



Escuela: Químico Farmacéutico Biólogo
con estudios incorporados a la
U. N. A. M.

Obtención de Antígenos de *Cysticercus*
Cellulosae por Fraccionamiento en
Columna y su comportamiento en
diferentes pruebas serológicas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

Que para obtener el título de
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
p r e s e n t a :

Laura Delta González Morales



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.

OBTENCION DE ANTIGENOS DE CYSTICERCUS GELLULOSAE POR FRACCIONAMIENTO EN COLUMNA Y SU COMPORTAMIENTO EN DIFERENTES PRUEBAS SEROLOGICAS.

INDICE

- CAPITULO I. 1.- OBJETIVO.
 2.- INTRODUCCION.
 3.- GENERALIDADES.
 4.- INMUNIDAD A LA CISTICERCOSIS.
- CAPITULO II. MATERIAL Y METODOS.
 1.- DIAGRAMA.
 2.- OBTENCION DE ANTIGENOS.
 2.1 EXTRACCION DE CISTICERCOS.
 2.2 ELABORACION DE ANTIGENOS.
 3.- ANALISIS QUIMICO DE LOS ANTIGENOS.
 3.1 PROTEINAS.
 3.2 CARBOHIDRATOS.
 4.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD INMUNOLOGICA: I.D.; I.E.; C.I.E.F.
 5.- PRECIPITACION DE PROTEINAS CON SULFATO DE AMONIO.
 6.- FRACCIONAMIENTO EN COLUMNA.
 7.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD INMUNOGENICA: INMUNIDAD HUMORAL.
- CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSION.
- CAPITULO IV. RESUMEN Y CONCLUSIONES.
- CAPITULO V. BIBLIOGRAFIA.

CAPITULO I.

1.- OBJETIVO.

Aislar la fracción antigénicamente más reactiva a partir de diferentes antígenos crudos de cisticercos.

Demostrar que la falta de reactividad en las pruebas serológicas se debe a la utilización de extractos crudos.

El fraccionamiento de los extractos crudos, proporcionará antígenos con cierta pureza que podrán ser utilizados para el diagnóstico, ya que con ello se eliminarán ciertas -- reacciones cruzadas (inespecíficas) y se obtendrá una mayor -- especificidad en las mismas.

2.- INTRODUCCION.

La cisticercosis humana, es una parasitosis común - en México y en diferentes partes del mundo donde la miseria e ignorancia son frecuentes y las condiciones higiénico-sanitarias deficientes, características especialmente trascendentes en aquellos países subdesarrollados, por lo que este padecimiento representa un serio problema médico, veterinario, sanitario y económico.

La cisticercosis humana es una parasitosis producida por Cysticercus cellulosae, estado larvario de Taenia solium, parásito de distribución cosmopolita que generalmente parasita al hombre, siendo el cerdo el huésped intermediario habitual.

La incidencia de parasitismo en cerdos no es paralela a la frecuencia de cisticercosis humana según los estudios hechos por Biagi (5) y Mazotti (42), quienes proponen las temperaturas de congelación y la fritura de la carne como medios profilácticos para la destrucción de los cisticercos y eliminar esta fuente de infección.

En la actualidad, la cisticercosis humana es una enfermedad importante por la severidad de sus manifestaciones clínicas y por su frecuencia en México y en varios países La-

tinoamericanos así como en España, India, Pakistán, Polonia, Rumania, China, Nueva Guinea y Africa, donde se han desarrollado numerosos trabajos que han reportado diferentes aspectos del padecimiento, tanto humano como porcino.

Debido a que la localización del parásito en el huésped es variada, la frecuencia real con que se presenta la cisticercosis humana se desconoce, ya que el padecimiento puede cursar de manera asintomática y pasar inadvertido cuando la localización es en tejido muscular o la técnica utilizada para el diagnóstico es poco sensible. El diagnóstico etiológico, en muchos casos, sólo puede efectuarse quirúrgicamente lo cual resulta peligroso para los pacientes con cisticercosis cerebral, por lo que en ocasiones la enfermedad solo es confirmada en la autopsia, lo que plantea la necesidad de disponer con pruebas serológicas altamente eficientes para el diagnóstico.

En un estudio seroepidemiológico realizado en 1980 por Flisser (18), utilizando la inmunoelectroforesis como prueba en 18,471 sueros del Centro Médico Nacional provenientes de una población clínicamente sana de diferentes Estados de la República Mexicana seleccionada al azar observó que el 1% de la población en general presenta anticuerpos anticisticercosis donde el 6% de positividad corresponde a la zona del Ba

jfo. Sin embargo, al probar esta técnica en sueros provenientes de cisticercos comprobados encontré que el 40 % de los pacientes no presentan anticuerpos precipitantes, lo que --- vuelve dudosos estos resultados. (20)

Goldsmith y cols. (26) en 1971 utilizando la prueba de hemaglutinación indirecta, en el Estado de Oaxaca, encontraron una frecuencia de anticuerpos contra Cysticercus cellulosae del 3.8 %.

La cisticercosis humana como causa de muerte ha llevado a estudios anatomopatológicos con reportes de frecuencia; en 1946 Costero (14) reportó un 3.6% de cisticercosis cerebral en el Hospital General (SSA), en 1961 Briceño (9) reporta el 3.5%, en 1965 y 1966 Zenteno (73,76) el 3.0%, en 1971 Albores (2) encuentra en 9,412 autopsias una frecuencia de cisticercosis como causa de muerte de 1.3%, en 1972 y 1979 Rabiela (53, 54) encuentra el 3.2%, por lo tanto se puede deducir que de cada 100 individuos que mueren en diferentes instituciones de salud en México, aproximadamente el 3% es debido a cisticercosis cerebral.

En 1944 Robles (56) reporta que la frecuencia de cisticercosis del Sistema Nervioso Central demostrada quirúrgicamente es del 25%, Lombardo en 1961 encuentra el 35% y en 1980 el 28.3% en 516 intervenciones quirúrgicas en el Hospi---

tal General de México (36,38).

Con estos datos nos damos una idea sobre la frecuencia con que se presenta este padecimiento y la magnitud del problema tanto en salud pública como desde el punto de vista económico, si se toma en consideración el caso de la cisticercosis porcina.

La incidencia de Cysticercus cellulosae en cerdos, es señalada por Mazzotti en 1954 en un estudio realizado en diversas ciudades de la República Mexicana, reportando 12.1% en León, Gto. y un 0.3% en Villahermosa, Tab. y Tampico, Tams. (43); en 1966 Hernández (32) realizó una investigación en San Luis Potosí detectando una incidencia del 4.6% y en 1977 Carrasco (12), en el Estado de Sonora, obtiene una tasa de prevalencia de cisticercosis porcina de 0.54%.

En 1980 y 1981, el promedio de cerdos sacrificados con Cysticercus cellulosae fué del 1.55% en 29 rastros de la República Mexicana (1); posiblemente este porcentaje sea mayor, ya que en muchos casos la inspección sanitaria no llega, como es el caso de las zonas rurales donde los cerdos son criados en granjas familiares aumentando el consumo de carne parasitada. Carrasco (12) menciona que los cerdos criados a nivel industrial no tienen cisticercosis y a nivel doméstico, en la mayoría de los casos, el hombre cría a sus cerdos ali-

mentándolos a base de desperdicios o de los desechos de las cosechas y, que por lo general, los animales no son confinados en locales adecuados dejándolos en libertad para alimentarse de otros alimentos incluyendo el excremento humano.

3.- GENERALIDADES.

La incidencia de teniasis en México varía desde no detectable hasta un 4.5% (16) de la población según el área. Se adquiere por la ingestión de carne de cerdo parasitada con Cysticercus cellulosae o carne de res con Cysticercus bovis. La larva se libera y en la porción superior del intestino delgado, donde vive adherida, se enrolla hacia adelante y atrás alcanzando una longitud de 2 a 7 m. en un lapso de 5 a 12 semanas en que evoluciona el parásito a su fase adulta.

Al igual que el cerdo, el hombre puede adquirir cisticercosis, pero el hombre es el único huésped que puede alojar adultos de Taenia solium, especie conocida como "tenia del cerdo o solitaria" que, como todas las tenias, está formada por tres regiones:



ESCOLEX

1). ESCOLEX. Generalmente cuadrangular de aproximadamente 1 mm. de diámetro, tiene 4 ventosas en forma de copa de 0.5 mm. de diámetro y un róstelo circular que posee una doble corona de ganchos alternándose grandes (160-180 μ) y pequeños (110-140 μ) en número de 22 a 32 (15).

2). CUELLO. Región no segmentada que se encuentra a continuación del escólex, es corta y de sólo la mitad de ancho de éste, en su porción distal van formándose los proglótidos por un proceso de proliferación.

3). ESTROBILO. Está constituido por aproximadamente 1000 proglótidos; los más cercanos al cuello llamados proglótidos inmaduros, son finos y sólo presentan los rudimentos de los órganos genitales en desarrollo, son más anchos que largos; hacia la parte media se encuentran los anillos sexuales o proglótidos maduros, contienen los órganos genitales masculinos y femeninos, son casi cuadrangulares; al final del estróbilo se encuentran los proglótidos grávidos cuyo parénquima está ocupado en su mayor parte por el saco uterino repleto de huevos, son más largos que anchos (15). Estos proglótidos grávidos terminales (16-20 mm.), se separan del estróbilo y se expulsan con las heces.

PROGLOTIDO



Los huevos escapan del útero antes o después de que los proglótidos se liberen, son de forma esférica de 31 a 43 de diámetro y color pálido. Tienen una cápsula gruesa -- formada por muchos prismas truncados unidos entre sí (estriación radial) y, está provista de una membrana externa delgada hialina de origen embrionario. Dentro de la cápsula se encuentra el embrión u oncosfera completamente desarrollado que con tiene tres pares de ganchos (embrión hexacanto).



Huevo de Taenia solium.

Los huevos o los proglótidos grávidos son depositados junto con las materias fecales en el suelo y pueden permanecer viables por muchas semanas; al ser ingeridos por el cerdo o el hombre y raramente por otros mamíferos (41,44) llegan al duodeno o yeyuno donde se desintegra el embrióforo en 24 a 72 horas. La eclosión de estos huevos solo se produce si están en contacto inicialmente con el jugo gástrico y posteriormente con el jugo intestinal.

Las oncosferas resultantes penetran la pared intestinal ayudadas por sus ganchos y secreciones líticas hasta alcanzar las venas mesentéricas de donde son transportadas a to

do el cuerpo, infiltrándose, característicamente, entre los músculos, de 60 a 70 días después se transforman en cisticercos, que es el estado larvario.



CISTICERCO.

El cisticerco, comúnmente conocido como: granillo, tlasehuate, alfilerillo, zahuate, tomatillo, ledilla, sapo, - liendrilla, granizo o gusano vesiculoso de la carne de cerdo; son vesículas ovoidales casi esféricas de aproximadamente 5 mm. de ancho por 8 a 10 mm. de largo, de color blanco lechoso o rosado, con una pequeña porción invaginada dentro de la vesícula que corresponde al escólex de la futura tenia.

Un paciente puede albergar más de un adulto aunque generalmente solo existe uno. Los gusanos pueden vivir hasta 25 años o más y son resistentes al tratamiento, Taenia solium y Taenia saginata pueden infectar a un paciente de manera simultánea (15).

La carne de cerdo infectada con Cysticercus cellulo

que mal cocida o congelada inadecuadamente es la única fuente para que el hombre desarrolle el adulto de Taenia solium.

La cisticercosis en el hombre es producida por el estado larvario de Taenia solium, Cysticercus cellulosae, y se le ha encontrado prácticamente en todos los órganos y tejidos del cuerpo humano; pero más frecuentemente en sistema nervioso central, tejido celular subcutáneo, ojo y con menor frecuencia en músculos, corazón, hígado, pulmones y cavidad abdominal (15).

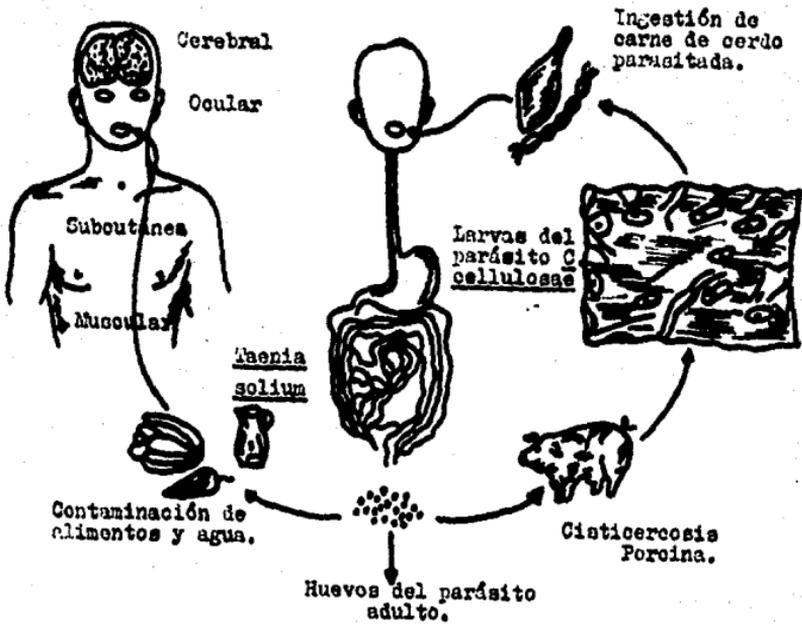
Los mecanismos de transmisión para el desarrollo de la cisticercosis son las siguientes: Figura 1

- a). Heteroinfección. Ingestión de huevos de Taenia solium presentes en alimentos o agua contaminada con materia fecal.
- b). Autoinfección interna. Se presenta cuando el peristaltismo intestinal está alterado (antiperistaltismo) y los huevos que salen del proglótido grávido son arrastrados al tubo digestivo alto donde eclosionan. (61)
- c). Autoinfección externa. Se presenta en aquellos individuos con hábitos higiénicos deficientes y que alojan el adulto en el intestino, estableciéndose el ciclo mano-ano-mano-boca.

En los casos anteriores la eclosión de los huevos, la migración del embrión y el establecimiento final en órganos y tejidos, originan la cisticercosis.

FIGURA 1

Cisticercosis Humana



En los tejidos, la presencia de la larva en crecimiento inicia una secuencia típica de reacciones celulares lo cales: infiltración de neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, células plasmáticas y a veces células gigantes, seguidas por fibrosis y necrosis de la cápsula, con desintegración o calcificación eventual de la larva (75).

Durante el período en que la larva permanece viva, dependiendo de su localización, se pueden presentar algunas molestias mínimas, pero al morir el cisticerco, ocurre la reacción hística a su alrededor, produciéndose signos y síntomas que varían según su topografía.

En la cisticercosis ocular los síntomas pueden ser desde simples molestias originadas por las sombras producidas por la larva frente a la retina, hasta determinar uveítis, -- irítis, retinitis, atrofia coroidal, conjuntivitis palpebral o formación de quistes en el embudo muscular del ojo (41). La cisticercosis ocular es reportada con regularidad en países de Europa Oriental, Iberoamérica y la India, se localiza en el humor vítreo y en la cámara anterior, los cisticercos pueden estar invaginados o evaginados y cambiar constantemente de forma, con protusiones y retracciones periódicas del esclélex.

La cisticercosis cerebral (SNC) puede acompañarse -

de síntomas tales como meningoencefalitis, meningitis basal y dos síndromes principales, hipertensión intracraneal y un cuadro psiquiátrico de tipo síndrome orgánico: epilepsia local, epilepsia esencial, hidrocefalia obstructiva intermitente, alteraciones del equilibrio y visuales, hasta llevar a la muerte al paciente. (37,38,49,50,54,74)

Pueden encontrarse cisticercos grandes e irregulares que se desarrollan en ventrículos o en cápsulas quísticas superficiales; estas larvas se denominan Cysticercus racemosus, debido a las lobulaciones que presentan. La fase adulta de esta larva se desconoce, Biagi en 1961 (8), sugiere que esta forma de cisticercos puede provenir de otra especie de tenia o bien que C. racemosus es un C. cellulosae degenerado y establece diferencias morfológicas entre estos dos cisticercos: Cysticercus racemosus, presenta una forma irregular, carece de escólex, la membrana tiene engrosamientos y estrechamientos, presenta lobulaciones y se pueden encontrar vellocidades en la superficie externa; su tamaño va de 5 a 90 mm. de diámetro. Además existen diferencias inmunológicas entre C. racemosus y C. cellulosae.

Sin embargo, la cisticercosis humana también tiene como agente causal al Cysticercus racemosus (72).

El diagnóstico etiológico sólo se establece al lle-

vase a cabo la extirpación de la larva y su examen al microscopio.

Se conocen casos en los que la extirpación quirúrgica de uno o más cisticercos encapsulados en sistema nervioso central determinó una regresión completa y permanente de los síntomas.

La larva puede ser única o múltiple y se han encontrado casos con varias decenas de parásitos.

La presencia de cisticercos en tejido celular subcutáneo o en músculo, debe hacer sospechar firmemente la posibilidad de lesiones cerebrales.

Los métodos radiológicos y la tomografía axial computada han abierto una gran posibilidad en el campo diagnóstico de esta parasitosis, para la localización de los mismos, especialmente en los del sistema nervioso central.

Actualmente la utilización de métodos inmunológicos tienen una indicación definitiva, especialmente en el diagnóstico de la cisticercosis cerebral, a pesar de que estos métodos no han tenido avances importantes en los últimos años.

Existen experiencias donde se reportan las ventajas y desventajas de los métodos de inmunodiagnóstico, iniciados por Nieto en 1948 (48), y seguidas por otros investigadores, (7,34,58); entre las técnicas empleadas se cuentan las de in-

munoprecipitación en tubo (6) y en agar por el método de Cuchterlony (7,19,46,51,52); inmunolectroforesis (19,20,21,46); contraimmunoelectroforesis (67); hemaglutinación indirecta (7, 26,28,50,51,52,69); aglutinación con látex y bentonita (3,27) inmunofluorescencia (55) y más recientemente ELISA (4).

