígeno de As. Para investigar que clases de inmunoglobulinas eran sintetizadas en la reacción inflamatoria se hicieron IEF y DID en las que el SP era mezclado con suero de cerdo normal (1:2), este último como agente - facilitante de la precipitación. La mezcla se ponía a reaccionar frente a IgGs de conejo con actividad anti IgG, anti IgM o anti IgA de cerdo. En los controles SP se substituyó por CM.

10. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

Se tomaron 150 μ l de SP y CM sin concentrar y se corrieron en geles de poliacrilamida al 10% con SDS (94). Como marcadores de peso molecular se usó una mezcla comercial de proteínas. Las bandas de proteína separadas electroforéticamente fueron teñidas con azul brillante de Coomassie al 0.06% en una mezcla de ácido acético al 10% en metanol al 30%, y des-teñidos con ácido acético al 10%.

11. AUTORADIOGRAFIAS DE LOS GELES.

- A) Geles de poliacrilamida: los geles de poliacrilamida teñidos con azul brillante de Coomassie se incubaron con:
- a) dimetil sulfóxido (DMSO) durante 1 hora con cambios de cada 20 minutos;
 - b) 2-5 difenil oxazol (PPO) al 20% en DMSO durante 2 horas y
 - c) agua destilada durante 24 horas.
- Los geles se deshidrataron en un secador de geles y se pusieron en contacto con placas de rayos X que se mantuvieron a -70°C protegidas de la luz en cassettes metálicos convencionales. Las placas se revelaron después de 3 días de exposición.
- B) Inmunolectroforesis (IEF) y doble inmunodifusión (DID): las laminillas secas y teñidas, sin tratamiento adicional fueron puestas en contacto con placas de rayos X. Estas, se mantuvieron a -70°C protegidas de la luz mediante cassettes convencionales. Se revelaron después de 6 días de exposición.

RESULTADOS

DETECCION DE IgG PORCINA EN LA REACCION INFLAMATORIA

Para determinar si habia inmunoglobulinas en la respuesta inflamatoria que rodea al cisticerco de cerdo, se incubaron cortes de cisticercos con cápsula inflamatoria en presencia de anticuerpos anti-IgG de cerdo fluoresceinados (anti IgG --- FITC). Como se observa en las figuras 8A,B la fluorescencia se localizó no solo en el tegumento del cisticerco, sino también en el tejido conectivo y en diversos tipos celulares de la cápsula inflamatoria. En cambio, cortes preincubados -- con anti IgG sin fluoresceinar e incubados con anti IgG-FITC no mostraron fluorescencia apreciable (Fig. 8C). La figura - 8D, muestra que la fluorescencia endógena del tejido es escasa por lo tanto no dificultaba la interpretación de los resultados. Una muestra representativa del tipo de células que - ocurren en el infiltrado se presenta en la figura 7, pudiéndose identificar: linfocitos, células plasmáticas, macrófa-gos, eosinófilos y neutrófilos; cabe hacer notar que se ob-servan patrones celulares distintos entre los diferentes - granulomas estudiados.

DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-CISTICERCO EN LA REACCION INFLAMATORIA.

Para determinar si las inmunoglobulinas detectadas en el te-gumento del cisticerco y en la respuesta inflamatoria que lo

Fig. 7.- Micrograffías de distintas regiones de la interfase cisticerco-cerdo en las que se observan imágenes representativas de la respuesta inflamatoria que rodea al parásito. Los cortes de 1 μ m de grosor fueron teñidos con azul de toluidina . A) RI, reacción inflamatoria; Cc, cisticerco; T, tegumento. B) E, eosinófilos; N, neutrófilo. C) Cp, células plasmáticas. D) Cp, células plasmáticas; L, linfocitos. (Amplificación: A, 190X; B, C y D. 500X). Cortesía de M.T. Merchant.

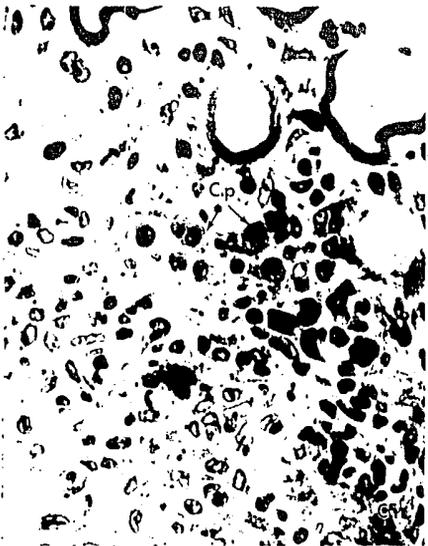
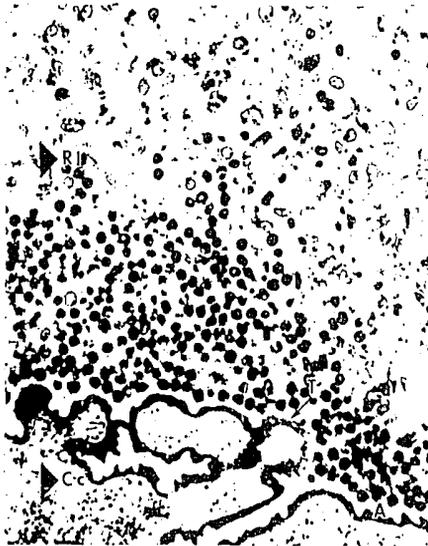
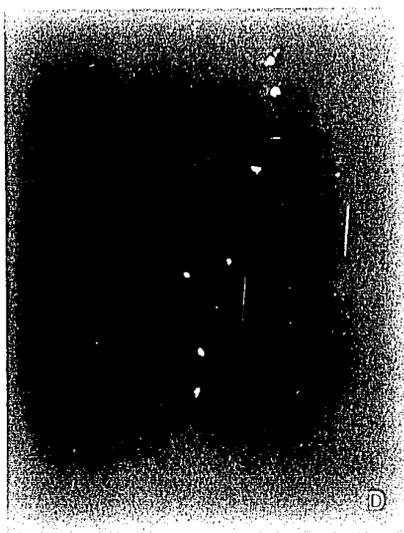
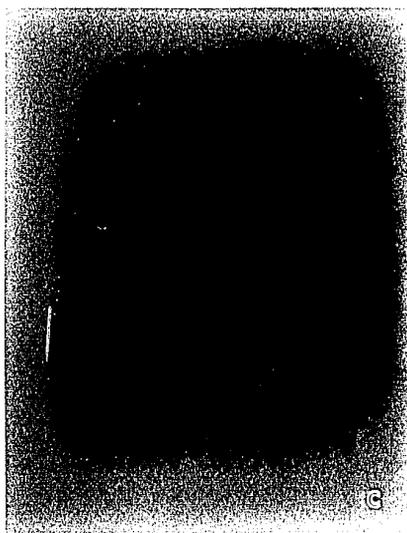
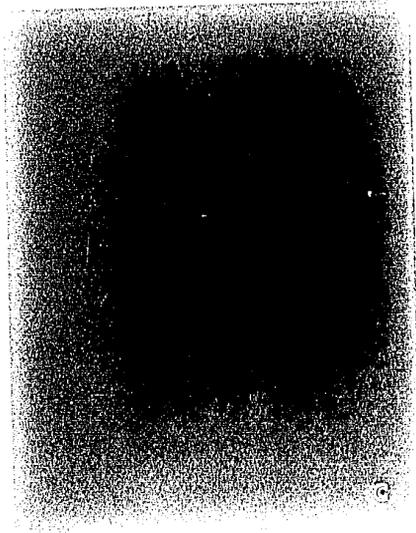


Fig. 8.- Inmunofluorescencia directa de cortes de cisticercos con cápsula inflamatoria. AyB) cortes incubados con anti-IgG porcina-FITC. RI, reacción inflamatoria; Cc, cisticerco; T, tegumento. C) corte preincubado con anti IgG porcina no fluoresceinada e incubado con anti IgG porcina-FITC. D) corte incubado con SSA pH 7.2 como control de fluorescencia endógena. El grosor de los cortes era de 5 μm (Amplificación: 300X).