Respecto al tratamiento, se han realizado varios estudios con diferentes drogas antiparasitarias, las cuales están siendo evaluadas en la actualidad.

Son varios los trabajos reportados con diferentes drogas para el tratamiento de la cisticercosis cerebral, en 1959 Gamboa utilizó la Prednisona (24) y en 1960 (25) los corticosteroides, en 1974 (29) González y cols. usaron Metrifonato, Skromne en 1977 (63) usó radionúclidos, en 1981 Botero (10) y Sotelo en 1984 (66) utilizaron Praziquantel y Lombaro en 1981 (36) Flubendazole, los resultados son alentadores, pero el punto más importante en el tratamiento farmacológico de la cisticercosis cerebral es definir la indicación precisa de estos nuevos medicamentos.

4.- INMUNIDAD A LA CISTICERCOSIS.

El mecanismo de inmunidad de los parásitos es muy complejo y poseen múltiples antígenos inductores de respuesta inmunológica tanto humoral como celular.

Debido a esta complejidad antigénica es posible encontrar en un mismo huésped inmunoglobulinas que participan en la protección inmune e inmunoglobulinas cuya actividad se limita a intervenir en las pruebas serológicas sin que confieran protección al huésped, ocasionando reacciones cruzadas o inespecíficas como en el caso de nemátodos, céstodos y tremátodos que comparten antígenos comunes; algunas inmunoglobulinas participan en fenómenos de hipersensibilidad humoral y celular que constituyen un mecanismo de daño, haciendo que la enfermedad pueda resultar de la respuesta inmune frente a los múltiples determinantes antigénicos, sin embargo, es difícil distinguir que inmunoglobulinas inducen respuesta humoral y celular, cuáles dan protección o causan daño al huésped y cuáles poseen escaso o nulo significado clínico, pero que son importantes en el diagnóstico de las parasitosis, sin determinar los mecanismos con que se desarrollan estas respuestas.

Algunas de estas sustancias antigénicas nunca inducen la producción de anticuerpos en infecciones naturales por

que no se ponen en contacto directo con el sistema inmune del huésped, pero están presentes en los extractos antigénicos obtenidos del parásito. (64,65,70)

La respuesta inmunitaria a los céstodos tiene dos modalidades: a) las tenias que habitan en la luz intestinal con un mínimo contacto tisular, al parecer es una infección poco inmunógena y b) el estado larvario que se enquistas en los tejidos, con un contacto tisular íntimo y continuo, induce una fuerte respuesta inmunógena del huésped.

La infestación con céstodos adultos por lo general no amenaza la vida del hombre, sólo cuando éste actúa como huésped intermediario no natural, como sucede, entre otros, en la cisticercosis, que es una parasitosis de residencia tisular en la que es preciso pensar en la participación de procesos inmunológicos tanto humorales como celulares.

Durante su ciclo de vida los helmintos presentan diferentes fases de desarrollo o estadios morfológicos con una estructura antigénica parcial o totalmente diferente produciendo un constante cambio de poder antigénico, lo que obliga a utilizar varias fases de desarrollo para caracterizar los antígenos funcionales y la respuesta inmune, estos antígenos pueden ser componentes somáticos o productos de las excreciones y secreciones; algunos de estos antígenos son muy especí-

ficos del parásito y otros comparten determinantes antigénicos que dan lugar a reacciones cruzadas con distintos parásitos.

Los antígenos de las excreciones y secreciones son particularmente importantes, ya que se producen cuando el parásito se encuentra vivo, están constituidos por productos intermediarios del metabolismo o de otros productos secretorios.

Los antígenos somáticos son componentes morfológicos que funcionan en condiciones naturales, principalmente cuando el parásito reside en los tejidos, los más accesibles al sistema inmune están representados por proteínas y polisacáridos constitutivos de la membrana o pared vesicular en los estados larvales; la sensibilización tiene lugar principalmente en la fase de migración tisular del estado larvario y en algunos casos por estas larvas en migración que mueren en el parénquima de diferentes órganos o en tejido muscular, aunque también participan en la inducción de la respuesta inmune las proteínas y polisacáridos del huésped.

El sistema inmune, difícilmente puede reaccionar con los componentes somáticos del parásito, excepto cuando éste ha muerto, en estas ocasiones solo es posible detectar inmunoglobulinas inducidas por antígenos de excreciones y secreciones, en el caso de C. cellulosa se debe a que carece de -

tubo digestivo y su nutrición y procesos metabólicos los realiza a base de intercambio constante a través de la membrana o pared vesicular, dando lugar a diferentes productos con actividad antigénica.

Recientemente, los avances en los procesos inmunológicos, permiten comprender el mecanismo de respuesta contra la estructura antigénica de los helmintos, que tienen diversas características, además de su capacidad para adaptarse al huésped, que en ocasiones, es la responsable de que no se detecte ningún tipo de inmunidad.

La detección de la respuesta inmune tanto humoral como celular nos permite establecer, en algunos casos, si la infección se encuentra en su período inicial de invasión o migración tisular e indicarnos si el parásito está vivo o en proceso de degeneración.

La inmunidad humoral esta representada por la producción de anticuerpos en el huésped infectado, lo que implica la posibilidad de diagnosticar la parasitosis al detectarlos e incluso cuantificarlos en suero o líquido cefalo raquídeo por diferentes métodos inmunológicos, sin embargo, su ausencia no significa que el individuo se encuentre libre del parásito pues la respuesta inmune humoral pudo haber sido fugaz o de baja magnitud, además de que en muchas pruebas sero-

lógicas una proporción considerable de sueros de pacientes -- con cisticercosis no dan reacción positiva, lo que indica que una fracción de pacientes cisticercosos no producen anticuerpos anticisticercos, debido posiblemente a una inmunosupresión producida por el parásito o a que el antígeno es incapaz de - atravesar la barrera hematoencefálica. (64,65,70)

La respuesta de anticuerpos en pacientes cisticercosos no es homogénea, en inmunoelectroforesis se han reconocido hasta ocho sistemas antígeno-anticuerpo diferentes denominados B,A,E,C,D,G,H y F; donde un 77% de sueros positivos reconocen varias combinaciones de uno, dos o tres de estos sistemas y un 84% tiene anticuerpos frente al antígeno B, siendo la respuesta menos heterogénea en los sueros de cerdos infectados. (19,22)

Como el antígeno B es el componente que con mayor frecuencia reconocen los pacientes con anticuerpos anticisticercos, se ha intentado su caracterización inmunológica, bioquímica y fisiológica; los resultados indican que tiene un peso molecular de 100,000 daltons, un punto isoelectrico de 8.6, es soluble en ácido acético 0.5 mol/litro y se polimeriza en forma de gel; en cuanto a su fisiología se muestra que es un antígeno que se adhiere a tejido conectivo, tanto de humanos como de cerdos parasitados; es adsorbido por colágena humana

y aglutina a los eritrocitos humanos normales. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de que sea una proteína con características de fibronectina y puede representar un mecanismo de evasión inmunológica de C. cellulosa, consistente en la desviación de anticuerpos anti-B hacia el tejido conectivo del huésped. (21)

Las principales clases de inmunoglobulinas detectables que inducen los antígenos de C. cellulosa son IgG seguidas de IgM y por último IgE, uno de ellos (antígeno H) induce IgE principalmente. Esto ha sido determinado mediante el uso de anticuerpos antiinmunoglobulinas humanas, marcadas con fluoresceína, sobre preparaciones de inmunoelectroforesis en los sistemas antígeno-anticuerpo de antígenos de C. cellulosa con los sueros de pacientes. (22)

La inmunidad celular en la cisticercosis puede presentar fenómenos de hipersensibilidad celular, aunque lo habitual es que aparezcan fenómenos inmunopatológicos mediados por inmunoglobulinas, siendo común observar fenómenos de anafilaxia cutánea local, fenómeno de Arthus, urticaria generalizada e incluso casos de choque anafiláctico. (67)

El análisis histológico de la reacción frente a C. cellulosa, indica la presencia de un proceso inflamatorio que puede variar de discreto a intenso, dependiendo de la vig

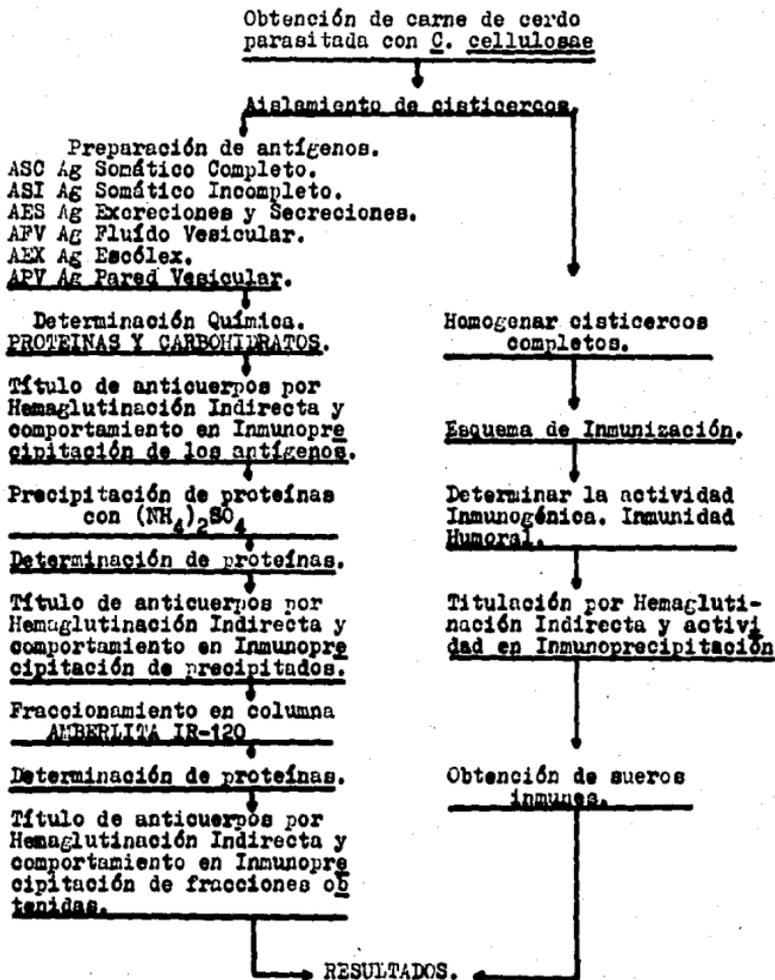
bilidad del cisticerco. Cuando el cisticerco está vivo, se encuentra rodeado de un infiltrado celular formado por algunos linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y eosinófilos, -- mientras que en la periferia de los cisticercos muertos se observa un gran número de linfocitos, células plasmáticas, células gigantes multinucleadas, leucocitos polimorfonucleares y eosinófilos, indicando esto la presencia de un infiltrado celular inflamatorio agudo. En ambos casos el infiltrado celular se encuentra rodeado de tejido conectivo fibroso. (21,64)

La cisticercosis humana se puede presentar en diferentes tejidos al azar, siendo las localizaciones más frecuentes en globo ocular, parénquima cerebral o en cavidades ventriculares, observándose que, en tanto el parásito está vivo las molestias aparentemente son mínimas y en la mayoría de -- los casos sólo se presentan cuando el parásito actúa mecánicamente sobre paredes craneales, en zonas importantes del parénquima cerebral o bien cuando obstruye el flujo de LCR, por el contrario, cuando el parásito ha muerto y se encuentra en desintegración el cuadro clínico es más severo, esto es debido a que la muerte del parásito induce graves reacciones histi-- cas, determinadas por la presencia del fenómeno de Arthus, ca-- racterizado por vasculitis que conduce a meningitis basal de tipo crónico, que es el cuadro terminal más común. (22)

CAPITULO II.

MATERIAL Y METODOS

DIAGRAMA.



2.- OBTENCION DE ANTIGENOS.

2.1 Extracción quirúrgica de Cysticercus cellulosae de carne de cerdo parasitada.

Material:

- Pipetas de 1 ml.
- Equipo de disección
- Vasos de precipitados de 250 ml.
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml.

Reactivos:

- Solución salina estéril al 0.85%
- Solución estéril de antibióticos (Estreptomicina/
Penicilina)
- Agua destilada estéril.

Método:

La extracción quirúrgica de Cysticercus cellulosae se efectuó a partir de carne de cerdo infectada, la cual fué proporcionada por el Rastro ABC de Los Reyes, Estado de Méxi-
co.

- 1.- Con ayuda de pinzas y bisturí, extraer cuidadosamente los cisticercos, evitando romper la cápsula, depositarlos en vasos de precipitados conteniendo solución salina estéril 0.85%, separando los cisticercos completos e incompletos.
- 2.- Efectuar el lavado con varios cambios de agua destilada estéril, con el fin de desechar partículas no pertenecientes al cisticerco.
- 3.- Transferirlos cuidadosamente, uno por uno, a un vaso de precipitados de 250 ml. conteniendo solución salina estéril al 0.85% y proseguir el lavado con varios cambios de la solución.
- 4.- Colocar los cisticercos en un vaso de precipitados conteniendo solución de antibióticos estéril y dejarlos repo--

sar 1 hora con el fin de desengrasarlos y evitar una contaminación.

- 5.- En condiciones de esterilidad, depositar los cisticercos uno a uno en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. estéril y - agregar por cada cisticerco 0.1 ml. de solución salina - estéril 0.85%.
- 6.- Refrigerar a 4°C. (40)

2.2 Elaboración de antígenos.

Obtención de Antígeno de Excreciones y Secreciones (AES)

Material:

- Pipetas de 1 ml.
- Matraz Erlenmeyer de 125 ml. estéril
- Baño María a 37°C.
- Frascos viales estériles de 5 ml.

Reactivos:

Solución salina estéril al 0.85%

Método:

- 1.- Colocar los cisticercos perfectamente limpios y completos en un matraz Erlenmeyer de 125 ml. estéril.
- 2.- Agregar solución salina estéril al 0.85%, 0.1 ml. por cada cisticerco.
- 3.- Incubar a 37°C durante 22 horas.
- 4.- Al macerar la solución así obtenida en alícuotas de 1 ml. en frascos viales estériles y congelar para su uso posterior. (40)

Obtención de Antígeno de Fluido vesicular (AFV).

Material:

- Pipetas de 2 ml.

Cajas de petri estériles.
Pinzas y agujas de disección.
Mechero.
Frascos viales estériles de 2 ml.
Centrifuga.
Tubos para centrifuga estériles.

Método:

Realizar todo el procedimiento en condiciones de esterilidad.

- 1.- Colocar los cisticarcos previamente lavados sin romper la cápsula, en cajas de petri estériles.
- 2.- Extraer el fluido vesicular puncionando con agujas de disección, separando la membrana y el escólex en diferentes cajas de petri.
- 3.- El fluido obtenido centrifugarlo a 10 000 rpm por 30' a -4°C para eliminar los fragmentos tisulares.
- 4.- Almacenar en alícuotas de 2 ml. en frascos viales estériles.
- 5.- Congelar hasta su uso. (40)

Obtención de Antígenos de Pared Vesicular y Escólex (APV, AEX)

Material:

Agitador magnético.
Homogenizador estéril.
Pipetas de 2 ml.
Frascos viales estériles de 2 ml.
Centrifuga.
Tubos de centrifuga estériles.
Tubo de diálisis.
Matraz Erlenmeyer de 2 000 ml.

Reactivos:

SSAF pH 7.2

Método:

Los antígenos de la pared vesicular y escólex se preparan por separado:

- 1.- Homogenizar perfectamente con SSAP pH 7.2 estéril.
- 2.- Agitar durante 16 horas a 4°C.
- 3.- Centrifugar a 10 000 rpm durante 30' a 4°C.
- 4.- Dializar el sobrenadante con cambios continuos de SSAP - pH 7.2 durante 24 horas, en un volumen de 40 veces el volumen inicial (antígeno).
- 5.- Centrifugar a 10 000 rpm durante 60' a 4°C.
- 6.- Almacenar en alícuotas de 2 ml.
- 7.- Congelar hasta su uso (19).

Obtención de Antígeno Somático Completo e Incompleto (ASC, ASI)

Material:

Homogenizador vidrio estéril.

Baño de hielo.

Frascos estériles de 1 l. de boca ancha y tapón empujable.

Jeringa de 50 ml. estéril con aguja # 16 de 13 cm. - de largo.

Centrífuga.

Frascos de centrifuga estériles.

Frascos para liofilizar estériles.

Liofilizador.

Frascos viales estériles de 50 ml.

Pipetas de 10 ml.

Probetas de 1 000 ml.

Balanza granataria.

Vasos de precipitados de 50 ml.

Reactivos:

Solución de Sacarosa al 0.25M estéril y fría.

SSAF pH 7.2 estéril y frío.

Acetona a - 20°C

Método:

Para la preparación de estos antígenos se utilizan cisticercos completos e incompletos por separado, lavados, y tratados con antibióticos.

- 1.- Pesar en un vaso de precipitados de 50 ml. cada lote de cisticercos.
- 2.- Colocar los cisticercos ya pesados, en un homogenizador virtis y agregar 4 ml. de sacarosa 0.25 M estéril y fría por gramo de cisticercos, respectivamente.
- 3.- Homogenizar las mezclas en baño helado por 10'.
- 4.- Con ayuda de una jeringa de 50 ml. y aguja # 16 de 13 cm. de largo estéril, depositar el homogenizado lentamente en el fondo de los frascos de boca ancha conteniendo previamente acetona a -20°C, 16 volúmenes por volumen inicial de homogenizado, tapar y agitar vigorosamente por 5' hasta homogenizar perfectamente.
- 5.- Reposar en baño helado por 20' con los frascos inclinados
- 6.- Decantar la acetona y agregar un volumen igual, agitar vigorosamente hasta homogenizar.
- 7.- Reposar por 1 hora manteniendo los frascos inclinados en el baño helado.
- 8.- Decantar la acetona y resuspender el sedimento en 100 ml. de acetona a -20°C.
- 9.- Homogenizar y centrifugar a 0°C durante 15' a 3 000 rpm.
10. Decantar el sobrenadante y secar al vacío a 0°C.
11. Resuspender en SSAF pH 7.2 frío y estéril, en una proporción de 0.4 ml. por volumen de homogenizado inicial.