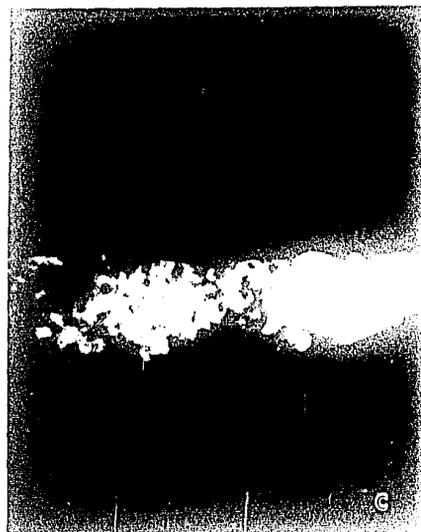
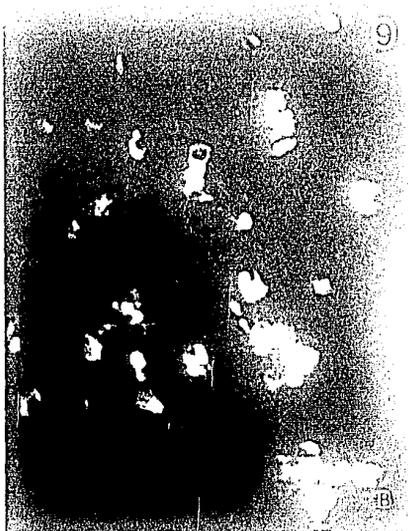
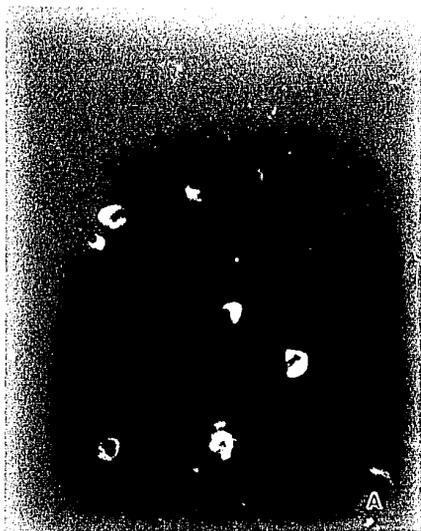


rodea, eran dirigidos en contra de antígenos del parásito, se fluoresceinaron fracciones de antígenos de: cisticercos enteros sin fluido vesicular (CKS-FITC); pared vesicular (P-FITC); escólex (E-FITC) y fluido vesicular (L-FITC). Los cortes de cisticercos con cápsula inflamatoria incubados con las distintas fracciones no mostraron diferencias apreciables ni en la intensidad ni en la localización de la fluorescencia (Figs. - 9 A-D). Las siguientes características observadas en casi la totalidad de las células fluorescentes son consistentes con la idea de que se trata de células plasmáticas: 1) citoplasma fluorescente; 2) morfología y tamaño acorde a células plasmáticas con núcleo excéntrico; 3) localización correspondiente a los sitios donde generalmente se observan las células plasmáticas en cortes histológicos. En las figuras 7CyD además de células plasmáticas, se observan células con citoplasma fluorescente que posiblemente sean macrófagos que han fagocitado complejos Ag-Ac.

La preincubación de los cortes con CKS no fluorescente inhibió casi totalmente la posterior fijación de CKS-FITC (Fig. 10A), mientras que la preincubación con BSA no la inhibía -- (Fig. 10B), lo cual indica que el pegado de esta fracción de antígeno era específico.

En congruencia con lo anterior, la incubación de los cortes de cisticercos rodeados de reacción inflamatoria con un antígeno no relacionado: BSA-FITC (Fig. 10C) o la incubación de

Fig. 9.- Inmunofluorescencia directa de cortes de cisticercos con reacción inflamatoria incubados con fracciones de antígenos de cisticerco fluoresceinados. A) CKS-FITC. B) E-FITC. C) P-FITC. D) L-FITC. El grosor de los cortes era 5 μm (Amplificación: 500X).

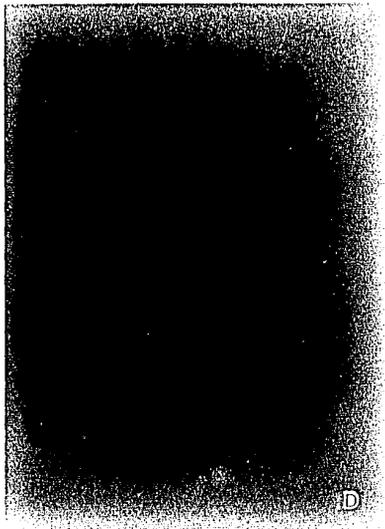
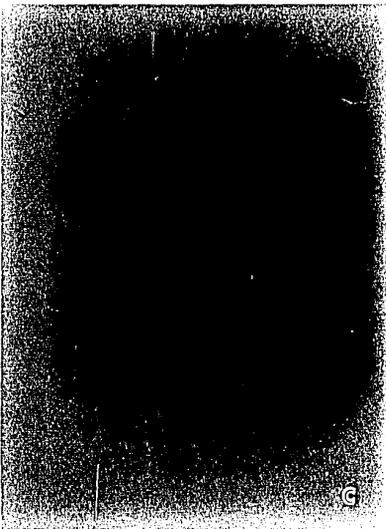
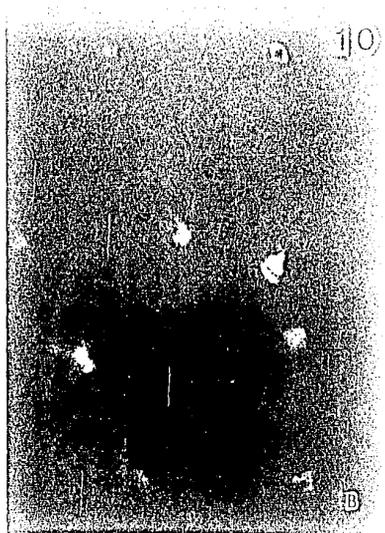
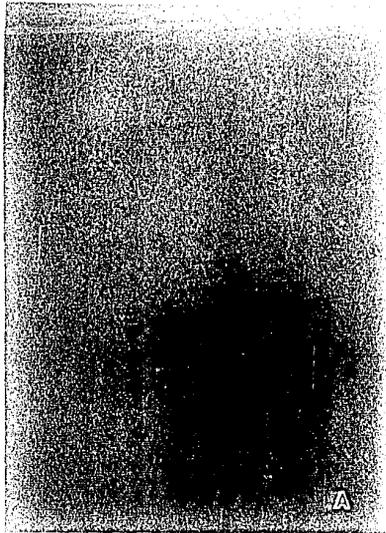


cortes de bazo de cerdo normal con CKS-FITC (Fig. 10D) no produjo ninguna fluorescencia en las células. Se realizaron controles equivalentes para cada una de las restantes fracciones de antígenos, obteniéndose idénticos resultados (datos no -- mostrados).