NOTA.- En este paso el Antígeno Somático Completo requiere de 16 horas de agitación a 4°C, para seguir el procedimiento.

- 12.- Centrifugar a 15,000 rpm durante 1 hora a 0°C.
- 13.- Almacenar en alícuotas de 10 ml.
- 14.- Congelar hasta su uso. (30,40)

3.- ANALISIS QUIMICO DE LOS ANTIGENOS.

3.1 Determinación de Proteínas.

Método de LOWRY.

Es un método colorimétrico mediante el cual se mide el color que se produce al agregar el reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu a una solución alcalina de proteínas.

El reactivo de Folin-Ciocalteu, sales de litio del ácido fosfomolibdotúngstico, oxida compuestos fenólicos en -- condiciones alcalinas, por lo que se reduce de un color inicial amarillo a un color azul intenso.

Este reactivo se usa para medir compuestos fenólicos, así como para determinar Tirosina, aminoácido que contiene una cadena lateral fenólica, y como todas las proteínas -- contienen este aminoácido es posible detectar cuantitativamente las proteínas existentes en una muestra problema. Los grupos Indol e Imidazol, del Triptofano e Histidina, otros aminoácidos, reaccionan también con el reactivo pero muy débilmente.

La intensidad del color depende del contenido de Tirosina y Triptofano de la muestra, aunque también de la presencia de grupos S-H u otros grupos reductores.

En la modificación de Lowry, el método se hace aún más sensible por la adición de una pequeña cantidad de ión cúprico en tartrato débilmente alcalino, con lo que aumenta la intensidad del color. El complejo tipo Biuret entre cobre y - proteína se trata posteriormente con el reactivo de fenol, es

te complejo y las cadenas aromáticas de las proteínas reducen el reactivo y las dos reacciones juntas son 100 veces más sensibles que el método de Biuret, lo que permite detectar cantidades pequeñas de proteínas del orden de 30 a 100 microgramos (23,35,39).

Material:

- Balanza analítica.
- Espectrofotómetro.
- Espátula.
- Gradilla.
- Frascos ámbar con tapón esmerilado.
- Matras aforado de 100 ml.
- Pipetas de 0.1, 1.0 y 5.0 ml.
- Tubos de ensayo 13 x 100

Reactivos:

- A.- Solución de sulfato de cobre pentahidratado al 1%.
Disolver 1.0 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 50 ml. de agua destilada, aforar a 100 ml. con agua destilada.
- B.- Solución de tartrato de sodio y potasio al 1%.
Disolver 1.0 g de $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot \text{NaK} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 50 ml. de agua destilada, aforar a 100 ml. con agua destilada.
- C.- Solución de carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0.1 N.
Disolver 2.0 g de Na_2CO_3 en 50 ml. de NaOH 0.1 N, aforar a 100 ml. con NaOH 0.1 N.

Solución I:

Se prepara justamente antes de usarla mezclando 1.0 ml. de la solución A de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 1.0 ml. de la solución B de tartrato doble en 100 ml. de la solución C de Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 N.

Solución II:

Reactivo de fenol Polin-Ciocalteu (comercial 2N): Antes de -

usarlo se diluye volumen a volumen con agua destilada para tenerlo 1 N.

Solución III:

Albumina sérica bovina

Disolver 10 mg de albumina sérica bovina cristalizada y purificada en 50 ml. de H₂O dest. y aforar a 100 ml con H₂O dest.

Método:

1.- Preparación de la curva estándar.

En una serie de tubos de ensayo 13 x 100 marcados, se preparan a partir de la solución de albumina sérica bovina, diluciones que contengan 0.125, 0.25, 0.50, 0.75 y 1.00 ml. de solución patrón y completar a 1 ml con H₂O dest.

2.- En otros tubos, se mide 0.1 ml. de la muestra problema.

3.- Diluir las muestras a 1.0 ml. con agua destilada.

4.- Añadir 3.0 ml. de la solución I a todos los tubos.

5.- Mezclar y dejar en reposo 10' a temperatura ambiente.

6.- Añadir 0.3 ml. de la solución II a todos los tubos.

7.- Mezclar y dejar en reposo 30' a temperatura ambiente.

8.- Hacer la lectura en D.O. a 500 nm. de longitud de onda - contra blanco de agua.

Interpretación:

1.- Se grafican la D.O contra la concentración en papel milimétrico.

2.- Por interpolación de los valores de D.O. en la curva patrón se obtiene la concentración de proteínas de la muestra problema.

3.2 Determinación de Carbohidratos.

Método de la ANTRONA.

La antrona en ácido sulfúrico es un reactivo general para la determinación cuantitativa de carbohidratos y en-

teres.

Se basa en la formación de derivados del furfural - por deshidratación y ciclación de las moléculas. (17,35,47,57 68).

Material:

- Colorímetro.
- Balanza analítica.
- Baño de agua en ebullición.
- Baño de hielo.
- Gradilla.
- Matraz aforado de 100 ml.
- Pipetas de 0.1 y 1.0 ml.
- Tubos de ensayo 13 x 100

Reactivos:

Solución de Antrona al 0.2 % en ácido sulfúrico al 95 %.

- Disolver 0.2 g de antrona recristalizada en aproximadamente 50 ml. de ácido sulfúrico al 95 %, aforar a 100ml. con ácido sulfúrico al 95%. El reactivo se prepara al momento de usarse.

Solución patrón de Dextrosa.

- Disolver 10 mg. de dextrosa en aproximadamente 50 ml de H₂O y aforar a 100 ml. con agua destilada.

Método:

1.- Preparación de la curva estándar:

En una serie de tubos marcados que contengan 2.0 ml. del reactivo de antrona mantenidos en hielo, se agregan 0.125 0.25, 0.50, 0.75 y 1.00 ml. de la solución patrón de dextrosa para tener concentraciones en mg/ml se completa el volumen a 3.0 ml. con agua destilada.

2.- A otros tubos conteniendo 2 ml. del reactivo de antrona mantenidos en hielo, agregar 0.1 ml. de la muestra problema y se completa a 3 ml. con agua destilada.

- 3.- En los pasos anteriores, el reactivo y la muestra problema o patrón, deben quedar en capas cuidadosamente estratificadas.
- 4.- Se prepara un blanco con 1.0 ml. de agua destilada y 2.0 ml. de reactivo.
- 5.- Se agitan vigorosamente, los tubos, sin sacarlos del baño de hielo hasta homogenizar perfectamente.
- 6.- Se colocan los tubos en baño de agua en ebullición durante 16' exactos.
- 7.- Se pasan a un baño de agua fría.
- 8.- Hacer la lectura en D.O. a 625 nm. de longitud de onda -- contra blanco de agua.

Interpretación:

- 1.- Los valores de D.O. de los tubos de la curva estándar se grafican contra la concentración en papel milimétrico.
- 2.- Por interpolación de los valores de D.O. en la curva patrón se obtiene la concentración de carbohidratos de la muestra problema.

4.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD INMUNOLOGICA.

Métodos Inmunoquímicos.

1.- Doble difusión en gel. (ID)

Técnica de Ouchterlony.

La doble difusión en gel, consiste básicamente en colocar una capa de gel fundido sobre una placa de vidrio o plástico, se deja solidificar y se practican horadaciones en las que posteriormente se deposita el antígeno y el anticuerpo a estudiar.

Al llevarse a cabo la difusión de ambos reactivos - en forma radial, en el lugar donde el antígeno y su anticuer-

po específico se encuentran, en concentraciones equivalentes, se forma una banda de precipitación.

La velocidad de difusión de los reactivos, es directamente proporcional a su concentración e inversamente proporcional a su peso molecular (40).

Material:

Matraz aforado de 1 000 ml.
Parrilla eléctrica.
Bomba de vacío.
Cámara húmeda.
Balanza analítica.
Portaobjetos.
Horadadores de 2.5 mm. de diámetro.
Capilares de 9 mm. por 1 mm. de diámetro interior.
Placa niveladora de vidrio de 30 x 30 cm.
Nivelador.
Matraz Erlenmeyer de 250 ml.
Probeta de 100 ml.
Pipeta de 10 ml.
Hisópos.
Plantilla para perforación.

Reactivos:

Amortiguador salino pH 8.6 y fuerza iónica 0.05

- Disolver un frasco de amortiguador pH 8.6, fuerza iónica 0.1 (Sigma) en un litro de agua destilada.

Agarosa al 0.9 %

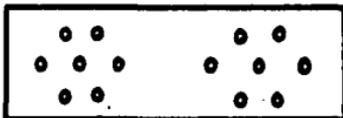
- Disolver 0.9 g de agarosa en 50 ml. de agua destilada en ebullición, agregar 50 ml. de amortiguador salino pH 8.6 y se añaden 0.1 g de azida de sodio.

Método:

1.- Preparación de las placas:

Los portaobjetos perfectamente limpios y desengrasados, -

- se barnizan con la agarosa al 0.9 % fundida, con ayuda de un hisopo, y se deja solidificar a temperatura ambiente.
- 2.- Se colocan los portaobjetos sobre una superficie plana y nivelada.
 - 3.- Se agregan 3 ml. de agarosa al 0.9 % fundida sobre cada portaobjeto de manera que quede una capa homogénea, se deja solidificar el gel de agar y se guardan en cámara húmeda y refrigeración.
 - 4.- Se coloca la laminilla sobre la plantilla y con el horador se practican los cortes circulares en forma de roseta uno central y seis periféricos, con el sacabocados se retira el gel excedente.



- 5.- Con capilares, se coloca el antígeno en el pozo central y los sueros en la periferia, de manera que se llenen completamente pero sin derramar su contenido.
- 6.- Se colocan las laminillas en cámara húmeda y se incuban a temperatura ambiente durante 24 a 48 horas.
- 7.- Se hace la lectura y se registran los resultados.

Interpretación:

La presencia de bandas de precipitación entre el antígeno y los sueros, se considera como una reacción positiva. La ausencia de bandas de precipitación entre el antígeno y los sueros, se considera como una reacción negativa.

Cuando dos sueros colocados en pozos adyacentes reaccionan ante un antígeno determinado y producen líneas de precipitación que coinciden y se funden completamente, indica que ambos comparten los mismos anticuerpos (líneas de identidad).

Cuando dos sueros colocados en pozos adyacentes --- reaccionan ante un antígeno determinado, produciéndose líneas de precipitación que cruzan o coinciden parcialmente, indica que ambos presentan tanto anticuerpos compartidos como no com partidos.



IDENTIDAD COMPLETA



IDENTIDAD PARCIAL



NO IDENTIDAD

2.- Contraimmunolectroforesis (CIEF).

La CIEF es una técnica inmunológica cualitativa o semicuantitativa de difusión en gel, en la que se aprovechan las propiedades del amortiguador, del gel, de la carga eléctrica de las moléculas y de un campo eléctrico: El antígeno y el suero inmune se colocan en pozos hechos en gel, dispuestos uno frente a otro, haciéndoles pasar una corriente eléctrica; es una inmunodifusión pero acelerada y dirigida, ya que los antígenos se difunden hacia el ánodo y los anticuerpos específicos hacia el cátodo a las condiciones de pH y fuerza iónica utilizadas, de tal manera que cuando ambos se encuentran, se produce una reacción antígeno-anticuerpo formándose una o varias bandas de inmunoprecipitación, dependiendo del número de sistemas antígeno-anticuerpo presentes, que aparecen después de 45 a 90' de haberse iniciado el corrimiento electroforético.

La migración de los anticuerpos hacia el cátodo es favorecida por el efecto electroosmótico (EEO). El EEO se produce por la existencia de cargas negativas sobre la superficie de la agarosa, las cuales atraen iones de carga contraria, haciendo que la capa de líquido que se encuentra estrechamente en contacto con la superficie del gel adquiera una carga negativa. Al someter este sistema a un campo eléctrico,

se genera una fuerza eléctrica que actúa sobre este líquido - cargado positivamente (H_3O^+), el cual migra hacia el cátodo - arrastrando a los anticuerpos, acelerando así su migración hacia el antígeno.

El EEO se puede aumentar, si se utilizan amortiguadores de distinta concentración iónica, siendo menor el del - gel de agarosa (0.01) en comparación con el de la cámara de - electroporesis (0.05). (40)

Material:

Cámara de electroforesis.

Fuente de poder.

Bomba de vacío.

Cámara húmeda.

Balanza analítica.

Parrilla eléctrica.

Portaobjetos.

Horadadores de 2.5 mm. de diámetro.

Capilares de 9.0 cm. x 1.0 mm. de diámetro.

Placa niveladora de vidrio de 30 x 30 cm.

Nivelador.

Matraz Erlenmeyer de 250 ml.

Matraz aforado de 1 000 ml.

Probeta de 100 ml.

Pipeta de 10 ml.

Papel Whatman No. 1

Hisdpos.

Reactivos:

Amortiguador salino pH 8.6 fuerza iónica 0.05

- Disolver un frasco de amortiguador salino pH 8.6 f.i. 0.1 (Sigma) en un litro de agua destilada, se diluye 1:2 con - agua destilada para tener una f.i. de 0.05, utilizada para la cámara de electroforesis.

Amortiguador para la preparación del gel de agarosa.

- A partir del amortiguador de pH 8.6, f.i. 0.05, se prepara el amortiguador para el gel, diluyéndolo en proporción de 1:5 con agua destilada, para tener una f.i. de 0.01

Agarosa al 0.9%

- Disolver 0.9 g de agarosa en 100 ml. de amortiguador pH 8.6 f.i. 0.01, se calienta a ebullición hasta que esté perfectamente disuelto.

Método:

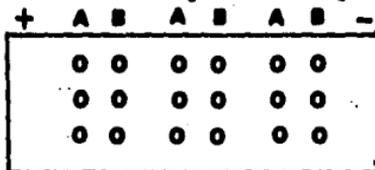
1.- Preparación de las placas:

Los portaobjetos limpios y desengrasados, se barnizan con la agarosa al 0.9 % fundida, dejándose solidificar a temperatura ambiente.

2.- Se colocan los portaobjetos en la placa de vidrio nivelada.

3.- Se agregan 3 ml. de agarosa fundida, repartiéndola uniformemente para que quede una capa homogénea, se deja solidificar a temperatura ambiente y se colocan en refrigeración dentro de la cámara húmeda.

4.- Se perfora el gel con un horador conectado a un sistema de vacío, utilizando una plantilla especial:



5.- Con capilares diferentes, se depositan los sueros a estudiar en cada uno de los pozos que corresponden a las filas A y en B los antígenos.

6.- Se colocan las placas en la cámara de electroforesis de tal manera que los pozos conteniendo los antígenos quede en el lado del cátodo y los sueros del ánodo.

- 7.- Las condiciones del corrimiento electroforético son:
- a) Amortiguador para la cámara de electroforesis pH 8.6
f.i.O.05
 - b) Voltaje 130-160 V
 - c) Potencial 4-5 V/cm
- 8.- El contacto entre el amortiguador de la cámara de electroforesis y la placa del gel de agar se establece mediante tiras de papel filtro Whatman No. 1
- 9.- Se deja correr durante 45-90'.

Interpretación:

- 1.- Se registran el número y características de las bandas de precipitación que aparecen para los diferentes antígenos.
- 2.- La presencia de bandas de precipitación entre los antígenos y los sueros se considera como reacción positiva, la ausencia de bandas de precipitación entre los antígenos y los sueros se considera como reacción negativa.

3.- Inmunolectroforesis (IE)

En esta técnica se combinan dos de las propiedades más importantes de los antígenos y anticuerpos; su capacidad de movilizarse en un campo eléctrico (electroforesis) y su capacidad de precipitar en un gel al reaccionar con el antígeno o anticuerpo específico. El método consiste en dos pasos: las proteínas contenidas en el antígeno se separan por electroforesis y se les hace reaccionar con sus correspondientes anticuerpos, con lo que resulta la formación de líneas de precipitación individuales en el sitio de la reacción antígeno-anticuerpo.

En la IE, se separan adecuadamente los diferentes componentes de una sustancia antigénica: la migración de los antígenos y anticuerpos está influenciada por la carga, tamaño y forma de la molécula, así como por su concentración, ---

fuerza iónica y pH del amortiguador empleado; también intervienen la temperatura, la viscosidad del medio y la intensidad del campo eléctrico.(40,71)

Material:

Parrilla eléctrica.
Cámara de electroforesis.
Fuente de poder.
Cámara húmeda.
Balanza analítica.
Bomba de vacío.
Portaobjetos.
Horador de 2.5 mm. de diámetro.
Cortador rectangular de 5 cm. x 2 mm.
Papel Whatman No. 1
Placa niveladora de vidrio de 30 x 30 cm.
Nivelador.
Capilares de 9 cm. x 1 mm. de diámetro interior.
Hisópos.
Matraz Erlenmeyer de 250 ml.
Matraz aforado de 1 000 ml.
Probeta de 100 ml.
Pipeta de 10 ml.
Sacabocado.

Reactivos:

Amortiguador salino pH 8.6, f.i. 0.05.

- Disolver un frasco de amortiguador salino para electroforesis pH 8.6, f.i. 0.1 (Sigma), en un litro de agua destilada
Diluir 1:2 con agua destilada para una f.i. de 0.05

Agarosa al 0.9%

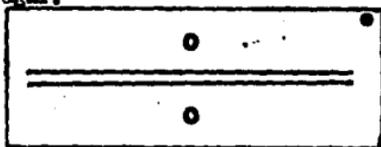
- Disolver 0.9 g de agarosa en 100 ml. de amortiguador salino pH 8.6, f.i. 0.05 y se calienta a ebullición.

Solución acuosa de azul de bromofenol al 0.05%.

- Disolver 0.5 g de azul de bromofenol en 100 ml de agua destilada.

Método:

- 1.- Los portaobjetos limpios y desengrasados, se barnizan con un hisopo conteniendo agarosa fundida al 0.9% y se dejan solidificar a temperatura ambiente.
- 2.- Los portaobjetos se colocan sobre la placa niveladora.
- 3.- Se agregan 3 ml. de agarosa fundida al 0.9% repartiéndola uniformemente hasta que quede una capa homogénea, se deja solidificar a temperatura ambiente y se colocan en la cámara húmeda para guardarse en refrigeración.
- 4.- Las laminillas se colocan sobre una plantilla especial y con el horador se practican cortes circulares, quitando el agar excedente con el sacabocado.
- 5.- Marcar el canal central con el cortador rectangular sin retirar el agar.