DETECCION DE C3 DE CERDO EN LA REACCION INFLAMATORIA

Estudios de inmunofluorescencia indirecta en cortes incubados primero con IgG de conejo anti C3 de cerdo y posteriormente con IgG de cabra anti IgG de conejo fluoresceinada (anti IgG conejo-FITC) revelaron la presencia del factor C3 del complemento en las fibras del tejido conectivo de la reacción inflamatoria, en algunas zonas de la superficie del tegumento del cisticerco y ocasionalmente en células mononucleares grandes (presumiblemente macrófagos) localizadas en la partes más externa de la reacción granulomatosa (Figs. 11 A, B). Como controles se incubaron cortes con IgG de conejo normal como primer anticuerpo y luego con anti IgG conejo-FITC (Fig. 11 C), así como cortes incubados únicamente con el segundo anticuerpo (Fig. 11D). En ambos casos no se observó fluorescencia.

Fig. 10.- Controles de la inmunofluorescencia directa -
presentada en la figura 9. A, B y C: cortes de cisticerco
con cápsula inflamatoria; D: corte de bazo de cerdo -
normal. A) Corte preincubado con CKS sin fluoresceinar
e incubados con CKS-FITC B) Corte preincubado con BSA
e incubado con CKS-FITC. C) Corte incubado con BSA-FITC.
D) Corte incubado con CKS-FITC. (Aumento: 500X).



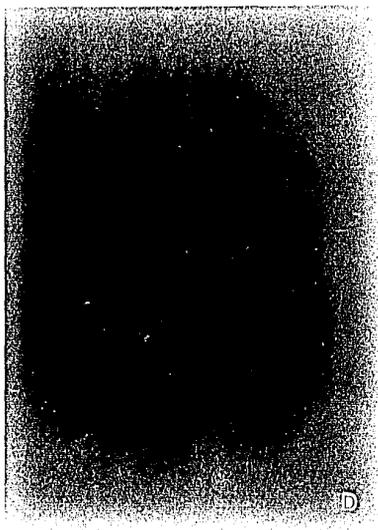
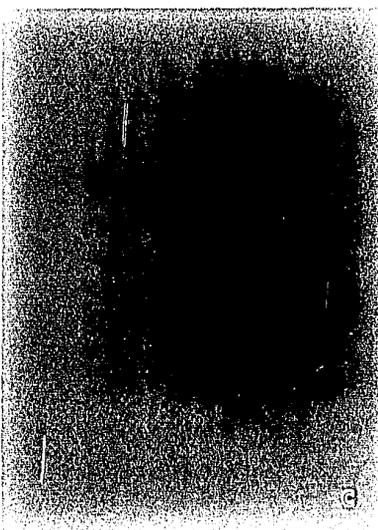
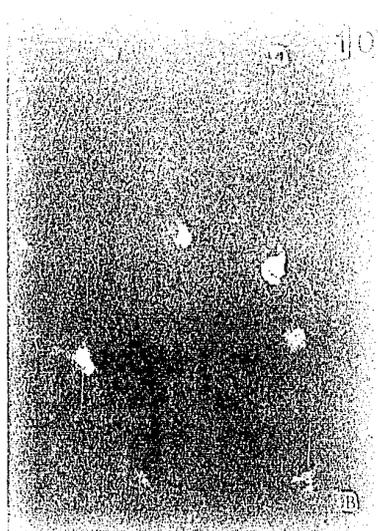
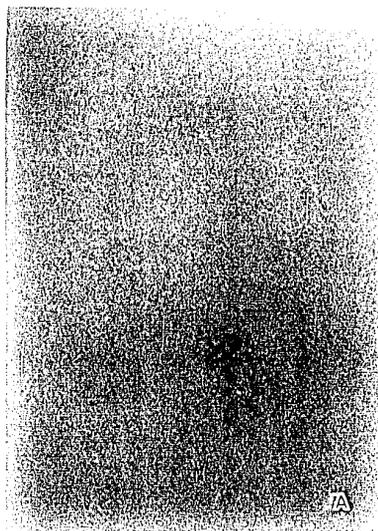
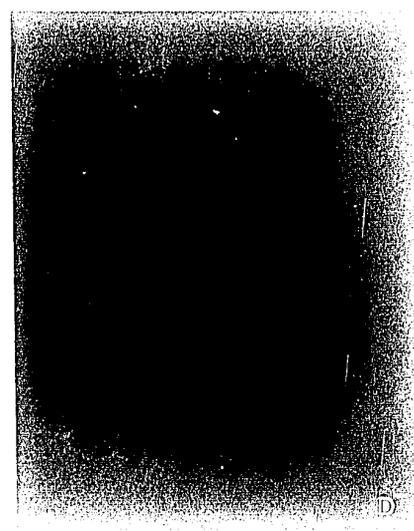
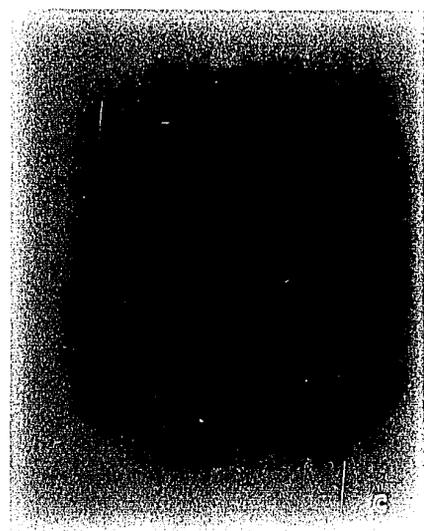
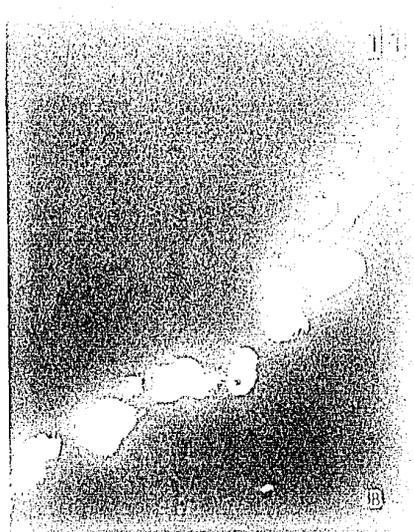


Fig. 11.- Inmunofluorescencia indirecta de cortes de cisticercos con reacción inflamatoria. AB) Cortes preincubados con IgG de conejo anti C3 de cerdo (anti C3) e incubados con anti IgG de conejo - FITC: en A, se muestra una imagen panorámica y un detalle representativos de una región rica en tejido conectivo, mientras que en B se muestra una región representativa rica en células. C) - Corte preincubado con IgG de conejo normal e incubado con anti IgG de conejo - FITC. D) Corte incubado con anti - IgG de conejo FITC. (Amplificación: A, imagen panorámica 500X y detalle 900X; B,C y D, 500X.



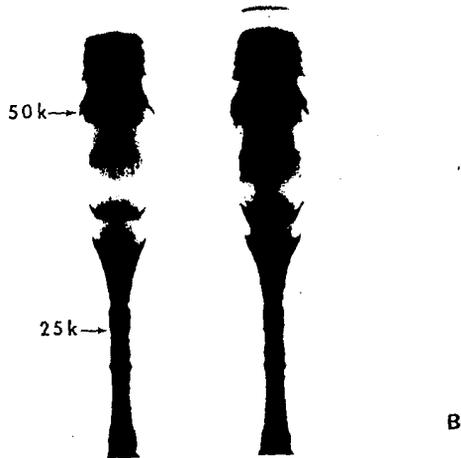
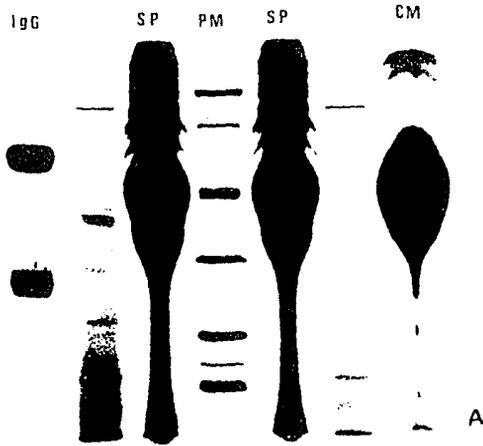
SINTESIS de novo DE ANTICUERPOS ANTI-CISTICERCO POR CELULAS PLASMATICAS DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA.

Como se describió anteriormente, se habfan obtenido resultados sugerentes de que las células plasmáticas presentes en el granuloma que rodea al cisticerco, sintetizan anticuerpos dirigidos en contra del parásito. Con la idea de reforzar esta observación se cultivaron in vitro, cápsulas inflamatorias en un medio que contenfa un aminoácido (metionina- S^{35}) radioactivo. Después de 48 horas de cultivo, se colectó y concentró el sobrenadante de cultivo (SP) y se hicieron pruebas que determinaron si habfa ocurrido síntesis de novo de anticuerpos. Además se investigó qué clases de inmunoglobulinas eran sintetizadas.

Inicialmente se analizó el contenido protéico de SP y CM utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida y 2-mercaptoetanol. La figura 12 muestra la imagen teñida y de autorradiografía de un gel de poliacrilamida con SDS en el que se corrieron muestras de SP y CM. La autorradiografía del gel muestra que SP contenfa numerosas bandas radioactivas. Dos de las cuales tienen pesos moleculares de 50K y 25K y podrían corresponder a las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas sintetizadas de novo.

Fig. 12.- Electroforesis en gel de poliacrilamida con - SDS de las siguientes muestras: medio de cultivo incubado con cápsulas inflamatorias (SP), medio de cultivo incubado sin cápsulas (CM), IgG porcina (IgG) y mezcla comercial de proteínas de pesos moleculares conocidos - (PM). A) Gel teñido con azul brillante de Coomassie. - B) Autorradiografía del gel.

12



Para determinar si la fracción SP contenía anticuerpos dirigidos contra antígenos del parásito, se utilizaron las técnicas de IEF y DID. Una mezcla de SP con suero de conejo anti-CKS (facilitador de la precipitación) se puso a reaccionar frente a las fracciones de antígenos del cisticerco: CKS, P, E y L y frente a una muestra de antígeno B puro. Las laminillas secas y teñidas se sometieron a autorradiografía para revelar la presencia de radioactividad en las bandas de precipitación. Las imágenes de autorradiografías presentadas en las figuras 13 a 15, demuestran que el sobrenadante SP contenía anticuerpos radioactivos dirigidos en contra de antígenos del cisticerco. Cabe hacer notar la presencia de anticuerpos anti-B sintetizados de novo por células plasmáticas de la -- reacción inflamatoria.

Para determinar si la radioactividad observada en las bandas de precipitación era aportada por los anticuerpos sintetizados de novo y no por un arrastre inespecífico de moléculas radioactivas durante la difusión y precipitación, una muestra de SP mezclado con suero de conejo anti-As, se puso a reaccionar a un extracto crudo de As. A pesar de que las laminillas teñidas con amido negro muestran numerosas bandas de precipitación, por autorradiografía solo una de ellas contenía radioactividad (Fig. 16), lo que posiblemente indica que este parásito comparte un antígeno con el cisticerco (103).

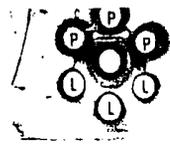
Fig. 13.- Doble inmunodifusión de una mezcla 1:2 de SP - con suero anti CKS (pozos centrales) en contra de las - fracciones de antígeno de cisticerco; CKS, cisticercos enteros; P, pared y L, fluido vesicular. a) Geles teñidos con negro de amido. b) Autorradiografías de los - mismos geles.

Fig. 14.- Inmunoelectroforesis de una mezcla 1:2 de SP - con suero de conejo anti CKS (canal) frente a las fracciones de antígenos E y CKS; a) geles teñidos con negro de amido. b) Autorradiografías de los mismos geles.

Fig. 15.- Inmunoelectroforesis de una mezcla 1:2 de SP - con suero de conejo anti CKS (canal) frente a antígeno B puro de cisticerco (B); a) gel teñido con negro de amido. b) Autorradiografía del mismo gel.



a



a



b

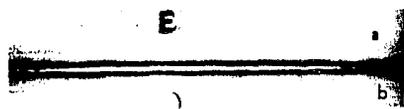


b

13



a

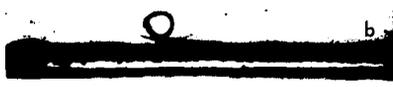


b

14



a



b

15

IEF y DID en las cuales se substituyó SP por CM y que presentaron bandas de precipitación cuando fueron teñidas con amido negro no contenían radioactividad incorporada a las bandas -- (Fig. 17). En esta figura sólo se muestra el caso de la fracción E puesto que las restantes fracciones de antígenos produjeron resultados idénticos.

La especificidad de los anticuerpos sintetizados de novo fue estudiada por IEF y por DID poniendo a reaccionar la mezcla de SP y suero de conejo anti-CKS en contra de antígenos heterólogos: As, Og, Ct, Tc y BSA. A excepción de los antígenos As y Ct, ninguno formó bandas de precipitación detectables por tinción o por autorradiografía de las laminillas -- (Figs. 18 y 19).

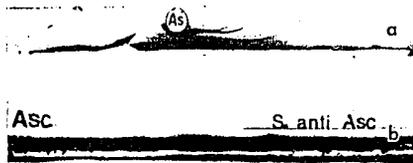
Para dilucidar qué clases de inmunoglobulinas se estaban sintetizando dentro de la reacción granulomatosa, se utilizaron nuevamente las técnicas de IEF y DID. SP fue mezclado con -- suero normal de cerdo, este último como agente facilitante de la precipitación y se dejó reaccionar frente a 3 anticuerpos preparados en conejo, cuya especificidad era de anti-IgG, anti IgM ó anti IgA de cerdo. Las autorradiografías de estas laminillas mostraron bandas de precipitación radioactivas con cada uno de los anticuerpos probados, (Figs., 20 y 21).

Fig. 16.- Inmunolectroforesis de una mezcla 1:2 de SP - con suero de conejo anti As (canal) frente a antígeno - crudo de Ascaris suum (As); a) gel teñido con negro de amido. b) Autorradiografía del mismo gel.

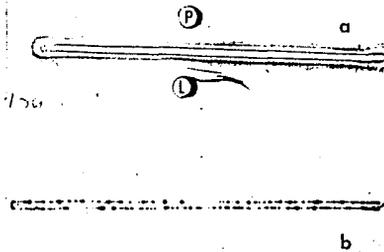
Fig. 17.- Inmunolectroforesis de una mezcla 1:2 de CM - con suero de conejo anti CKS (canal) frente a las fracciones de antígenos del cisticerco P y L; a) gel teñido con negro de amido. b) Autorradiografía del gel.