Corrimiento electroforético:

- 1.- Se colocan los antígenos en estudio en los pozos centrales y una gota de azul de bromofenol en el pozo lateral superior.
- 2.- Se llena con el amortiguador para electroforesis los compartimientos de la cámara.
- 3.- Se depositan las laminillas en la cámara de electroforesis, colocando adecuadamente los puentes de papel filtro Whatman No. 1.
- 4.- Se tapa la cámara de electroforesis, se conecta la fuente de poder y se deja correr durante 90 a 120' con 130-160 V

El corrimiento puede detenerse cuando la mancha del colorante ha llegado al otro extremo.

Inmunodifusión:

- 1.- Se retira la placa de la cámara de electroforesis y se coloca en una cámara húmeda.
- 2.- Se quita el agar del canal.
- 3.- Mediante capilares, se deposita el suero inmune correspondiente, repartiéndolo uniformemente en el canal.
- 4.- Se deja difundir de 24 a 48 horas para que se lleve a cabo la inmunoprecipitación.

Interpretación:

- 1.- Se registran los resultados, observando las laminillas con luz indirecta para apreciar mejor los arcos de precipitación.

Si es necesario las placas de inmunoprecipitación se tifen y guardan como referencia.

Técnica de coloración:

Se basa en la capacidad que tienen las proteínas para captar colorantes como son el rojo de tiazina, el negro de anido, el rojo de Ponceau y el azul brillante de Coomassie.

Equipo:

Agitador de Boherner.

Balanza analítica.

Material:

Probeta de 100 ml.

Cajas de Coplin.

Papel filtro de poro grueso.

Matraz volumétrico de 1000 ml.

Matraz Erlenmeyer de 1000 ml.

Reactivos:

Citrato trisódico al 5 %.

- Disolver 50 g de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 1000 ml de H_2O destilada.
Solución de Sørensen's

- Solución A: Fosfato de sodio dibásico 0.15 mol/litro.

Disolver 21.3 g de Na_2HPO_4 en aproximadamente -
500 ml. de agua destilada en un matraz volumé-
trico y se afora a 1000 ml.

- Solución B: Fosfato de potasio monobásico 0.15 mol/litro.

Disolver 20.4 g de KH_2PO_4 en aproximadamente -
500 ml. de agua destilada en un matraz volumé-
trico y se afora a 1000 ml.

- Solución salina isotónica al 0.85%.

Disolver 8.5 g de NaCl en aproximadamente 500 -
ml. de agua destilada en un matraz volumétrico
y aforar a 1000 ml.

Mezclar partes iguales de las soluciones A y B y se
hace una dilución 1:2 con solución salina isotónica al 0.85%.

Solución de ácido acético al 1 %.

- Diluir 10 ml. de CH_3COOH en aproximadamente 500 ml. de agua
destilada y aforar a 1000 ml. en matraz volumétrico.

Colorantes que se pueden usar para la tinción:

- Rojo de tiazina al 0.3 % en ácido acético al 1 %.

- Negro de amido 10 B al 0.2 % en ácido acético al 1 %.

- Rojo de Ponceau al 0.2 % en ácido acético al 1 %.

Glicerol al 1.5 % en ácido acético al 1 %.

- Diluir 1.5 ml de Glicerol en aproximadamente 50 ml. de áci-
do acético y aforar a 100 ml. con ácido acético al 1 %.

Método:

Eliminación de precipitados inespecíficos y de las proteínas que no reaccionaron:

- 1.- Se sumergen las placas en citrato trisódico al 5 % durante 20 minutos.
- 2.- Lavar las placas con agua destilada y cubrir cuidadosamente el gel con tiras de papel filtro humedecidas, evitando que queden burbujas.
- 3.- Se dejan secar a temperatura ambiente de 24 a 48 horas.
- 4.- Ya seco el gel, se retira el papel filtro de las placas y se sumergen en solución de Sörensen en caja de Coplin, se colocan en el agitador de Boherner por 3 a 4 horas haciendo varios cambios de la solución.
- 5.- Lavar con agua destilada cuidadosamente evitando romper el gel.
- 6.- Secar a temperatura ambiente.

Tinción:

- 1.- Se colocan las laminillas en cajas de Coplin que contienen la solución de Negro de Amido 10 B al 0.2 % en ácido acético al 1 %. Se deja actuar el colorante durante 5 a 10 minutos.

Decoloración:

- 1.- Se escurre el colorante y se sumergen las laminillas en solución de ácido acético al 1 % durante 30-40 minutos, haciendo varios cambios, hasta que el gel de agar quede incoloro y solamente las bandas de precipitación teñidas.

Fijación:

- 1.- Las laminillas se sumergen en glicerol al 1.5 % en ácido acético al 1 % durante 15 minutos y se deja secar a temp

ratura ambiente.

- 2.- Si se requiere conservar las laminillas por mucho tiempo, se puede sellar con una capa de barniz transparente después de que éstas han secado perfectamente. (40)

5.- PRECIPITACION DE PROTEINAS CON SULFATO DE AMONIO.

La precipitación de proteínas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en los antígenos, se lleva a cabo con el fin de separar las proteínas existentes en los extractos.

Este procedimiento se basa en la propiedad que tienen algunas proteínas de ser solubles a bajas concentraciones de sales, pero si se aumenta esta concentración las proteínas precipitan. (13)

- Equipo:** Balanza analítica.
Agitador magnético.
Centrifuga refrigerada.
Cuarto frío.
- Material:** Matraz Erlenmeyer de 50 ml.
Pipeta de 10 ml.
Mortero.
Tubos de ensayo 13 x 100.
- Reactivos:** Sulfato de amonio granulado.
PBS pH 7.2 frío y estéril.

Método:

- En 10 ml. de antígeno añadir $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de acuerdo a la tabla No. 1 en gramos proporcionales a un litro.
- Pulverizar el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en mortero en forma rápida.
- Agitación a 4°C por una hora.
- Centrifugar a 4°C por 30' a 3 000 rpm.
- Resuspender el precipitado en igual proporción con PBS pH

7.2 frío y estéril (10 ml.)

- Dializar exhaustivamente contra PBS hasta excluir sulfatos.
- Comprobar con $BaCl_2$ la ausencia de sulfatos. Al entrar en contacto el antígeno con el $BaCl_2$ la formación de un precipitado blanco indica la presencia de sulfatos, si es así, se requiere dializar nuevamente contra PBS pH 7.2.
- El sobrenadante se vuelve a precipitar a la siguiente concentración.
- Precipitar en concentraciones iniciales de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 % de acuerdo a la tabla I, el volumen varía en cada precipitación.
- Determinar la concentración de proteínas y su actividad en inmunoprecipitación y hemaglutinación indirecta de todos los precipitados.
- Almacenar en congelación hasta su uso.

6.- FRACCIONAMIENTO EN COLUMNA.

Intercambio iónico.

La cromatografía de intercambio iónico es un método de purificación que se basa en la separación de ciertas sustancias por diferencias en sus cargas eléctricas.

Es una de las técnicas de separación mejor documentadas, más sencilla y con mayor reproducibilidad para empleo en el laboratorio o a escala de producción. La técnica permite, con todo tipo de molécula biológica, la obtención de rendimientos y resolución excelentes.

Frecuentemente utilizada después de otros métodos como la filtración en gel y técnicas de precipitación, que extraen el material contaminante y las partículas gruesas de los extractos o preparaciones crudas reduciendo el volumen de

muestra de manera más convincente para el corrimiento cromatográfico.

Dada la presencia de radicales cargados, las macromoléculas biológicas se unirán a grupos de carga opuesta en una matriz de intercambio iónico. La separación de las sustancias ligadas se producirá cuando la elución de la matriz haga disminuir la fuerza de la unión. También puede obtenerse la separación de moléculas con diferencias de carga muy pequeñas por lo que el intercambio iónico, es una técnica altamente resolutiva.

Además de la elevada capacidad de muestra, la capacidad de elaborar grandes volúmenes y la elución de componentes diluidos de la muestra en forma concentrada hace que el intercambio iónico posea gran utilidad particularmente en los programas de purificación. (45,59,60)

Material:

Pipeta de 10 ml.
Matraces volumétricos de 1000 ml.
Vasos de precipitados de 300 ml.
Tubos de ensayo 13 x 100
Columna K 9/30
Jeringas desechables de 1 ml.

Equipo:

Colector de fracciones BUCHLER.
Puente de poder BUCHLER.
Potenciómetro.
Tubo de Tygon.
Balanza granataria.

Reactivos:

Solución amortiguada de acetatos:

Acido acético 0.2 N pH 3.1

- Disolver 12 ml. de CH_3COOH en aproximadamente 500 ml. de agua destilada en matraz volumétrico y aforar a 1000 ml con agua destilada.

Acetato de amonio 2 M pH 5.2

- Disolver 15.4 g de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ en aproximadamente 500 ml. de agua destilada en matraz volumétrico y aforar a 1000 ml con agua destilada.

Hidróxido de sodio 0.2 N

- Disolver 4.0 g de NaOH en aproximadamente 500 ml. de agua destilada en matraz volumétrico y aforar a 1000 ml. con agua destilada.

Acido clorhídrico 0.1 N

- Disolver 3.6 ml de HCl en aproximadamente 500 ml de agua destilada en matraz volumétrico y aforar a 1000 ml de agua destilada.

Material de empaque:

Amberlita catiónica IR-120

Matriz: Resina polimerizada.

Grupo funcional: $-\text{SO}_3^-$

pH: 0-14

meq/g de la resina seca: 4.3-5.0

meq/ml en el lecho: 1.9

Temperatura máxima: 120°C

Forma física: Macrorreticular.

Diámetro del poro: 16-50

Preparación de la resina:

- Pesar 0 g de la resina seca (25 meq de capacidad) y colocarla en un vaso de precipitados de 300 ml.

- Cubrir la resina con NaOH 0.2 N y agitar, dejar asentarse y -
decanter, repetir el proceso hasta tener un pH altamente al
calino.
- Lavar la resina con agua destilada hasta neutralizar el pH.
- Regenerar la resina con HCl 0.1 N, agitar perfectamente, de
jar asentarse y decantar, repetir el proceso hasta tener un -
pH ácido.
- Lavar la resina con agua destilada hasta neutralizar el pH.
(31,45,62)

Empaque de la columna:

- Ajustar la solución amortiguada de acetatos a un pH de 7.2
- Empacar una columna K 9/30 con la resina activada, con ayu-
da de la solución amortiguada de acetatos evitando que se -
formen grumos o encadenamiento de partículas.
- Empacar la columna en 3/4 de su capacidad.
- Eluir con la solución amortiguada de acetatos hasta ajustar
el pH de la resina.

Método de fraccionamiento:

- Colocar la columna en los soportes del colector de fraccio-
nes BUCHLER, cuidando que esté perfectamente vertical y fi-
ja.
- Conectar el frasco de Mariotte a la columna con el volumen
necesario de la solución amortiguada de acetatos para efec-
tuar el corrimiento.
- Seleccionar el número de tubos para la recolección en la --
gradilla colectora.
- Ajustar el goteo a 40 gotas por minuto, en la fuente de po-
der.
- Recolectar aproximadamente 2 ml. por tubo.
- Terminada la recolección lavar la columna con NaOH 0.2 N.

- Las fracciones obtenidas se prueban en inmunoprecipitación y hemaglutinación indirecta.
- Leer a 280 de D.O. contra un blanco de la solución amortiguada de acetatos, todas las fracciones y graficarlas.
- Las fracciones se conservan en congelación.

7.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD INMUNOGENICA: INEGUNIDAD HUMORAL.

La magnitud y los intervalos de las dosis de antígeno, son de importancia primordial en la respuesta de anticuerpos y, aunque una amplia dosis de antígeno suele proporcionar inmunidad contra agentes perjudiciales, una dosis pequeña de antígeno con microgramos de proteínas, puede bastar para desencadenar la formación de anticuerpos.

Las dosis de antígeno, son más eficaces cuando se inoculan por vía subcutánea con un adyuvante en pequeñas alícuotas, que por vía intravenosa, estas dosis mínimas de antígeno que desencadenan producción de anticuerpos, conservan y mantienen la reacción, en tanto que, las dosis excesivas de antígeno pueden causar tolerancia inmunitaria.

Una amplia variedad de compuestos o sustancias, son capaces de estimular respuesta inmunitaria y actuar como adyuvantes, estos pueden agruparse en varias categorías:

- 1) Emulsiones agua en aceite (adyuvantes de Freund)
- 2) Polinucleótidos sintéticos.
- 3) Hormonas, medicamentos y nucleótidos cíclicos.
- 4) Endotoxinas.
- 5) Linfocinas y monocinas.

El estudio de los mecanismos de acción de estos adyuvantes, se ha dirigido especialmente hacia los agentes inmunopotenciadores, que estimulan sólo una clase particular de -

respuesta, sea inmunidad humoral o celular, aunque el mecanismo de acción de todos los adyuvantes, no está bien definido.

Dentro de estas sustancias o adyuvantes que estimulan una mayor producción de anticuerpos contra el antígeno, -- que prolongan el período de formación de anticuerpos y una -- respuesta a dosis menores de antígeno, están los adyuvantes -- completo e incompleto de Freund, que son los más usados y potentes. (33)

El adyuvante completo de Freund, consiste en una -- emulsión de aceite que contiene micobacterias muertas y un -- emulsificante, que puede ser un tensactivo o un detergente, el adyuvante incompleto no contiene micobacterias.

En la mezcla completa de Freund, al añadir el antígeno, se forma por adsorción, una emulsión de agua en aceite, en la cual, cada gotita de la fase acuosa está rodeada de una fase oleosa continua, que contiene las micobacterias muertas, esta mezcla, al inocularse, produce formación de anticuerpos humorales y estimula una reacción granulomatosa intensa, con lesiones que consisten principalmente, en acúmulos de histiocitos y linfocitos. En los ganglios linfáticos locales, se advierte un pequeño aumento de células plasmáticas, sin embargo parte de esta sustancia o mezcla inoculada escapa del sitio local y llega a órganos y ganglios linfáticos alejados, en los cuales estimula una respuesta intensa de células plasmáticas. (11,33)

Estas lesiones violentas y persistentes que resultan del uso de los adyuvantes de Freund, han impedido que se utilicen en el ser humano, en el cual deben utilizarse adyuvantes que puedan ser metabolizados o eliminados.

El antígeno, se libera de las mezclas con adyuvante en un período más lento que cuando se administra exclusivamente el antígeno, lo que explica la producción más duradera de

anticuerpos. Probablemente los histiocitos en proliferación, que se transforman en células epiteloides, contribuyan de manera importante a acrecentar la producción de anticuerpos, -- aunque se supone que no elaboran anticuerpos.

Otra opción sería, que las células inmunológicamente competentes, de manera inespecífica, sean atraídas a los depósitos de adyuvante, donde se tornen "preparadas o cebadas" por el antígeno. (64,65)

Se desconoce el mecanismo de acción de los adyuvantes, pero hay dos factores comunes a la acción de todos ellos:

- 1) Permiten la persistencia del antígeno y,
- 2) Desencadenan reacción inflamatoria local de células que -- participan en la formación de anticuerpos. (11,33)

Para estimular la inmunidad humoral, se preparó un homogenado de cisticercos completos con solución salina isotónica al 0.85%, en alícuotas de 0.5 ml. de homogenado mezclado con 0.5 ml. de adyuvante completo de Freund y, se inoculó en conejos con el siguiente esquema de inmunización:

SEMANA	DIA	VIA DE INOCULACION
1a.	1o.	0.25 ml. en cojinete plantar derecho. 0.25 ml. por vía intramuscular. 0.50 ml. por vía intraperitoneal.
2a.	8o.	0.25 ml. en cojinete plantar izquierdo 0.25 ml. por vía subcutánea. 0.50 ml. por vía intramuscular.
3a.	15o.	0.50 ml. por vía subcutánea. 0.50 ml. por vía intramuscular.
4a.	22o.	Sangrado a blanco.

Antes de cada inoculación, los animales se sangraron por punción cardíaca para obtener aproximadamente 5 ml de sangre, se separó el suero y se realizaron las siguientes --- pruebas inmunoserológicas: inmunoprecipitación y hemaglutinación indirecta. (40)

Hemaglutinación Indirecta. (HI) Microtécnica

Fundamento:

La hemaglutinación indirecta o pasiva (HI), es una técnica para la identificación de antígenos y la semicuantificación de anticuerpos, en la cual los glóbulos rojos de carnero o humanos tipo "O", se utilizan como soporte para fijar a su superficie casi todos los polisacáridos y ciertas proteínas antigénicas. Esta cualidad se incrementa cuando los eritrocitos son tratados con ácido tánico, logrando que, mediante atracción electrostática se una al antígeno o bien por unión covalente antígeno-eritrocito usando glutaraldehído, presentándose la aglutinación cuando se ponen en contacto con inmunoglobulinas específicas.

Para semicuantificar las inmunoglobulinas contenidas en una muestra, se hacen reaccionar diluciones seriadas del suero con cantidades constantes de una suspensión de eritrocitos sensibilizados con un antígeno específico; la dilución más alta del suero que determina una aglutinación clara, se considera como punto final de la reacción y representa el título de anticuerpos.

Como algunos sueros humanos contienen anticuerpos heterófilos capaces de aglutinar eritrocitos de carnero, se debe incluir un control de los mismos eritrocitos tratados con ácido tánico sin sensibilizar. Si existe aglutinación, la prueba se repite con el suero previamente adsorbido con eri--

trocitos de carnero tratados con ácido tánico. (40)

Material:

Micropipetas de 0.05 y 0.025 ml.
Microdilutores de 0.05 ml.
Placas de microtitulación con pozas en U
Tubos de centrifuga cónicos de 15 ml. graduados.
Pipetas de 0.2 y 0.1 ml.
Pipetas de 5 y 10 ml.
Pipetas capilares con bulbo.
Vasos de precipitados de 50, 100 y 200 ml.
Matras volumétrico de 100 y 1000 ml.
Matras Erlenmeyer de 50 y 125 ml.
Gradilla.