Fig. 18.- Doble inmunodifusión de una mezcla 1:2 de SP - con suero de conejo anti CKS (pozo central) frente a extractos antigénicos crudos de C. tenuicollis (Ct) y A. suum (As); a) gel teñido con negro de amido. b) Autorradiografía del mismo gel.

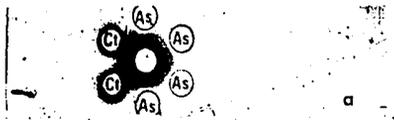
Fig. 19.- Doble inmunodifusión de una mezcla 1:2 de SP - con suero de conejo anti CKS (pozo central) frente a extractos antigénicos crudos de: T. cruzi (Tc) y O. gutturosa (Og); albúmina sérica bovina (BSA). a) Gel teñido con negro de amido. b) Autorradiografía del mismo gel.



16



17



18

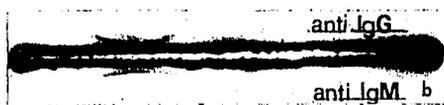


19

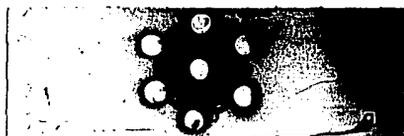
Fig. 20.- Inmunoelectroforesis de una mezcla 1:2 de SP - con suero de cerdo normal (canal) frente a anti IgG de - cerdo (pozo superior) y anti IgM de cerdo (pozo inferior). a) Gel teñido con negro de amido. b) Autorradiografía del gel.

Fig. 21.- Doble inmunodifusión de una mezcla 1:2 de SP - con suero de cerdo normal (pozo central) frente a anti IgA de cerdo (pozos periféricos). a) Gel teñido con - negro de amido. b) Autorradiografía del mismo gel.

20



21



DISCUSION

En este trabajo se estudió la funcionalidad de las células plasmáticas presentes en la respuesta inflamatoria que rodea al cisticerco de la Taenia solium en músculo esquelético de cerdo. Se presentan evidencias que demuestran que al menos una población de estas células plasmáticas están comprometidas en la síntesis de anticuerpos dirigidos en contra de antígenos del parásito. En la etapa evolutiva que cursaban los granulomas estudiados se sintetizaron anticuerpos en contra de antígenos de pared, escólex y fluido vesicular. En particular, se demostró la síntesis de anticuerpos contra antígeno "B" descrito por Guerra y cols. (80).

Los anticuerpos sintetizados eran específicos para el cisticerco puesto que pruebas de IEF y DID, de SP con extractos antigénicos de Onchocerca gutturosa y Trypanosoma cruzi así como con albúmina sérica bovina resultaron negativos. Esto indica que se produce en estímulo antigénico en el microambiente del granuloma. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de una síntesis adicional de inmunoglobulinas inespecíficas, tal y como ocurre en reacciones granulomatosas inducidas por otros parásitos (63, 64). El hallazgo de un efecto mitogénico sobre linfocitos B de ratón presente en extractos crudos del cisticerco de la Taenia solium, parece particularmente ilustrativo a este respecto (66).

Se ha reportado (94) que anticuerpos circulantes de cerdos - infectados con el cisticerco de Taenia solium reaccionan con antígenos de C. tenuicollis, y A. suum. En este trabajo se muestra que dentro de la reacción granulomatosa también se sintetizan anticuerpos contra antígenos compartidos por estos parásitos (Fig. 21a).

En las cápsulas inflamatorias mantenidas in vitro se sintetizan al menos tres clases de inmunoglobulinas porcinas: IgG, IgM e IgA. El posible papel que desempeñen las dos clases con capacidad para fijar complemento, se discutirá más adelante. Granulomas hepáticos aislados de ratones infectados con S. mansoni, sintetizan IgG1 durante la etapa máxima respuesta -- granulomatosa, mientras que granulomas crónicos producen IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA observándose en esta última etapa una disminución en el tamaño del granuloma (63). Adicionalmente, - granulomas a huevecillos de S. japonicum cultivadas in vitro - durante 24 horas, sintetizan y secretan inmunoglobulinas IgG e IgM (64).

La presencia de inmunoglobulinas o anticuerpos en la reacción granulomatosa inducida por el cisticerco de la Taenia solium puede tener múltiples significados. Por un lado, los anticuerpos al reaccionar con los antígenos forman complejos inmunes

los cuales pueden dar lugar a la liberación de factores - quimiotácticos para eosinófilos y neutrófilos: si los complejos inmunes activan complemento por vía clásica o alterna, los factores quimiotácticos C5a y C567 son liberados (95-97). Es muy factible que este fenómeno ocurra en la - reacción inflamatoria puesto que hemos demostrado que las clases IgG e IgM son sintetizadas (Fig. 20) y que ocurre - fijación de C3 en el granuloma (Fig. 11). También es posi- ble que en la reacción granulomatosa se libere el precursor quimiotáctico para eosinófilos (ECF-P), que es secretado - por linfocitos en presencia de antígenos, pero que necesita reaccionar con el complejo Ag-Ac homólogo para transformarse en un activo factor quimiotáctico para eosinófilos (98). Las observaciones de una gran riqueza de eosinófilos en el granu- loma por cisticercos de T. solium (44) son consistentes con la participación de los complejos antígeno-anticuerpo en la -- atracción de granulocitos. Es posible que reacciones inmunoló- gicas diferentes a la formación de complejos Ag-Ac conduzcan a la liberación de otros factores quimiotácticos, tal como suce- de en granulomas inducidos por otros parásitos (64,54).

Por otra parte la presencia de anticuerpos en la reacción - inflamatoria podría promover la captación de antígenos para- sitarios mediada por receptores Fc y C3 presentes en macró-

fagos y eosinófilos, dando lugar a la formación de complejos insolubles Ag-Ac. Se ha reportado que los complejos insolubles Ag-Ac favorecen la permanencia de la respuesta inflamatoria granulomatosa (99). Esto está de acuerdo con el hecho de que el cisticerco de la T. solium, sobrevive en su huésped por períodos prolongados sin sufrir daño aparente, a pesar del abundante infiltrado celular que lo rodea (Fig. 4) (44).

Estas observaciones sugieren fuertemente que los anticuerpos sintetizados dentro del granuloma pueden funcionar como moduladores locales de la reacción granulomatosa. Por un lado los eosinófilos y otras células (macrófagos, neutrófilos, etc) son atraídos a la cercanía del parásito y por otro son impedidos para realizar su función efectora. Ya ha sido evidenciado en otros granulomas que simultáneamente con la producción de anticuerpos locales, ocurren cambios dramáticos en el infiltrado (63).

La observación de que sólo es posible detectar anticuerpos en un 30% de los sueros de cerdos masivamente infectados (100), hace pensar que los granulomas podrían funcionar como ganglios linfáticos ectópicos. De este modo una parte importante de la síntesis total de anticuerpos se efectuaría en

las cercanías del parásito. Si éste secreta suficiente cantidad de antígeno, todos los anticuerpos podrían ser bloqueados y/o precipitados en forma de complejos Ag-Ac y eliminados localmente, posiblemente por macrófagos presentes en esa región (Fig. 11b).

Un hallazgo especialmente interesante, en vista de las propiedades de fibronectina propuestas para el antígeno B (80), es la detección de C3 de cerdo asociado al tejido conectivo de la reacción inflamatoria. Se ha propuesto que el antígeno B es secretado por el parásito y que al fijarse en el tejido conectivo de la respuesta inflamatoria desvía la acción de anticuerpos específicos. La formación de complejos B-anti B localizados en el tejido conectivo del huésped evitarían que la fijación de complemento dañara el cisticerco (101). La demostración de síntesis de anticuerpos anti-B en el granuloma (Fig. 19) parece reforzar la anterior hipótesis propuesta como un mecanismo que permite la evasión del parásito a la respuesta inmune del huésped. Cabe mencionar que un parásito tan complejo como el cisticerco puede manejar más de un mecanismo evasor simultáneamente.

Finalmente creemos que es necesario realizar un estudio sis-

temático acerca de la dinámica del recambio y la función de cada uno de los tipos celulares presentes en la reacción -- inflamatoria para relacionarlo dentro de lo posible con el estado inmune del huésped. Estos estudios pueden ser deci-- sivos para comprender la evolución temporal de esta reac -- ción tisular tan compleja. Para ello es muy deseable contar con un modelo experimental que permita analizar a fondo es-- te fenómeno.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Faust, E.C., Russel, P.P. y Jung, R.C.: Parasitología Clínica. 8a edición. Editorial, Salvat. Barcelona España. p.530-535, 1974.
- 2.- Márquez-Monter, H.: "Cisticercosis". In Pathology of helminthic and protozoal disease of man. The Williams and Willkins Co. 30:596-617, 1971.
- 3.- Biagi, F.: Enfermedades parasitarias. La prensa médica mexicana. p.203-211, 1974.
- 4.- Nieto D.: Historical notes on Cysticercosis. In, Cysticercosis. Presente state of Knowledge and perspectives. (A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, - C. Ridaura and F. Beltrán, eds.). Academic Press, N.Y. 1982.
- 5.- Laclette, J.P., Ornelas, Y., Merchant, M.T. and Willms, K.: Ultrastructure of the surrounding envelopes of - - Taenia solium eggs. In, Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives. (A. Flisser, K. Willms, - J.P. Laclette, C. Ridaura and F. Beltrán eds.), Academic Press, N.Y., 1982.

- 6.- Beldin, D.L.: Text book of Parasitology: The class -
cestoidea. 3th. edition. Appleton Century Crofts. N.Y.
564-617, 1965.
- 7.- Schettino, P.M. y de Haro, I.: Manual de técnicas para
el diagnóstico morfológico de las parasitosis. la --
edición Fco. Méndez Cervantes, ed., México, 1980.
- 8.- Afshar, A.: Cysticercosis in Iran. Ann. Trop. Med. Pa-
rasitol. 61:101-103, 1967.
- 9.- Matheu, L.T.: La cisticercosis en el país: valor de una
reacción de precipitación para el diagnóstico de la cis-
ticerccosis cerebral. Arch. Col. Med., El Salvador, 14:
101, 1961.
- 10.- Schenone, H., Ramírez, R. y Rojas A.: Aspectos epide -
miológicos de la reuocisticercosis en América Latina.
Bol. Chileno Parasitol. 28:61-72, 1973.
- 11.- Desowitz, R.S., Margono, S., Sutjahyo, S. and Simanju
niak, G.: Observations on the aplicacion of counterim
munoelctrophoresis for the seroepidemiology of human
cysticercosis. Southeast Asian. J. Trop. Med. Pub. Hlth.
8: 303-306, 1977.
- 12.- Hausman, R., Yoe, T.L. and Fossen, A.: A case of cysti-

- cercosis with some notes on taeniasis in Indonesia. -
Docum. Nederl. Indon. Morb. Trop. 21:59, 1950.
- 13.- Mazotti, L.: Incidencia de Cysticercus cellulosae en -
cerdos de diferentes localidades de la república mexicana.
Rev. Ins. Salub. Enferm. Trop. 14: 53-56, 1954.
- 14.- Hernández, C., Ramos, M.C. y Téllez, G.: Investigación
de la cisticercosis porcina en San Luis Potosi, México.
Bol. Ofic. Panamer. 61:430-432, 1966.
- 15.- Carrasco J.: La cisticercosis porcina en el estado de
Sonora. Sal. Pub. Méx. 19:255-251, 1977.
- 16.- Flisser, A.: Inmunología en la cisticercosis. Curso de
actualización en inmunoparasitología veterinaria. Memo-
rias. F.M.V.Z., U.N.A.M., México, D. F., 1980.
- 17.- Peña, F.O.: Incidencia de Cysticercus cellulosae en -
cerdos de engorda en La Piedad, Michoacán. Tesis profe-
sional, F.M.V.Z., U.N.A.M., México, 1976.
- 18.- Garcés, C.F.: La cisticercosis porcina como problema -
de salud pública en el municipio de Jojutla, Morelos y
zonas aledañas. Tesis Profesional, F.M.V.Z., U.N.A.M.,
México, 1977.

- 19.- Luna, V.S.: La cisticercosis porcina como principal - causa de decomiso en 9 rastros del Estado de México. Tesis Profesional, F.M.V.Z., U.N.A.M., México, 1976.
- 20.- Martínez, R.G.: Contribución al estudio de la incidencia de la cisticercosis en cerdos sacrificados en el - rastro municipal de Celaya, Guanajuato del mes de junio de 1972 al mes de abril de 1973. Su importancia económica en la industria de la porcicultura y bases para su control. Tesis profesional, F.M.V.Z., U.N.A.M., México, 1974.
- 21.- Aluja, A.S.: Frequency of porcine cysticercosis in Mexico. In, Cysticercosis, Present state of knowledge and perspectives (A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura and F. Beltrán, eds.) Academic Press, N.Y., - 1982.
- 22.- Acevedo, H.A.: Economic impact of porcine cysticercosis. In, Cysticercosis, Present state of knowledge and perspectives (A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura and F. Beltrán, eds.) Academic Press, N. Y., - 1982.
- 23.- Ugalde, A.: Cisticercosis cerebral generalizada. Rev. Med. Hosp. Gen., México, 1:5, 1938.

- 24.- Macias, S.R. y Ordóñez, S.: Cisticercosis cerebral. - Diagnóstico clínico, radiológico y de laboratorio. Pronóstico. Análisis de 186 casos. Prensa Med. Méx. 35: 6-14, 1970.
- 25.- Lombardo, L., Mateos, J.H. y Estañol, B.: La cisticercosis cerebral en México. Rev. Med. Hosp. Gen., México, - 118 : 1-16, 1982.
- 26.- Robles, C.: Consideraciones acerca de 100 casos de tumor cerebral operados. Prensa Med. Méx. 6:67-78, 1944.
- 27.- Costero, I: Tratado de anatomía patológica. México. Ed. Atlante, S. A. Vol. 2 p.1485, 1946.
- 28.- Briceño, C.E., Biagi, F. y Martínez, B.: Cisticercosis. Observaciones sobre 97 casos de autopsia. Prensa Med. - Méx. 26:193, 1961.
- 29.- Macias, V. y Maqueo, M.: Cisticercosis cerebral. Rev. - Invest. Clin. 10: 443-454, 1954.
- 30.- Flisser, A.: Inmunología de la cisticercosis humana. Tesis doctoral, Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., México, 1977.
- 31.- Woodhouse, E., Flisser, A. and Larralde, C.: Seroepide-