Equipo:

Centrifuga clínica.
Baño María a 37° y 56° C
Agitador Boherner.

Reactivos:

Solución anticoagulante de citrato de sodio al 3.8 %

- Disolver 3.8 g de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ en 100 ml. de agua destilada. -
Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 lbs. de presión, duran-
te 15' y se conserva en refrigeración.

Solución concentrada de fosfato de sodio dibásico 0.15 mol/l.

- Disolver 21.3 g de Na_2HPO_4 en aproximadamente 500 ml. de -
agua destilada en un matras volumétrico y se afora a 1000 -
ml.

Solución concentrada de fosfato de potasio monobásico 0.15 --
mol/litro.

- Disolver 20.4 g de KH_2PO_4 en aproximadamente 500 ml. de agua

destilada en un matraz volumétrico y se afora a 1000 ml.

Solución de cloruro de sodio 0.15 mol/litro.

- Disolver 8.8 g de NaCl en aproximadamente 500 ml. de agua -
destilada en un matraz volumétrico y aforar a 1000 ml.

Solución salina amortiguada con fosfatos (SSAF) pH 7.2 fuerza
iónica 0.15

- Se mezclan las siguientes soluciones:

Sol. de NaCl 0.15 mol/litro	100.0 ml.
-----------------------------	-----------

Sol. de Na_2HPO_4 0.15 mol/litro	24.0 ml.
--------------------------------------------------	----------

Sol. de KH_2PO_4 0.15 mol/litro	76.0 ml.
-------------------------------------------------	----------

ajustar el pH a 7.2

Solución salina amortiguada con fosfatos (SSAF) pH 6.4, fuer-
za iónica 0.15

- Se mezclan las siguientes soluciones:

Sol. de NaCl 0.15 mol/litro	100.0 ml.
-----------------------------	-----------

Sol. de Na_2HPO_4 0.15 mol/litro	32.3 ml.
--------------------------------------------------	----------

Sol. de KH_2PO_4 0.15 mol/litro	67.7 ml.
-------------------------------------------------	----------

ajustar el pH a 6.4

Solución de ácido tánico 1:20 000

- Pesar 0.1 g de ácido tánico y se disuelven en 100 ml. de -
SSAF pH 7.2 (dilución 1:1 000).

Para preparar la dilución 1:20 000, se toman 2 ml. de la -
solución anterior y se agregan 38 ml. de SSAF pH 7.2
SSAF pH 7.2 adicionada al 1% de suero normal de conejo.

Método:

Tratamiento de glóbulos rojos con ácido tánico:

- Los glóbulos rojos suspendidos en citrato de sodio 3.8 %, -
se lavan tres veces con SSAF pH 7.2, centrifugando a 2000 -
rpm durante 15' cada vez.

- Se mide el paquete celular y se hace una suspensión de 2.5%
agregando 4 ml. de SSAF pH 7.2, por cada 0.1 ml. de paquete

de glóbulos rojos.

- En un tubo de ensayo se toman 4 ml. de la suspensión de eritrocitos al 2.5% cuidando que la suspensión este perfectamente homogénea.
- Se agrega un volumen igual de ácido tánico 1:20 000.
- Se incuba la mezcla en baño de agua a 37°C durante 15'.
- Se centrifuga a 2000 rpm durante 5', se retira el sobrenadante con una pipeta capilar.
- Se resuspende en SSAP pH 7.2 y se vuelve a centrifugar 5'.
- Se retira el sobrenadante y se resuspende el paquete de glóbulos rojos en 4 ml. de SSAP pH 6.4, para tener nuevamente la suspensión al 2.5%

Sensibilización de los eritrocitos con antígenos:

- Los eritrocitos tratados con ácido tánico se sensibilizan agregando un volumen igual de la dilución óptima de antígeno en SSAP pH 6.4; tomar 2 ml. de la suspensión de células tratadas con ácido tánico al 2.5% y agregar 2 ml. de la dilución óptima de antígeno.
- Incubar la mezcla en baño maría a 37°C durante 15'.
- Centrifugar durante 5' a 2000 rpm.
- Decantar el sobrenadante y lavar las células dos veces por centrifugación a 2000 rpm por 5' con SSAP pH 7.2 con suero de conejo al 1%.
- Centrifugar nuevamente durante 10' para obtener el paquete de glóbulos rojos.
- Se ajusta el paquete de células al 1.5%, resuspendiendo en 3.3 ml. de SSAP pH 7.2 adicionada de suero normal de conejo
- Los 2 ml. de eritrocitos tratados con ácido tánico sin sensibilizar, se ajustan a una concentración de 1.5%, en SSAP pH 7.2 adicionada de suero normal de conejo; centrifugar, retirar el sobrenadante y agregar 3.3 ml. de SSAP pH 7.2 a-

dicionada de suero normal de conejo.

Determinación de la concentración óptima del antígeno.

- Se preparan diluciones del antígeno en SSAF pH 6.4, por ej. 1:20, 1:40; 1:80, 1:160, etc.
- Se sensibilizan los glóbulos rojos con cada dilución de antígeno como se indicó anteriormente.
- Se prueba con un suero positivo y otro negativo, cada una de las suspensiones de eritrocitos sensibilizados con las diferentes diluciones del antígeno. La más baja dilución del antígeno que proporcione el título más elevado con el suero inmune y no reaccione con el suero negativo, se considerará el óptimo.

Desarrollo de la prueba:

- Se inactivan los sueros problema a 56°C durante 30' para descomplementar.
- En todas las excavaciones de la placa de microtitulación se agrega con una micropipeta 0.05 ml. de SSAF pH 7.2 con suero normal de conejo al 1%.
- Se carga el microdilutor con 0.05 ml. de suero problema y colocarlo en la primera poza; mezclar perfectamente y transferir 0.05 ml. a la poza siguiente y así sucesivamente hasta la última poza de la hilera donde se descartan 0.05 ml.
- Se coloca la placa en el agitador Boherner de 1 a 3'.
- Se deja reposar la placa a temperatura ambiente durante 2 a 3 horas.
- Hacer la lectura.

Controles requeridos:

Control del diluyente:

- Se depositan 0.025 ml de SSAF pH 7.2 adicionada de 1% de suero

ro normal de conejo en una hilera de pozas y se agrega .025 ml. de la suspensión de células sensibilizadas al 1.5%, en estas pozas no deberá observarse aglutinación.

Control de suero:

- Se prueban las mismas diluciones del suero problema con eritrocitos sin sensibilizar para ver la presencia de anticuerpos heterófilos.
- Se hacen las mismas diluciones del suero control positivo y se agregan 0.025 ml. de eritrocitos sensibilizados a cada una de las pozas.
- Se realiza la misma operación con un suero negativo conocido.

Interpretación:

- La dilución más alta de suero que muestra una clara hemaglutinación, se considera como punto final de la reacción y representa el título de anticuerpos.
- Se debe obtener en cada prueba un valor aproximado al título del suero control positivo y no debe haber reacción en ninguna de las pozas con el suero negativo.
- Las diluciones del suero problema no deben presentar reacción de aglutinación, con los eritrocitos sin sensibilizar.
- Si existe aglutinación, la prueba se repite con el suero previamente adsorbido con eritrocitos de carnero sin sensibilizar. (40)

La reactividad inmunológica de los antígenos fue de terminada por hemaglutinación indirecta (HI), donde la dilución óptima más baja se encontró en los antígenos somático in completo y de excreciones y secreciones (ASI, AES) con 1:40 y 1:160 respectivamente (cuadro II); también se observa que los antígenos somático completo, de fluido vesicular y de escólex (ASC, APV y AEX) presentan la dilución óptima más alta 1:640 y para el antígeno de pared vesicular (APV) 1:320 dando títulos de dilución de anticuerpos de 1:1024 a 1:4096, utilizando como control positivo suero inmune de conejo obtenido mediante la inoculación de un homogenado de cisticercos completos con SSI al 0.85% en alícuotas de 0.5 ml. mezcladas con 0.5 ml. de adyuvante completo de Freund, siguiendo el esquema de inmunización descrito anteriormente.

C U A D R O II

TITULO DE DILUCION DE ANTIGENOS Y ANTICUERPOS EN HEMAGLUTINACION INDIRECTA DE LOS SEIS ANTIGENOS DE C. OLLILOSAR.

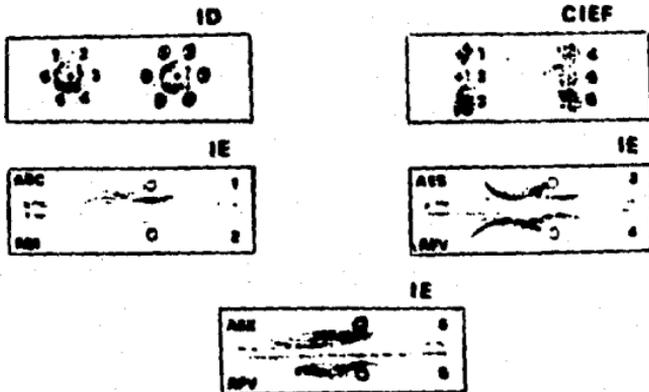
ANTIGENO	DILUCION DEL ANTIGENO	DILUCION DEL SUERO.
A S C	1 : 640	1 : 2048
A S I	1 : 40	1 : 2048
A E S	1 : 160	1 : 4096
A F V	1 : 640	1 : 4096
A E X	1 : 640	1 : 1024
A P V	1 : 320	1 : 2048

La respuesta humoral en suero se detectó utilizando las siguientes técnicas: inmunodifusión (ID), inmunoelectroforesis (IE) y contraelectroforesis (CIEF) después de cada inoculación, e indicaron que la respuesta humoral frente a los antígenos somático completo, incompleto, escólex y pared vesicular (ASC, ASI, AEX y APV) aparecía entre la tercera y --- cuarta semana y para los antígenos de fluido vesicular y excreciones y secreciones (APV, AES) la respuesta se presentó en

tre la segunda y tercera semana (figura I), donde se nota que por el método de Ouchterlony (ID) se detecta un mayor número de bandas de precipitación que en la contraelectroforesis (CIEF), esto es debido a que no todos los componentes de los antígenos poseen cargas negativas, bajo las condiciones empleadas, por lo que se considera en base a la propiedad de difusión de los antígenos, que la inmunodifusión (ID) es una técnica más sensible que la contraelectroforesis (CIEF)

En los resultados con la prueba de inmunoelectroforesis (IE), se detectan diferencias entre los antígenos, pero no se puede hacer un análisis exacto del número de sistemas antígeno-anticuerpo de éstos, debido a la proximidad entre los arcos de precipitación que no permitieron distinguir si está presente uno o más sistemas.

FIGURA I



INMUNOPRECIPITACION DE ANTIGENOS
TOTALES

Sin embargo, en el estudio inmunoeléctroforético se pueden hacer las siguientes observaciones:

Tanto el ASC como el ASI muestran diferencias en cuanto al número de arcos de precipitación, esto es debido a la ausencia del fluido vesicular en el ASI, por lo que no induce una respuesta igual a la del ASC.

El APV al reaccionar con el suero inmune y comparar la respuesta que produce con el ASC y el ASI, muestran dos arcos de precipitación con las mismas características que el ASC pero más intensas, confirmando la presencia del fluido vesicular en el ASC y un arco de precipitación similar al ASI debido probablemente a la existencia de residuos de la pared vesicular para producir una respuesta parecida a la del ASI.

El AES presenta el mismo tipo de reacción que el APV y hace pensar en la posible presencia, aún en mínimas cantidades, de fluido vesicular para inducir una respuesta similar.

Los AEX y APV reaccionan de manera parecida al ASI aunque con un mayor número de arcos de precipitación que posiblemente se encontraban presentes en el ASI pero fueron eliminados durante el proceso de extracción, esto demuestra que existe una actividad inmunológica comprometida entre los componentes del suero haciendo notoria la ausencia de arcos de precipitación similares con el APV y el AES.

Es importante notar la existencia de un sistema isoelectrico presente en todos los antígenos debido posiblemente a las condiciones de pH utilizadas en el corrimiento electroforético.

En general, se demuestra que un homogenado total de cisticercos es eficaz para inducir respuesta humoral e identificar a los antígenos como porciones bien definidas del parásito, así como comprobar una respuesta semejante entre ellos.

Después de conocer la actividad antigénica y la concentración química de los antígenos totales, se fraccionaron

las proteínas existentes en los extractos por precipitaciones con $(NH_4)_2SO_4$, de acuerdo a la Tabla I, en concentraciones -- iniciales correspondientes a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, y 90 % con el fin de evitar volúmenes iguales de sal, siguiendo el método descrito anteriormente.

Estas fracciones de proteínas precipitadas con sulfato de amonio, se sometieron a diálisis exhaustiva para excluir los sulfatos presentes y posteriormente determinar el contenido de proteínas de cada fracción, los resultados que se obtuvieron (cuadro III) demuestran que, los antígenos reaccionan de manera semejante al entrar en contacto con la sal -- presentando una mayor concentración de proteínas al iniciar el fraccionamiento pero sin establecer un patrón que relacione el contenido de proteínas insolubles con la cantidad de -- sal agregada ya que ésta varía de acuerdo al antígeno.

CUADRO III

CONTENIDO DE PROTEÍNAS EN LA PRECIPITACIÓN DE ALGUNOS DE LOS TIPOS $NH_4_2SO_4$ DE LOS TIPOS ANTIGENOS DE *BRUCELLA ABORTUS*.

TIPO	PROTEÍNAS EN mg/100 ml	CONCENTRACION DE $NH_4_2SO_4$									PROTEÍNAS EN mg/100 ml
		10	20	30	40	50	60	70	80	90	
1.10	1.81	130	110	100	110	60	110	110	110	110	1.87
1.12	1.17	110	110	110	110	110	110	110	110	110	1.17
1.13	1.11	110	110	110	110	110	110	110	110	110	1.14
1.17	1.10	170	170	170	170	170	170	170	170	170	1.10
1.18	1.14	110	110	110	110	110	110	110	110	110	1.17
1.17	1.81	110	110	60	110	110	60	110	60	60	1.87

En esta tabla se muestra el contenido de proteínas en los extractos de los tipos de *BRUCELLA ABORTUS* en mg/100 ml. La concentración de proteínas en los extractos de los tipos de *BRUCELLA ABORTUS* en mg/100 ml. Se muestra el contenido de proteínas en mg/100 ml.

La reactividad antigénica de estas fracciones obtenidas en la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se detectó por inmunodifusión (ID), inmunolectroforesis (IE) y contraelectroforesis (CIEF) utilizando como control positivo suero inmune de conejo obtenido mediante inmunización previa.

En el caso del antígeno somático completo (ASC), figura II, la respuesta en inmunodifusión (ID) indicó la presencia de dos sistemas antígeno-anticuerpo entre las fracciones 10 y 80 y un sólo sistema para la fracción 90 en comparación con la respuesta del antígeno total y el residuo de la muestra de antígeno precipitado, lo que demostró la antigenicidad

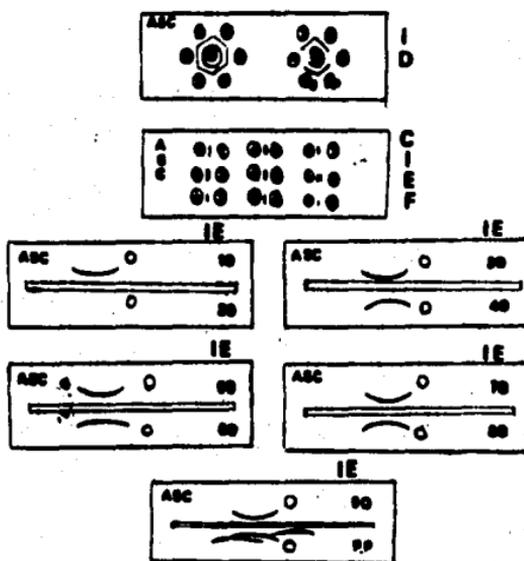


FIGURA II

de las proteínas existentes en las fracciones y por la reacción en contraelectroforesis (CIEF) que poseen carga negativa, en inmunoelectroforesis (IE) se separó un sistema antígeno-anticuerpo de manera semejante en todas las fracciones con excepción de la fracción 20, debido posiblemente a que las proteínas que contiene sean muy solubles y se hubiesen desplazado rápidamente distribuyéndose a lo largo de la placa durante el tiempo de corrimiento electroforético de manera que la concentración del antígeno no fué suficiente para formarse la reacción.

Los resultados obtenidos para detectar la actividad

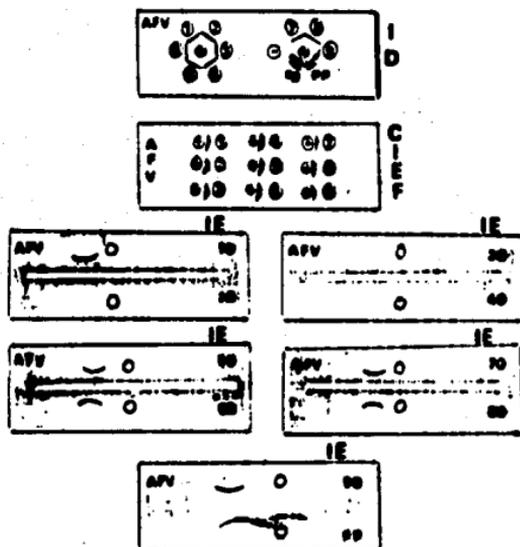


FIGURA III

antigénica de las fracciones separadas del antígeno de fluido vesicular (AFV), figura III, demostraron que en inmunodifusión (ID) todas las fracciones contienen proteínas con la propiedad de difundir y precipitar al encontrarse con el anticuerpo específico, guardando una relación de identidad entre ellas como con el antígeno total y el antígeno precipitado; por la respuesta en CIEF estas proteínas demostraron tener cargas negativas y en IE los resultados presentaron un sistema antígeno-anticuerpo para las fracciones 10,50,60,70,80 y 90, en las fracciones 20, 30 y 40 la ausencia de arcos de precipitación posiblemente sea debido a la solubilidad de las proteínas que contienen.