- miology of human cysticercosis in México. In, Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives. (A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Radau ra and F. Beltrán, eds.) Academic Press, N.Y., 1982.
- 32.- Goldsmith, R.S., Kagan, I.G., Reyes- González, M.A. y - Ferreira, J.: Estudios seroepidemiológicos realizados en Oaxaca, México. 1.- Encuesta de anticuerpos parasitarios mediante la prueba de hemaglutinación indirecta. Bol. Of. Sanit. Panamer. 69:500-518, 1971.
- 33.- Flisser, A., Bulnes, I., Díaz M.L., Luna R., Woodhouse, E., Beltrán, F., Martínez, I. y Larralde, C.: Estudio - seroepidemiológico de la cisticercosis humana en poblaciones predominantemente indígenas y rurales del estado de Chiapas. Arch. Invest. Med. 7: 107-113, 1976.
- 34.- Arias, L.: Búsqueda de parásitos intestinales y de anticuerpos en contra de C. cellulosa en Jesús María, Jalisco. Tesis profesional. F.Q. U.A.G., Guadalajara, Jal. - México. 1980.
- 35.- Biagi, F.: Epidemiología en México. Gaceta Med. Méx. - 103: 227-230, 1972.
- 36.- Forbus, W.D.: Granulomatous inflammation: A. clinical - and pathological challenge. Amer. J. clin. Path. 25: 927, 1955.

- 37.- Shelley, W.B. and Hurley, H.G.: The allergic origin of -
zirconium deodorant granulomas. Br. J. Derm. 70:75, 1958.
- 38.- Adams, D.O.: The granulomatous inflammatory process. A -
review. Am. J. Path., 79:164, 1976.
- 39.- Adams, D.O.: The granulomatous inflammatory response. -
Am. J. Path. 84:164-191, 1976.
- 40.- Pérez-Tamayo, R.: Infiltrado inflamatorio crónico. - - -
Patologfa. 19:109-119, 1981.
- 41.- Epstein, W.L.: Granulomatous hypersensitivity. Progr. -
Allergy. 11: 36-88, 1967.
- 42.- Warren, K.S.: A funcional classification of granuloma-
tous inflammation. Ann. N.Y. Acad. Sci. 278:7, 1976.
- 43.- Black, M.M. and Wagner, B.M.: Dynamic pathology p. 121
(Morsby, St. Louis, L.V. eds), 1964.
- 44.- Willms, K. and Merchant, M.T.: The inflammatory reaction
surrounding Taenia solium larvae in pig muscle: Ultra-
structural and light microscopic observations. Parasite -
Immunol. 2: 261-275, 1980.

- 45.- Robles, C.: Consideraciones acerca de la cisticercosis cerebral. Rev. Med. del Hosp. Gen., México, 9:3, 1943.
- 46.- León Chapa, S.: Hipersensibilidad celular en cisticercosis experimental. Tesis profesional F.Q., U.N.A.M., México, 1981.
- 47.- Boros, D.L., Pelley, R.P. and Warren, K.S.: Spontaneous modulation of granulomatous hipersensitivity in Schistosomiasis mansoni. J. Immunol. 114: 1437-1441, 1975.
- 48.- Olds, R. and Mahmoud, A.: Kinetics and mechanisms of pulmonary granuloma formation around Schistosoma japonicum eggs injected into mice. Cell. Immunol. 60: 251-260, 1981.
- 49.- Tsuda, T., Dannenberg, A.M., Ando, M. and Corrin, A.R.: Mononuclear cell turnover in chronic infection. Studies in tritiated thymidine-labelled cells in blood, tuberculin traps and dermal BCG lesions of rabbits. Am. J. Path. 83:255, 1976.
- 50.- Boros, D.L. and Warren, K.S.: The bentonite granuloma. Characterization of a model system for infectious and foreign body granulomatous inflammation using soluble mycobacterial, histoplasma and schistosoma antigens. Immunol. 24:511, 1973.

- 51.- Fink, J.N., Hensley, G.T. and Barboriak, J.J.: An animal model of hypersensitivity pneumonitis. *J. Allergy* 46: 156, 1970.
- 52.- Ryan, G.B. and Spector, W.G.: Natural selection of long-lived macrophages in experimental granulomata. *J. Pathol.* 99: 139, 1969.
- 53.- Moore, D.L., Grove, D.I. and Warren, K.S.: The Schistosoma mansoni egg granuloma: Quantitation of cell populations. *J. Pathol.* 121:41-50, 1976.
- 54.- James, S.L. and Colley, D.G.: Eosinophils and immune mechanisms production of the lymphokine eosinophil stimulation promoter (ESP) in vitro by isolated intact granulomas. *J. Reticuloendothel. Soc.* 18:283, 1975.
- 55.- Cohen, S. and Ward, P.A.: In vitro and in vivo activity - of a lymphocyte and immune complex dependent chemotactic factor for eosinophil. *J. Exp. Med.* 133: 133-146, 1971.
- 56.- Turner, M.X., Speirs, R.S. and McLaughlin, J.A.: Effect of primary injection site upon cellular and antitoxin response to subsequent challenging injection. *Proc. Soc. - Exp. Biol. Med.* 129:738, 1968.
- 57.- Chensue, S.W. and Boros, D.L.: Population dynamics of T and B lymphocytes in the lymphoid organs, circulation -

- and granulomas of mice infected with S. mansoni. Am. J. Trop. Med. Hyg. 28: 291-299, 1979.
- 58.- Stenger, R.J., Warren, K.S. and Johnson, A.: An ultrastructural study of hepatic granulomas and schistosome egg shells in murine hepatosplenic schistosomiasis man soni. Exp. Mol. Pathol. 7: 116-132, 1967.
- 59.- Chacon, A., Gaytan, E. y de León, B.: Cisticercosis subcutánea. Informe de 8 casos en niños. Bol. Med. Hosp. - Inf. México. 22: 1115-1122, 1975.
- 60.- Márquez-Monter, H.: Patología de la cisticercosis. Gaceta Med. Méx. 103: 230-240, 1972.
- 61.- Wilber, R.R., King E.B. and Howes, E.L.: Cerebrospinal fluid citology in five patients with cerebral cysticercosis. Act. Cytol. J. 24: 421-426, 1980.
- 62.- Lai A Fat, R.F.M., Chan Pin Jin, J., Diesselhoffden, H. and van Furth, T: In vitro synthesis of humoral factors (immunoglobulins and complement) in lesional skin of leprosy patients. Infect. Immun. 25: 891-895, 1979.
- 63.- Boros, D.L., Amsden, A.F. and Hood, A.: Modulation of granulomatous hypersensitivity. IV Immunoglobulin and antibody production by vigorous and immunomodulated liver granulomas of S. mansoni infected mice. J. Immunol. -

128: 1050-1053, 1982.

- 64.- Garb, K.S., Stavitsky, A.B. and Mahmoud, A.F.: Dynamics of antigen and mitogen-induced responses in murine schistosomiasis japonica: In vitro comparison between hepatic granulomas and splenic cells. J. Immunol. 127: 155-120, 1981.
- 65.- Lai A Fat, R., Chan Pin Jin, J., van Furth, R. and - - Harboe, M: In vitro synthesis of anti-mycobacterial antibodies in biopsies from skin lesions of leprosy patients. Infect. Immun. 27: 297-301, 1980.
- 66.- Sealy, M.A.: Respuesta inmune a antígenos de Cysticercus cellulosae. Tesis de maestria. Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., México, 1980.
- 67.- Escobar, A.: Cerebral cysticercosis. New Engl. J. Med. 298: 403-404, 1978.
- 68.- Damian, R.T.: Molecular mimicry in biological adaptation. In: Host-parasite interfaces (Brent B. Nickol Ed.) Academic, Press. N.Y., P: 103-126, 1979.
- 69.- Willms, K., and Arcos, L.: Taenia solium: Host serum proteins on the Cysticercus surface indentified by an ultrastructural immunoenzyme technique. Exp. Parasitol. 43: 396-406, 1977.

- 70.- Husted, S.T. and Williams, J.F: Permeability studies - on taeniid metacestodes: 1.-Uptake of proteins by larval stages of Taenia taeniaeformis, T. crassiceps and E. granulosus. J. Parasitol. 63: 314-321, 1977.
- 71.- Varela-Díaz, V.M., and Coltorti, E.A.: The presence of - host immunoglobulins on hydatid cysts membranes. J. Parasitol. 59: 484-488, 1973.
- 72.- Kemp, W.M., Merriti, S.C. and Rosier, J.G.: Schistosoma mansoni: Identification of immunoglobulins associated - with the tegument of adult parasites from mice. Exp. - Parasitol. 45: 85-87, 1978.
- 73.- Clegg, J.A., Smithers, S.R. and Terry, R.J.: Acquisition of human antigens by S. mansoni during cultivation in vitro. Nature, 232: 653-654, 1971.
- 74.- Flisser, A., Tarrab, R. Willms, K. y Larralde, C.: Inmuno-electroforesis y doble inmunodifusion en el diagnóstico de la cisticercosis cerebral humana. Arch. Invest. Med., México, 6: 1-12, 1975.
- 75.- Beltrán, F. y Gómez-Priego, A.: Evaluación de contraínmuno-electroforesis (CIEF) para la detección de anticuerpos en la cisticercosis experimental y humana. Antioquia Med. 23: 472-473, 1973.

- 76.- Biagi, F., Navarrete, F., Piña, A., Santiago, A.M. y Tapia, L.: Estudio de 3 reacciones serológicas en el diagnóstico de la cisticercosis. Rev. Med. Hosp. Gen., México. 25: 501-508, 1961.
- 77.- Nieto, D.: Cysticercosis of the nervous system. Diagnosis by means of the spinal fluid complement fixation test. Neurol. 6: 725-738, 1956.
- 78.- Ridzewski, A.K.: Comparison of serologic tests for human cysticercosis by indirect hemagglutination, indirect immunofluorescent antibody, and agar gel precipitin test. J. Parasitol. 61: 154-155, 1975.
- 79.- González-Barranco, D., Sandoval, I.M. y Trujillo, V.M.: Reacción de inmunofluorescencia indirecta en cisticercosis. Arch. Invest. Med., México, 9: 51-58, 1978.
- 80.- Guerra, G., Flisser, A., Cañedo, L. and Laclette, J.P.: Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of Taenia solium. In: Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives. (A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Ridaura, C. Larralde and F. Beltrán, eds). Academic Press, N.Y., 1982.
- 81.- Lowry, O.H., Rosebrough, H.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent.

- J. Biol. Chem. 193: 265-275, 1951.
- 82.- Nowotny, A.: Basic exercises in immunochemistry. Exercise No. 4, pp. 10, 1969.
- 83.- Reif, A.E.: Batch preparation of rabbit gamma-globulin - with DEAE-celulose. Immunochemistry, 6: 723-731, 1969.
- 84.- Weber, K. and Osborn, M.: The reability of molecular - weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244: 4406-4412, - 1969.
- 85.- Rinderknecht, H.: Ultra-rapid fluorescent labelling of proteins. Nature 193: 167-8, 1962.
- 86.- Wells, A.F., Miller, C. and Nadel, M.K.: Rapid fluorescein and protein assay method for fluorescent-antibody conjugates. App. Microbiol. 14: 271-75, 1966.
- 87.- Marshall, J.D. Eveland, W.C., and Smith, C.W.: Superiority of fluorescein isothiocyanate (Riggs) for fluorescent antibody technic with a modification of its application. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 98: 898-900, 1958.
- 88.- Coons, A.H. and Kaplan, M.H.: Localization of antigen in tissue cells. II.- Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J. -

Exp. Med. 91:1-13, 1950.

- 89.- Hijmans, W., Schuit, H.R.E. and Klein, F.: An immunofluorescence procedure for the detection of intracellular immunoglobulins. Clin. Exp. Immunol. 4: 457-472, - 1969.
- 90.- Weller, T.H. and Coons, A.H.: Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 86:789-794, 1954.
- 91.- Hochwald, G.M., Thorbecke, G.J. and Asofsky, R.: A new technique for the demonstration of the synthesis of individual serum proteins by tissues in vitro. J. exp. Med. 114: 459, 1961.
- 92.- Garvey, J.S., Cremer, N.E. and Sussdorf, D.H.: Methods in Immunology. 3er. ed., W.A. Benjamin Inc., Massachusetts. p. 313-321, 1977.
- 93.- Ouchterlony, O., and Nilsson, L.A.: Immunodiffusion and immunoelectroforesis. In: Handbook of Experimental Immunology. Cap. 9, (Weir D.M., ed.) Blackwell, 1973.
- 94.- Guevara, M.S.: Determinación de reacciones cruzadas entre Cysticercus cellulosae y Cysticercus tenuicollis - mediante pruebas de doble inmunodifusión e inmunoelec

- troforesis. Tesis profesional. F.M.V.Z., U.N.A.M. México, 1981.
- 95.- Kay, A.B., Shin, H.S., and Austen, K.F.: Selective attraction of eosinophils and synergism between eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis (ECF-A) and a fragment - cleaved from the fifth component of complement C5a. Immunol. 24: 969-976, 1973.
- 96.- Ward, P.A.: Chemotaxis of human eosinophils. Am. J. Path. 54: 121-128, 1969.
- 97.- Lachmann, P.J., Kay, A.B. and Thompson, R.A.: The chemotactic activity for neutrophil and eosinophil leucocytes of the trimolecular complex of the fifth, sixth, and - seventh components of human complement (C567) prepared - in free solution by the "Reactive lysis" procedure. Immunol. 19: 895-899, 1970.
- 98.- Torisu, M., Yoshida, T. Ward, P.A. and Cohen, S.: Lymphocyte derived eosinophil chemotactic factor. II studies - on the mechanism of activation of the precursor substance by immune complexes. J. Immunol. 111: 1450-1458, 1973.
- 99.- Spector, G. and Hessom, N.: The production of granulomata by antigen-antibody complexes. J. Pathol. 98: 31, 1969.
- 100.- Gutiérrez, R., Flisser, A. and Willms, K.: Immunity to -

Taenia solium larvae in pigs with massive cysticercosis.
sométido a Veterinary Immunology and Immunopathology.

- 101.- Plancarte, A., Flisser, A. and Larralde, C.: Fibronectin like properties of antigen B from cisticerci of Taenia solium. In, Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives. (A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Ridaura, Larralde, C. and F. Beltrán, eds.) Academic Press, N.Y., 1982.
- 102.- Stecher, V.J., Jacobson, E.B. and Thorbecke, G.J.: Formation of β 1C by peritoneal macrophages. Fed. Proc., 24: 447 (abstr.), 1965.
- 103.- Bustamante, S.M.Z. Comunicación Personal. Tesis en preparación F.M.V.Z., U.N.A.M. 1982.