En el antígeno de escólex (AEX), figura IV, los re-

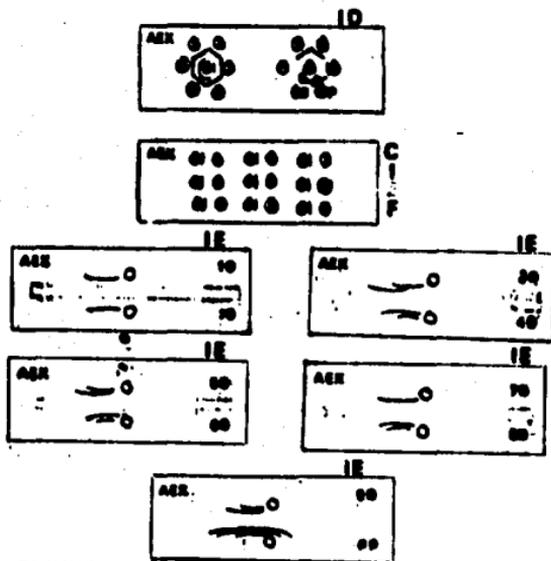


FIGURA IV

sultados demostraron que todas las fracciones en relación con el antígeno total y de la muestra precipitada contienen dos sistemas antígeno-anticuerpo en ID y por la respuesta en CIEF tienen carga negativa, en IE se aislaron dos sistemas para -- las fracciones 30, 40, 50, 60, 80 y 90, y un sistema en las fracciones 10, 20 y 70.

De acuerdo a estos resultados, los antígenos somático completo, de fluido vesicular y de escólex (ASC,AFV y AEX) guardan una estrecha relación en sus respuestas debido a los componentes que los forman; en IE, el antígeno de fluido vesicular (AFV) presenta un arco de precipitación corto, bien definido y característico que por el contenido de proteínas puede ser debido a un mismo componente antigénico presente en todas las fracciones (cuadro III); en los antígenos somático completo y de escólex (ASC,AEX) el contenido de proteínas es variada, sin embargo, las fracciones presentan arcos de precipitación semejantes, aunque el AEX posea mayor reactividad antigénica y por tanto un mayor número de arcos de precipitación, puede suponerse que la respuesta en el ASC se deba en parte a los escólices y en otra al fluido vesicular, dando en conjunto una respuesta, además de que el contenido de proteínas en el ASC es menor que en el AEX, definitivamente el método de extracción utilizado para la obtención del antígeno somático completo (ASC) influye en la actividad antigénica de éste, de tal manera que el antígeno de fluido vesicular (AFV) y el antígeno de escólex (AEX) presentan una mayor reactividad antigénica.

Las respuestas en la detección de la actividad antigénica de los antígenos somáticos incompleto, de excreciones y secreciones y de pared vesicular (ASI,AES y APV) se mantuvo de manera semejante en el caso del ASI el contenido de proteínas (cuadro III) es muy baja y en las fracciones 30, 50, 70 y

90 no son detectables por el método de Lowry, en la actividad antigénica de estas fracciones (figura V) la respuesta en ID es muy débil después de 48 horas y en la tinción de placas pasan inadvertidas, en CIEF las bandas de precipitación se perciben débilmente con carga negativa y en IE la respuesta sólo se lleva a cabo con la muestra precipitada de antígeno y las fracciones no se detectan, aún en las fracciones 10 y 40 con 200 y 130 mcg/ml de proteínas respectivamente, posiblemente estas proteínas corresponden a la pared vesicular de los cisticercos y sean solubles, además que éste antígeno también se obtuvo por el método de sacarosa-acetona de manera que su actividad antigénica se vea disminuida.

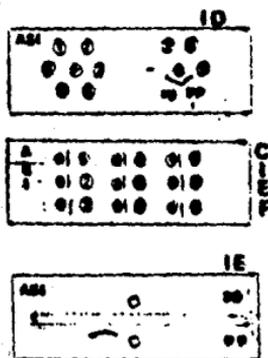


FIGURA V

El AES está constituido por los productos intermedios del metabolismo del parásito de tal manera que el contenido de proteínas (cuadro III) en las fracciones separadas

de la precipitación con sulfato de amonio presentan concentraciones bajas, debido a que éstas proteínas tienen la característica de ser solubles, en la ID se observa la formación de un sistema antígeno-anticuerpo en relación con el antígeno total y la muestra de antígeno precipitado, en CIEF la respuesta indica que éstos sistemas están trabajando con cargas negativas, en IE la respuesta sólo se detectó en el antígeno precipitado con lo que se confirma la solubilidad de las proteínas presentes en las fracciones, figura VI.

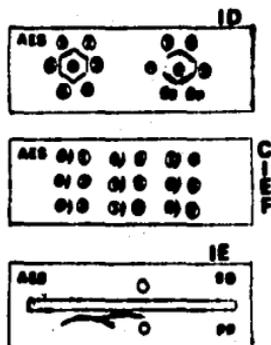


FIGURA VI

La respuesta en ID del antígeno de pared vesicular (APV) presenta la formación de dos sistemas antígeno-anticuerpo en las fracciones 10 a 60, en tanto que las fracciones 70, 80 y 90 resultaron negativas, en CIEF la respuesta es muy débil para todas las fracciones lo que permite suponer que las proteínas presentes en las fracciones 70 y 80 que no son de--

tectables por el método de Lowry poseen cargas negativas, pero su capacidad de difusión es nula, en IE las fracciones dan respuesta negativa con excepción del antígeno que presenta -- dos sistemas antígeno-anticuerpo, figura VII, el contenido de proteínas (cuadro III) es muy bajo, debido posiblemente a que son muy solubles por pertenecer a la pared vesicular del parásito.

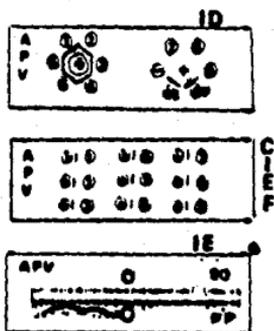


FIGURA VII

En general, los antígenos somático completo, de fluido vesicular y de escólex (ASC, APV y AEX) demostraron tener una mayor reactividad antigénica en la primera etapa de purificación.

En cuanto al título de dilución de las fracciones obtenidas en el antígeno somático incompleto, de excreciones y secreciones y de pared vesicular (ASI, AES y APV) las diluciones más bajas en todas las fracciones estuvo entre 1:40 a

1:80 para el título más alto de dilución de anticuerpos entre 1:2 a 1:8, en tanto que, para las muestras precipitadas de cu da antígeno la dilución más alta de anticuerpos se presentó - en 1:4 para el ASI, en 1:256 para el AES y 1:2048 para el APV estos resultados se expresan en el cuadro IV-A.

CUADRO IV "A"

TÍTULO DE DILUCIÓN DE ANTÍGENOS Y ANTICUERPOS EN HEMAGLUTININACIÓN INDIRECTA DE LOS ANTÍGENOS PRECIPITADOS.

No. Pdo.	A S I		A E S		A P V	
	Dilución Antígeno	Dilución Suero	Dilución Antígeno	Dilución Suero	Dilución Antígeno	Dilución Suero
10	1:80	1:8	1:80	1:4	1:80	1:2
20	1:80	1:2	NEGATIVO		1:80	1:4
30	NEGATIVO		NEGATIVO		1:80	1:4
40	1:40	1:2	NEGATIVO		1:80	1:4
50	NEGATIVO		NEGATIVO		1:80	1:2
60	1:80	1:2	1:40	1:2	NEGATIVO	
70	1:80	1:2	1:80	1:2	NEGATIVO	
80	1:80	1:4	1:80	1:4	NEGATIVO	
90	NEGATIVO		1:80	1:4	1:80	1:2
Ag. pp.	1:80	1:4	1:40	1:256	1:80	1:2048

En el antígeno somático completo, de fluido vesicular y de escólex (ASC, APV y AEX) el título más bajo en la dilución de las fracciones estuvo entre 1:20 a 1:80 con un título más alto de anticuerpos de 1:4 a 1:2048, (cuadro IV-B) donde se observa que las muestras de antígeno precipitadas tienen una dilución entre 1:20 a 1:80 con títulos de dilución de anticuerpos entre 1:1024 a 1:4096. En estas fracciones sólo se practicó hemaglutinación indirecta (HI) a las que presentan una mayor reactividad en inmunoprecipitación, tomando en cuenta también el contenido de proteínas (cuadro III).

De acuerdo a las características de las fracciones separadas en los procesos anteriores, se eligió una resina catiónica sintética a base de estireno y divinilbenceno (X-805) de Amberlita IR-120, resina de adición que trabaja con $-SO_3^-$ como ión fijo utilizando como ión intercambiabile NH_4^+ , con un mallaje de 20 a 50 (0.90 - 0.30 mm) para separar los componentes antigénicos de las fracciones por intercambio iónico, en columna K 9/30 siguiendo el método descrito anteriormente.

CUADRO IV "B"

TITULO DE DIFUSION DE ANTIGENOS Y ANTICUEROS EN HEMAGLUTINACION INDIRECTA DE LOS ANTIGENOS PRECIPITADOS.

No. Fdo.	A B C		A P Y		A X X	
	Dilución Antígeno	Dilución Suero	Dilución Antígeno	Dilución Suero	Dilución Antígeno	Dilución Suero
10	1 : 80	1 : 4	1 : 20	1 : 256	1 : 80	1 : 512
20	1 : 80	1 : 16	N. D.		1 : 40	1 : 2048
30	N. D.		N. D.		1 : 40	1 : 1024
40	N. D.		N. D.		N. D.	
50	N. D.		N. D.		N. D.	
60	N. D.		N. D.		N. D.	
70	N. D.		1 : 64	1 : 4	N. D.	
80	N. D.		1 : 80	1 : 128	N. D.	
90	N. D.		N. D.		N. D.	
Ag. PZ.	1 : 80	1 : 1024	1 : 80	1 : 4096	1 : 80	1 : 2048

Las fracciones obtenidas de cada antígeno que resultaron tener una mayor reactividad antigénica en la primera etapa de purificación, se seleccionaron para fraccionarlas por columna empacada con Amberlita IR-120, tomando como base los resultados obtenidos en hemaglutinación indirecta (HI) por ser la técnica utilizada más sensible; en el caso del antígeno somático incompleto (ASI) las fracciones 10 y 80, del

antígeno de excreciones y secreciones (AES) fracciones 10 y 80, del antígeno de pared vesicular (APV) fracciones 20 y 30, (cuadro IV-A); del antígeno somático completo (ASC) fracciones 10 y 20, del antígeno de fluido vesicular (AFV) fracciones 10 y 80 y del antígeno de escólex (AEX) fracciones 20 y 30 (cuadro IV-B), así como las muestras de cada antígeno precipitado, utilizando 1 ml. de cada fracción y cada antígeno para eluirlos en 60 ml. de solución amortiguada de acetatos - pH 7.2, en 40 gotas por minuto, recolectando 4 ml. por tubo.

Las fracciones colectadas se reconcentraron para leer el contenido de proteínas a 280 nm., en el caso del ASC, gráfica 1, el perfil cromatográfico correspondiente a la muestra de antígeno precipitado (ASC pp) mostró la presencia de cinco componentes proteicos, la fracción de ASC 20 presenta cuatro componentes proteicos de manera semejante al ASC pp y un componente distinto, en la fracción de ASC 10 se encontraron dos componentes proteicos similares al ASC pp.

En el perfil cromatográfico del antígeno somático incompleto (ASI), gráfica 2, se encontró un componente proteico de forma semejante tanto para el antígeno precipitado como para las fracciones de ASI 10 y ASI 80.

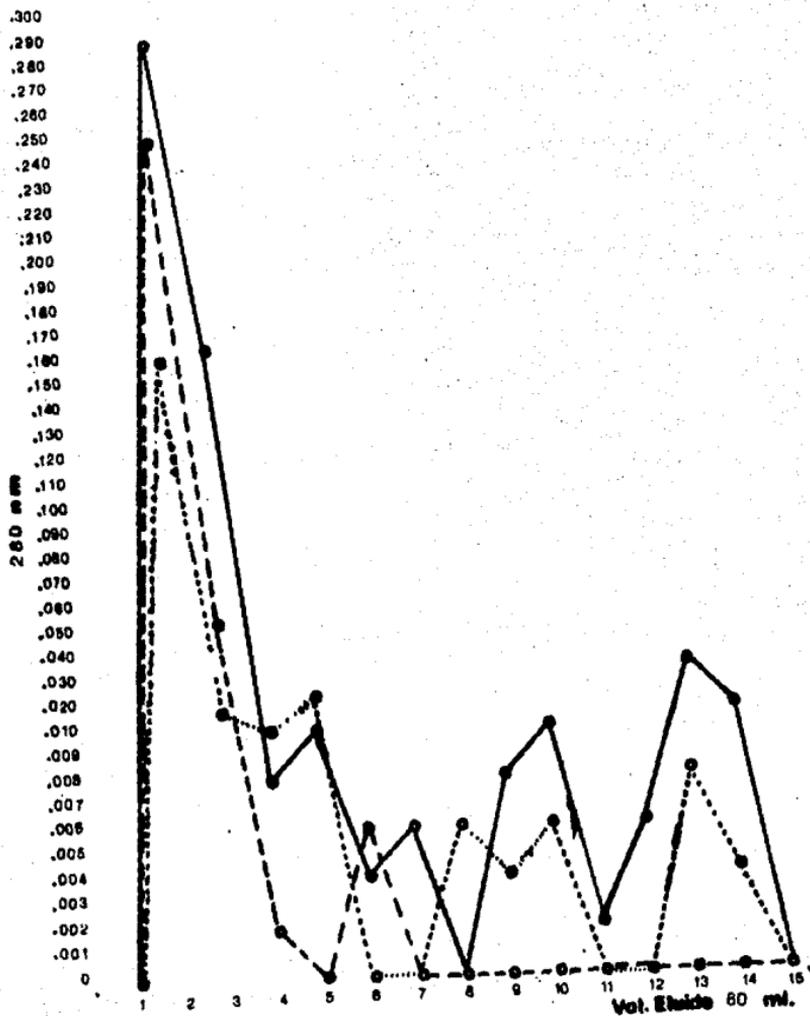
El menor contenido de proteínas se detectó en el perfil cromatográfico del antígeno de excreciones y secreciones (AES), gráfica 3, donde se encontraron cuatro componentes proteicos para el antígeno precipitado (AES pp) y en las fracciones de AES 10 y AES 80 se encontraron tres componentes proteicos de los cuales dos son similares a los dos primeros componentes del AES pp y un componente final de característica distinta.

En el antígeno de pared vesicular (APV), gráfica 4, se detectó un componente proteico semejante entre el antígeno precipitado (APV pp) y las fracciones de APV 20 y APV 30, con

GRAFICA 1

A.S.C.

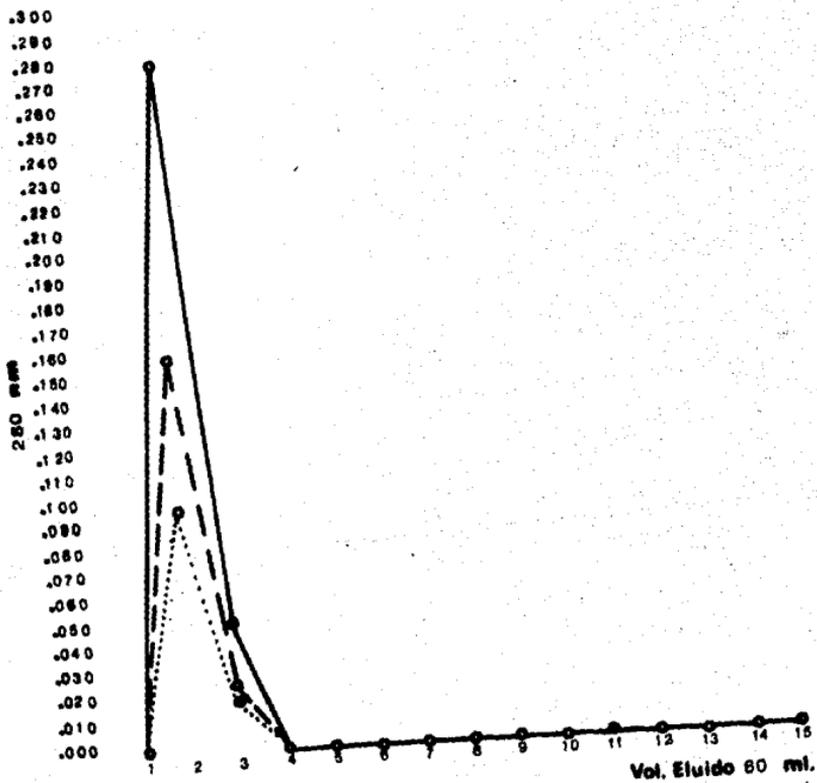
frac 10 - - - - -
 frac 20
 Ag. pp. ————



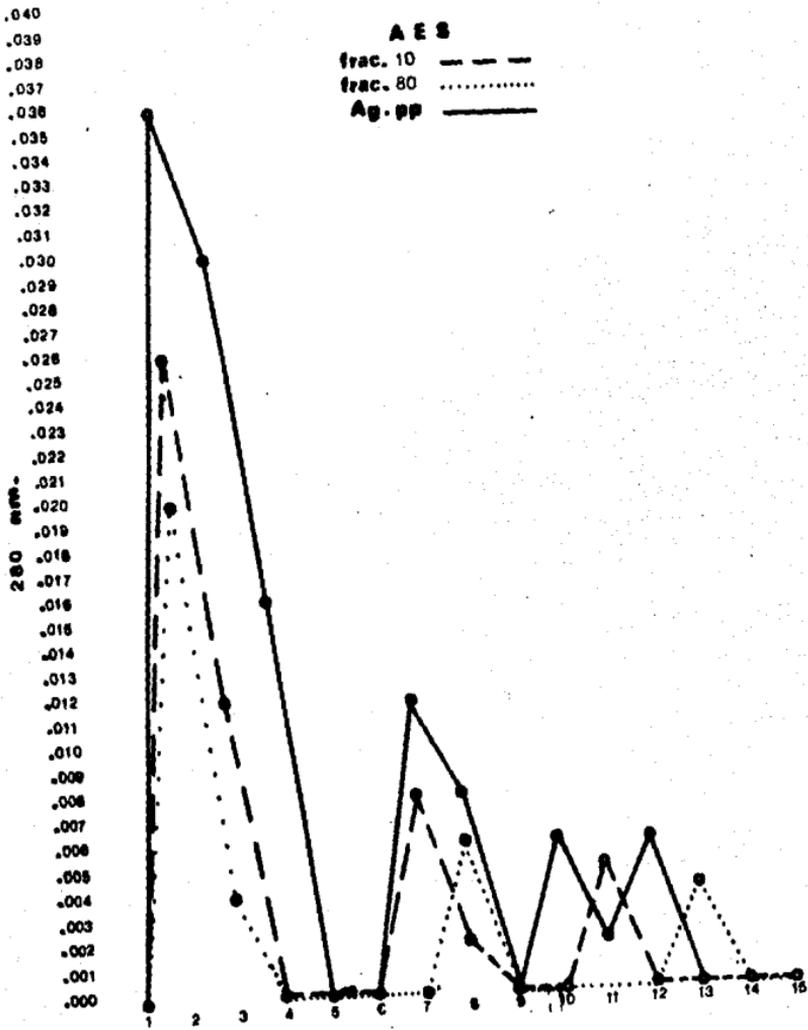
GRAFICA 2

ASI

frac. 10 - - - - -
frac. 80
Ag. pp ————



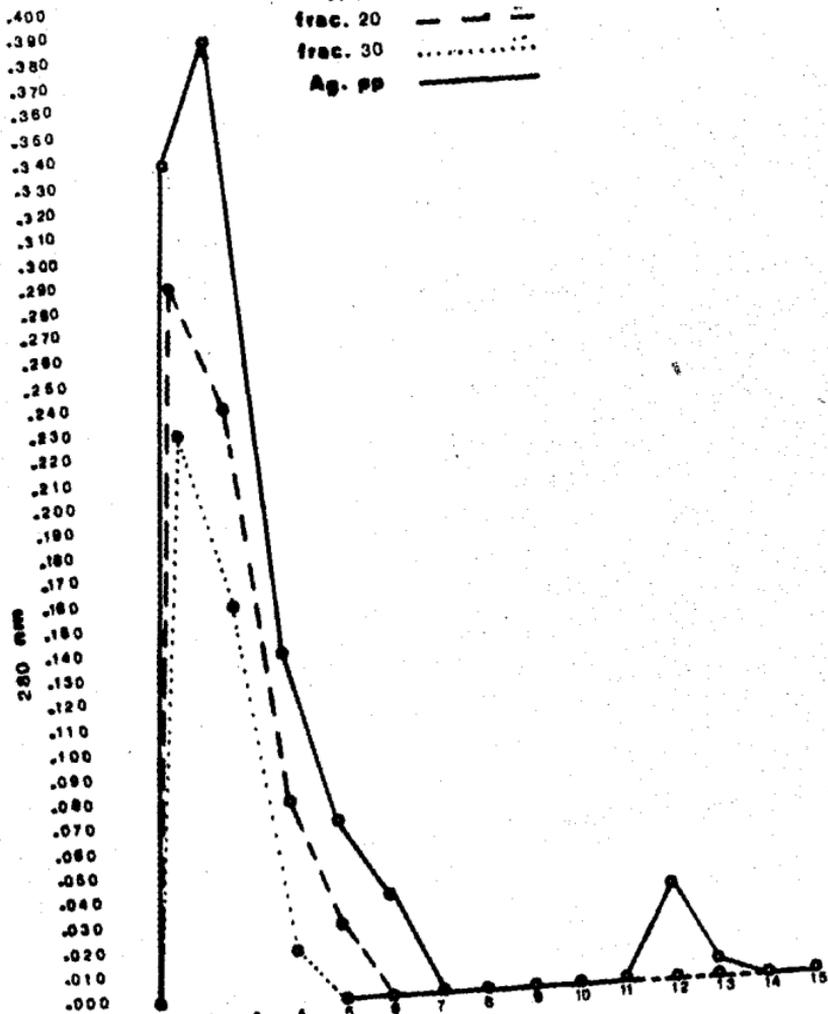
GRAFICA 3



Vol. Eluido 60 ml.

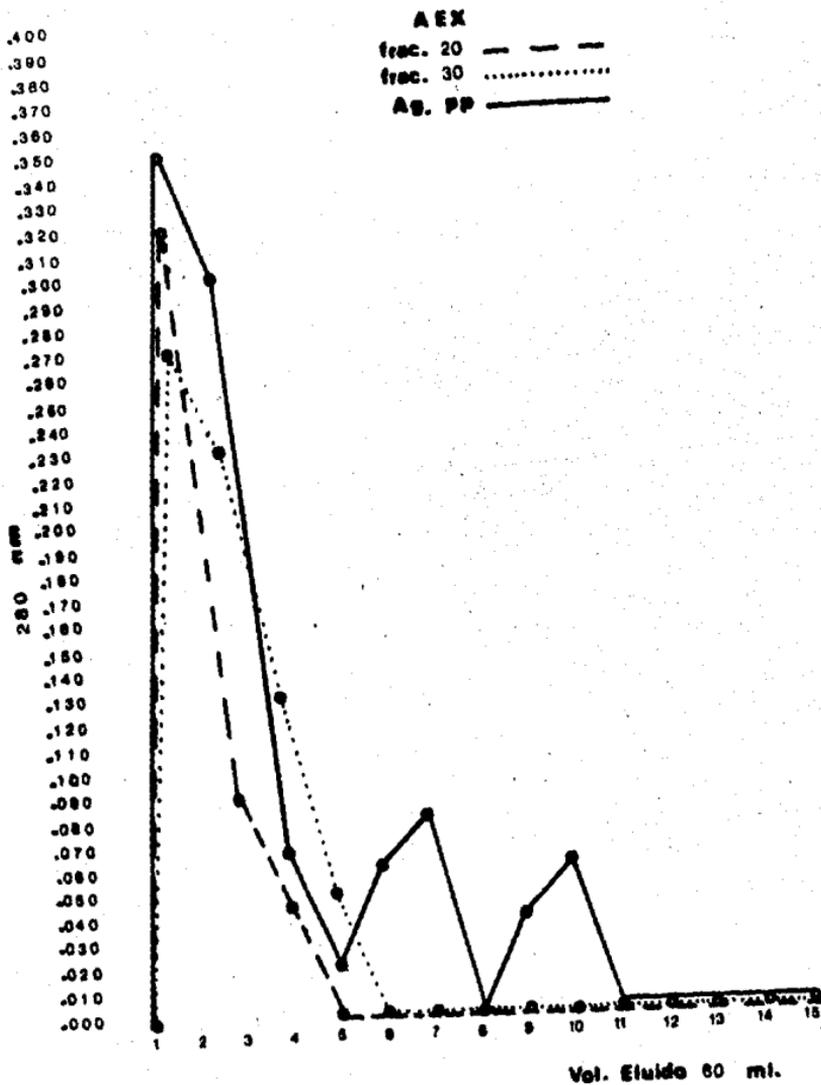
GRAFICA 4

A P V
frac. 20 ---
frac. 30
Ag. pp ———



Vol. Eluido 60 ml.

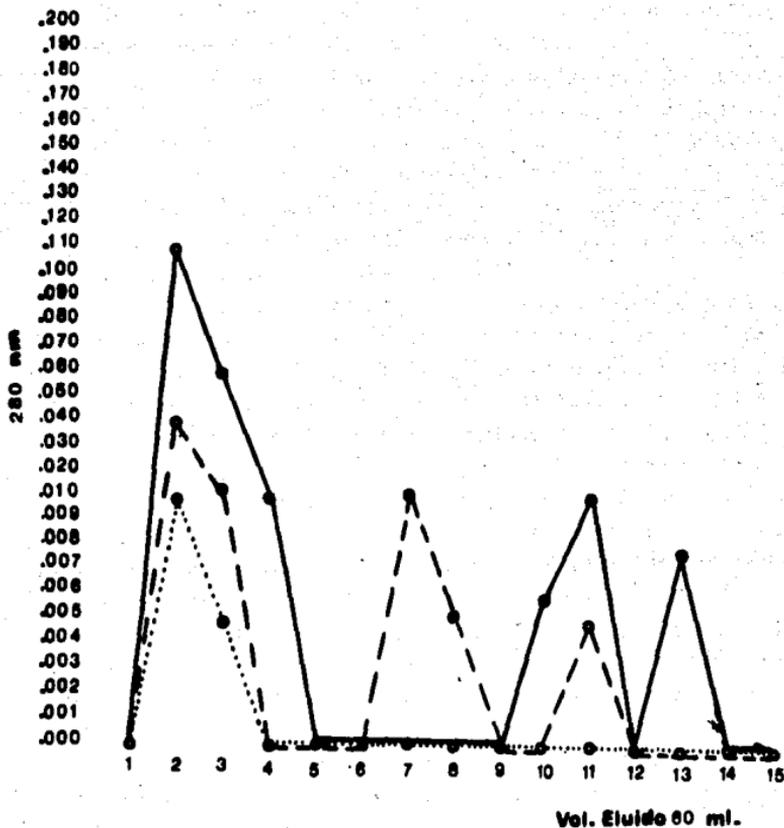
GRAFICA 5



GRAFICA 6

AFV

frac. 10 - - - - -
frac. 60
Ag. pp - - - - -



un componente proteico aislado en el APV pp, este perfil cromatográfico tiene las mismas características que el obtenido para el antígeno somático incompleto (ASI), gráfica 2.

El perfil cromatográfico correspondiente al antígeno de escólex (AEX), gráfica 5, mostró tres componentes proteicos para el antígeno precipitado (AEX pp) y un componente para las fracciones de AEX 20 y AEX 30 de forma semejante al primer componente del antígeno precipitado.

En el caso del antígeno de fluido vesicular (AFV), gráfica 6, el perfil cromatográfico del antígeno precipitado AFV pp, presentó tres componentes proteicos, en tanto que, la fracción de AFV 10 mostró tres componentes de los cuales sólo uno se identifica con el AFV pp y en la fracción de AFV 80 se encontró un componente proteico similar al primer componente del antígeno precipitado AFV pp.

La actividad antigénica de los componentes proteicos de las muestras de antígenos precipitados, se probó en inmunoprecipitación (figura VIII), donde solamente los tubos correspondientes al primer componente proteico, gráficas 1 al 6 del perfil cromatográfico de cada antígeno, presentaron respuesta; en la prueba de inmunodifusión (ID), se detectó la formación de dos sistemas antígeno-anticuerpo de manera semejante pero de mayor intensidad en los tubos número 2 que en los tubos número 3, lo que demuestra la posibilidad de tratarse de una proteína idéntica, en inmunoelectroforesis (IE), el número de sistemas antígeno-anticuerpo disminuyó en relación con los extractos crudos y con poca variación respecto a la primera etapa de purificación (precipitación con sulfato de amonio).

En base a los resultados en ID las muestras que se probaron en IE corresponden a los tubos número 2, correspondientes a los antígenos precipitados.

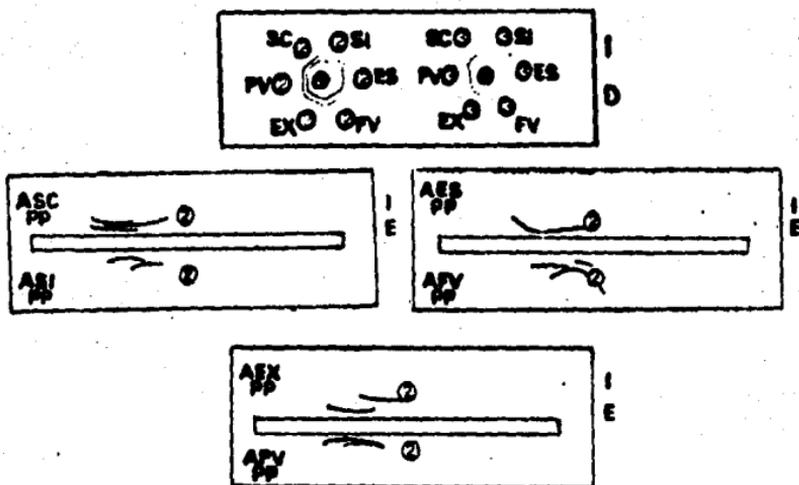


FIGURA VIII

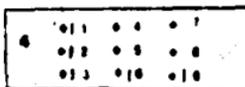
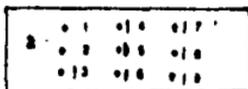
Los tubos seleccionados que corresponden a cada una de las fracciones de antígenos, no presentaron respuesta en inmunodifusión (ID) y en inmunoelectroforesis (IE), posiblemente esto sea debido a la diferencia de concentración entre las fracciones colectadas y el control positivo utilizado en las pruebas lo que podría interferir en la difusión de las proteínas de manera que la formación del sistema antígeno-anticuerpo sea muy rápida y pase inadvertida.

En contraimmunoelectroforesis (CIEF), figura IX, se detectó respuesta en los tubos número 2 de las fracciones de ASC 10, ASC 20, AEX 20, AFV 10 y AFV 80, en la fracción de AEX 30 la respuesta se detectó en el tubo número 3, además de los tubos número 2 de los antígenos precipitados.

En cuanto al título de dilución de las fracciones y de los antígenos precipitados (cuadro V) las diluciones más -

FIGURA IX

CONTRAIMMOELECTROFESIS A FRACCIONES



Laminilla "2"

- 1.- Tubo 2 de APV 20
- 2.- Tubo 2 de APV 30
- 3.- Tubo 2 de APV pp
- 4.- Tubo 2 de AEX 20
- 5.- Tubo 3 de AEX 30
- 6.- Tubo 2 de AEX pp
- 7.- Tubo 2 de AFV 10
- 8.- Tubo 2 de AFV 80
- 9.- Tubo 2 de AFV pp

Laminilla "4"

- 1.- Tubo 2 de ASC 10
- 2.- Tubo 2 de ASC 20
- 3.- Tubo 2 de ASC pp
- 4.- Tubo 2 de ASI 10
- 5.- Tubo 2 de ASI 80
- 6.- Tubo 2 de ASI pp
- 7.- Tubo 2 de AES 10
- 8.- Tubo 2 de AES 80
- 9.- Tubo 2 de AES pp

bajas fueron para los antígenos somático completo y somático incompleto de 1:20 para el título más alto de anticuerpos entre 1:64 y 1:256, en tanto que los demás antígenos tuvieron un título de dilución de 1:40 para un título de anticuerpos entre 1:64 y 1:512.

El título de dilución de todas las fracciones de antígenos es de 1:10 para obtener un título óptimo de anticuerpos entre 1:512 y 1:1024.

Estos resultados demuestran que, por la metodología empleada es posible obtener a partir de los extractos crudos o antígenos totales de *Cysticercus cellulosae*, fracciones proteicas antigénicamente más reactivas, con cierta pureza para ser utilizadas en el diagnóstico de la cisticercosis humana, ya que se ha comprobado su actividad antigénica a bajas concentraciones de proteínas, lo que aumenta la sensibilidad en las pruebas inmunoserológicas.

C U A D R O V

TITULO DE DILUCION DE ANTIGENOS FRACCIONADOS Y DE ANTICUERPOS
POR HEMAGLUTINACION INDIRECTA.

ANTIGENO FRACCIONADO	DILUCION DEL ANTIGENO	DILUCION DEL SUERO.
ASC 10-2	1 : 10	1 : 1024
ASC 20-2	1 : 10	1 : 512
ASC pp-2	1 : 20	1 : 256
ASI 10-2	1 : 10	NEGATIVO
ASI 80-2	1 : 10	NEGATIVO
ASI pp-2	1 : 20	1 : 64
AES 10-2	1 : 10	NEGATIVO
AES 80-2	1 : 10	NEGATIVO
AES pp-2	1 : 40	1 : 64
APV 20-2	1 : 10	NEGATIVO
APV 30-2	1 : 10	NEGATIVO
APV pp-2	1 : 40	1 : 512
AEX 20-2	1 : 10	1 : 1024
AEX 30-3	1 : 10	1 : 1024
AEX pp-2	1 : 40	1 : 512
APV 10-2	1 : 10	1 : 512
APV 80-2	1 : 10	1 : 512
APV pp-2	1 : 40	1 : 512

CAPITULO IV.

RESUMEN Y CONCLUSIONES.

La cisticercosis humana es una parasitosis producida por el estado larvario de Taenia solium (Cysticercus cellulosae), de distribución cosmopolita, es una enfermedad de difícil diagnóstico debido a varios factores, entre ellos, la capacidad del parásito de adaptarse al huésped, la falta de sensibilidad, reactividad y especificidad de las pruebas inmunoserológicas utilizadas y a la gran variedad de síntomas que presenta la enfermedad.

Entre los factores que contribuyen a esta variabilidad en la sintomatología, están los estados agudos o crónicos de la infección debidos a las etapas de maduración del cisticerco, el número de parásitos, su localización y la reacción de la estructura cerebral a la presencia del cisticerco; Lombardo y Mateos (37), en base a la variedad de síntomas y a la localización anatómica del parásito clasifican la cisticercosis en cuatro grupos: 1) Casos asintomáticos, 2) con signos localizados, 3) con incremento de presión intracraneal y 4) - los tipos mixtos (signos localizados con incremento de la presión intracraneal).

La baja utilidad diagnóstica de las pruebas inmunoserológicas en la cisticercosis humana posiblemente se deba al uso de extractos crudos o antígenos totales de Cysticercus cellulosae, ya que algunas de estas sustancias antigénicas -- que pertenecen al soma del parásito no inducen la producción de anticuerpos durante su fase evolutiva sino hasta que entra en degeneración, pero que están presentes en los extractos obtenidos del parásito, además de que pueden producir ciertas reacciones cruzadas o inespecíficas al compartir determinan--

tes antigénicos con otros parásitos, por lo que es necesario contar con antígenos más específicos que podrían dar como resultado un aumento en la reactividad antigénica, lo que proporcionaría una mayor confiabilidad diagnóstica a estas pruebas (30).

Este trabajo se realizó con la finalidad de aislar la fracción o fracciones antigénicamente más reactivas a partir de seis antígenos de Cysticercus cellulosae, (ASC, ASI, - AES, APV, AEX y APV) por intercambio iónico en columna utilizando resina de Amberlita catiónica tipo macrorreticular, para su posterior estandarización en técnicas inmunoserológicas tales como hemaglutinación indirecta e inmunoprecipitación y su posible aplicación en el diagnóstico de la cisticercosis humana.

Para llevar a cabo el estudio, se analizó la composición química de los antígenos utilizados; los resultados mostraron que la concentración de proteínas, determinadas por el método de Lowry, fué de 0.87 y 2.00 mg/ml y los carbohidratos determinados por el método de la Antrona, fué de 0.40 a - 1.10 mg/ml (cuadro I) después del proceso de diálisis, donde se demostró que el método de sacarosa-acetona (40) no es eficaz para la purificación de los antígenos somático completo e incompleto, ya que algunos componentes de estos antígenos se pierden por contaminación al entrar en contacto con la sacarosa y la acetona en el momento de la extracción (30).

Para inducir la respuesta humoral, se preparó un homogenado de cisticercos completos con solución salina estéril al 0.85%, se inocularon conejos mezclando el homogenado con adyuvante completo de Freund.

Con el suero inmune obtenido se determinó la actividad antigénica de cada antígeno mediante técnicas de inmunoprecipitación (figura I), y por hemaglutinación indirecta se

obtuvo un título de dilución de los antígenos entre 1:40 y -- 1:640 para un título de anticuerpos entre 1:1024 y 1:4096 --- (cuadro II).

En base a estos resultados se procedió a precipitar las proteínas de cada uno de los seis antígenos con sulfato de amonio de acuerdo a la Tabla I, determinando en cada precipitación la concentración de proteínas (cuadro III), la reactividad antigénica mediante las técnicas de inmunoprecipitación (figuras II, III, IV, V, VI y VII) y el título de dilución de antígenos y anticuerpos por hemaglutinación indirecta (cuadro IV-A y IV-B).

De la fracción precipitada con sulfato de amonio -- que presentó mayor actividad antigénica en las pruebas inmunoserológicas se tomó 1 ml. para separarla por intercambio iónico en una columna K 9/30 empacada con Amberlita catiónica y se eluyó con un volumen de 60 ml. de solución amortiguada de acetatos pH 7.2, 0.15 M.

Las fracciones colectadas se reconcentraron para de terminar nuevamente la actividad antigénica mediante las pruebas de inmunoprecipitación (figura VIII y IX), se detectó la concentración de proteínas a 280 nm de D.O., los perfiles cromatográficos se reportan en las gráficas No. 1 al 6 y el título de dilución de antígenos y de anticuerpos por hemaglutinación indirecta (cuadro V).

Los resultados obtenidos indican que el procedimiento utilizado puede ser reproducible a grandes escalas y obtener fracciones proteicas de antígenos totales de Cysticercus cellulosae altamente reactivos a bajas concentraciones de proteínas.

En general, la mejor respuesta se detectó en la --- fracción obtenida en el tubo 2 del precipitado total de todos los antígenos (ASC pp-2, ASI pp-2, AES pp-2, AFV pp-2, APV -

pp-2 y AEX pp-2), así como, en las fracciones de los antígenos somático completo correspondiente al precipitado 10 en la fracción colectada en el tubo 2 (ASC 10-2); de fluido vesicular precipitado 80 fracción obtenida en el tubo 2 (AFV 80-2), y de escólex precipitado 30 fracción obtenida en el tubo 3 -- (AEX 30-3), las cuales se proponen para emplearlos en las reacciones inmunológicas.

CONCLUSIONES.

- Se comprobó que los seis antígenos de Cysticercus cellulosa utilizados están constituidos principalmente de proteínas y carbohidratos que son responsables de la antigenicidad del parásito, indudablemente existen otros constituyentes, los cuales no fueron determinados en este trabajo pero posiblemente también influyan en la respuesta inmunológica.
- Se demostró que un homogenado total de Cysticercus cellulosa estimula respuesta inmunológica humoral en conejos, obteniendo anticuerpos específicos que identifican a los antígenos como partes pertenecientes del parásito.
- En la respuesta de la actividad antigénica de los seis antígenos de Cysticercus cellulosa se encontraron sistemas antígeno-anticuerpo comunes entre ellos, sin embargo en los antígenos somático completo e incompleto (ASC y ASI) la respuesta indica la pérdida de componentes antigénicos debido posiblemente al método de sacarosa-acetona, por lo que se pudieran probar otros métodos de extracción.
- Se demostró que la metodología empleada en la extracción de los antígenos de C. cellulosa es reproducible para obtener fracciones purificadas antigénicamente más reactivas a gran escala.
- Las fracciones purificadas demostraron tener actividad antigénica a bajas concentraciones de proteínas.
- Se demostró que las fracciones proteicas obtenidas de los antígenos de esólex y fluido vesicular (AEX y APV) tienen

un comportamiento semejante con el antígeno somático completo (ASC), lo que plantea la posibilidad de que se trate de la misma proteína que este presente tanto en el escólex como en el fluido vesicular del parásito.

- Por otro lado, en los antígenos somático incompleto, de pared vesicular y de excreciones y secreciones (ASI, APV y AES) se observó que, la actividad antigénica (figuras V, VI y VII) y la concentración de proteínas (cuadro III) disminuyeron considerablemente después de ser sometidos a la serie de precipitación con sulfato de amonio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, hasta perder por completo esta actividad en las fracciones colectadas a través de la columna, por lo que se sugiere, debido a la importancia de estos antígenos en el diagnóstico, especialmente del antígeno de excreciones y secreciones, modificar la metodología.
- La mejor respuesta se detectó en la fracción obtenida en el tubo 2 del precipitado total de todos los antígenos (ASC pp-2, ASI pp-2, AES pp-2, APV pp-2, APV pp-2 y AEX pp-2) así como en las fracciones de los antígenos somático completo - correspondiente al precipitado 10 en la fracción obtenida - en el tubo 2 (ASC 10-2); de fluido vesicular precipitado 80 fracción obtenida en el tubo 2 (APV 80-2) y de escólex precipitado 30, fracción obtenida en el tubo 3 (AEX 30-3), los cuales se proponen para su utilización en las reacciones inmunoserológicas.

CAPITULO V.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Acevedo Hernández Antonio.
Epidemiología y control de la cisticercosis porcina y bovina en México.
Zoonosis Parasitarias.
Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
Agosto 1982, U.N.A.M.
- 2.- Albores, S.J. & Altamirano, D.N.
Algunas consideraciones sobre 9,412 autopsias realizadas en el Hospital General de México.
Rev. Inv. Sal. Pub. 31: 1, 1971.
- 3.- Atienza, F.M.; Gómez, G.V. & González, C.J.
Empleo de partículas inertes para el diagnóstico de la cisticercosis ovina. I Prueba de la bentonita.
Rev. Ib. Parasitol. 29 (1): 35-43, 1969.
- 4.- Arambulo, P.V.; Walls, K.W.; Bullock, S. & Wagan, I.
Serodiagnosis of human cysticercosis by microplate enzyme linked immunospecific assay (ELISA).
Acta Tropica 35: 63-67, 1978.
- 5.- Biagi, F.F.; Vélez, G. & Gutierrez, M.
Destrucción de los cisticercos en la carne de cerdo.
Pren. Med. Mex. 5-6: 253-256, 1963.

- 6.- Biagi, F. & Tay, J.
A precipitation reaction for the diagnosis of cysticercosis.
Am. J. Trop. Hyg. 7: 63-65, 1958.
- 7.- Biagi, F.; Navarrete, F.; Pina, A.; Santiago, A. & Tapia, L
Estudio de tres reacciones serológicas en el diagnóstico de la cisticercosis.
Rev. Med. Hosp. Gral. 11-12: 501-508, 1961.
- 8.- Biagi, F.; Briceño, C. & Martínez, B.
Diferencias entre Cysticercus cellulosae y Cysticercus racemosus.
Rev. Biol. Trop. 9 (1): 141-151, 1961.
- 9.- Briceño, C.E.; Biagi, F. & Martínez, B.
Cisticercosis: Observaciones sobre 97 casos de autopsias
Pren. Med. Mex. 26 (5): 193-197, 1961.
- 10.- Botero, D.R. & Castaño, S.M.
Cisticercosis: Tratamiento con Praziquantel.
Tribuna Médica, Marzo (2), 1981.
- 11.- Barret, James T.
Inmunología.
Interamericana México.
1ra. Ed. 3: 38-43, 1970.
- 12.- Carrasco, M.J.
La cisticercosis porcina en el Estado de Sonora.
Sal. Pub. Mex. Vol. 19 (2): 255-261, 1977.

- 13.- Chase, M.W. & Williams, G.A.
Methods in immunology and immunochemistry.
Vols. (1,2,3) Academic Press, Inc., 1967.
- 14.- Costero, I.
Tratado de Anatomía Patológica.
Ed. Atlante, S.A.
Vol. 2: 1485, 1946. México.
- 15.- Craig, C.F. & Faust, E.C.
Parasitología Clínica.
Salvat, S.A. México.
31: 530-536, 1984.
- 16.- De León Chapa Saturnino.
Hipersensibilidad celular en cisticercosis cerebral.
Tesis Profesional Q.F.B.
Fac. Ciencias Químicas.
U.N.A.M. 1981.
- 17.- Dreywood, E.
Qualitative test for carbohydrate material.
Ind. Eng. Chem. Anal. 18: 199, 1946.
- 18.- Flisser, A.; Larralde, C.; Willms, K.; Ortiz, L. & Sala.
The Immunology of human Cysticercosis.
In: Molecules, cell and parasites in Immunology.
Ed. Nueva York. Academic Press. 125, 1980.
- 19.- Flisser, A.; Tarrab, R.; Willms, K & Larralde, C.
Inmunolectroforesis y doble inmunodifusión en el diagnóstico de la cisticercosis cerebral humana.
Arch. Inv. Med. Mex. 6 (1): 1-12, 1975.

- 20.- Flisser, A.; Pérez-Monfort, R. & Larralde, C.
The immunology of human and animal cysticercosis:
a review.
Bull WHO 57 (5): 839-856, 1979.
- 21.- Flisser, A.; Woodhouse, E. & Larralde, C.
Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-
responders.
Clin. Exp. Immunol. 39: 27-37, 1980.
- 22.- Flisser, A.
Inmunología de la cisticercosis.
Curso de actualización en inmunoparasitología Veterinaria.
C.U. 110, 1980. México.
- 23.- Polin, O. & Ciocalteau, V.
On tyrosine and tryptophane determinations in proteins.
J. Biol. Chem. 73: 627, 1927.
- 24.- Gamboa, A.R. & Arroyo, G.M.
Primer caso de cisticercosis cerebral tratado con Predni-
solona.
Rev. Med. Hosp. Gral. Mex. 22: 127-135, 1959.
- 25.- Gamboa, A.R.
Uso de corticoesteroides en la cisticercosis cerebral.
Rev. Fac. Med. Mex. 2: 405-408, 1960.
- 26.- Goldsmith, R.S.; Kagan, I.G.; Reyes, G. & Cedeño, F.
Estudios seroepidemiológicos realizados en Oaxaca.
I. Encuesta de enfermedades parasitarias mediante la -
prueba de hemaglutinación indirecta.
Bol. Sanit. Panam. 71: 500-518, 1971.

- 27.- Gómez, G.V.; Atienza, F.M. & González, C.J.
Empleo de partículas inertes para el diagnóstico de la
cisticercosis ovina: II Prueba de látex.
Rev. Iber. Parasitol. Vol. 29 (2-3): 191-196, 1969.
- 28.- Gómez, G.V.; Atienza, F.M. & González, C.J.
Empleo de partículas inertes para el diagnóstico de la
cisticercosis ovina: III Prueba de hemaglutinación in-
directa.
Rev. Iber. Parasitol. Vol 30 (1): 57-62, 1970.
- 29.- González, B.D. & Vega, V.A.
Ensayo de tratamiento de la cisticercosis con Metrifona-
to.
Rev. Inv. Sal. Pub. Vol. 32 (1): 1-6, 1974.
- 30.- Gómez, P.A.; Morón, G.A. & Beltrán, H.F.
Fraccionamiento de un antígeno crudo de Cysticercus ce-
llulosa.
Sal. Pub. Mex. Vol. 19 (3): 421-430, 1977.
- 31.- Grob, Robert L.
Modern Practice of gas chromatography.
Ed. Willey-Interscience, U.S.A.
10: 535, 1977.
- 32.- Hernández, S.M.; Ramos, M.C. & Téllez, G.E.
Investigación de la cisticercosis porcina en San Luis
Potosí, México.
Bol. Of. Sanit. Panam. 61 (5): 430-432, 1966.

- 33.- Jollés, P. & Paraf, A.
Chemical and Biological Basis of Adjuvants.
Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics.
Vol. 13 (1-4): 1-153, 1953.
- 34.- Kagan, I.G. & Norman, I.
Serodiagnosis of parasitic diseases. In: Manual of clinical immunology.
Amer. Soc. Micro. 51: 382-409, 1976.
- 35.- Kabat Elvin Abraham.
Inmunología experimental.
Pren. Med. Mex. 1968.
- 36.- Lombardo, L.
Tratamiento de la cisticercosis cerebral con Fluobendazole.
IV. Congreso Nal. Parasitol. México, 1980.
- 37.- Lombardo, L.; Mateos, J.H. & Estañol, B.
La cisticercosis cerebral en México.
Simposio Aca. Nal. Med. Vol 118 (1), 1982.
- 38.- Lombardo, L. & Mateos, J.H.
Cerebral Cysticercosis in Mexico.
Neurology, 11: 824, 1961.
- 39.- Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L. & Randal, R.
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193: 265, 1951.

- 40.- Manual de técnicas inmunoserológicas.
Lab. de Immunoparasitología. Depto. Ecología Humana.
Fac. de Medicina. U.N.A.M., 1981.
- 41.- Mazzotti, L.
Datos sobre la cisticercosis en México.
Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. 5 (4): 263-292, 1944.
- 42.- Mazzotti, L.; Colorado, I.R.; Ramírez, J. & Briceño, C.
La fritura como medio profiláctico efectivo para tratar
la carne cisticercosa de cerdo.
Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. 21 (3-4): 119-124, 1961.
- 43.- Mazzotti, L.
Incidencia de Cysticercus cellulosae en cerdos de dife-
rentes localidades de la República Mexicana.
Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. 14 (2): 53-56, 1954.
- 44.- Mazzotti, L.; Dávalos, A. & Martínez, R.
Infecciones naturales y experimentales por Cysticercus
cellulosae en diferentes especies de mamíferos.
Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. 25: 151, 1965.
- 45.- Minczewski, J.; Chwastowska, J. & Dybożyński, R.
Separation and preconcentration, Methods in Inorganic
Trace Analysis.
Ed. Willey and son's.
6: 283-288, 1982.
- 46.- Morris, N.; Proctor, E.H. & Elsdon-Dew, R.
A physico-chemical approach to the serological diagnosis
of cisticercosis.
Jl. S. Afr. Vet. Med. Ass. 39 (4): 41-43, 1968.

- 47.- Morris, D.L.
Quantitative determination of carbohyfrate with Dreywood's
anthrone reagent.
Science. 107: 254, 1948.
- 48.- Nieto, Dionisio.
Diagnóstico de la cisticercosis del Sistema Nervioso;
Fron. Med. Mex. 13: 226-230, 1948.
- 49.- Olivé, I.J. & Angulo, R.P.
Cysticercosis of the Nervous System.
J. Neurosurg. 19: 632, 1962.
- 50.- Powell, J.; Proctor, E.; Wilmot, A. & Barnet, A.M.
Neurological complications of cysticercosis in Africans:
a clinical and serological study.
Annals Trop.Med. Para. Vol. 6 (2): 159-163, 1966.
- 51.- Proctor, E.M. & Elsdon-Dew, R.
Serological test in porcine cysticercosis.
South. Afr. J. Sci. 62: 264, 1966.
- 52.- Proctor, E.M.; Powell, S.J. & Elsdon-Dew, R.
The serological diagnosis of cysticercosis.
Am. Trop. Med. Parasitol. 60: 146, 1966.
- 53.- Rabiela, M.T.; Rivas, H.A. & Rodriguez, J.
Consideraciones anatomopatológicas sobre la cisticercosis
cerebral como causa de muerte.
Patologia. México. 17: 119, 1979.

- 54.- Rabiela, H.T.; Lombardo, L. & Flores, B.F.
Cisticercosis cerebral. Análisis de 66 casos de autopsia
Patología México, 10: 27, 1972.
- 55.- Ramírez, P.V.; Vélez, P.G. & Biagi, F.F.
Antígenos detectables por inmunofluorescencia, en corpúsculos calcáreos de Cysticercus cellulosae.
Rev. Pac. Med. Mex.
- 56.- Robles, C.
Consideraciones acerca de 100 casos de tumor cerebral operados.
Fren. Med. Mex. 9: 67, 1944.
- 57.- Sattler, L. & Zarban, F.W.
The Dreywood antronic reaction as affected by carbohydrate structure.
Sci. 108: 207, 1948.
- 58.- Schenone, H.; Aranda, R.; Concha, L.; Klierin, F.; Rojas & Cofré
Investigación de hidatidosis y cisticercosis inaparentes por medio de reacciones inmunobiológicas.
Bol. Chil. Parasitol. 26: 121, 1971.
- 59.- Sephadex Ion Exchanger.
A guide to ion chromatography.
Pharmacia Fine Chemical, 1971.
- 60.- Pharmacia Fine Chemicals. Catálogo.
Cromatografía de intercambio iónico.
11-20, 1963.

- 61.- Sealey Carter, M.A.
Respuesta inmune a antígenos de Cysticercus cellulosae.
Tesis de Maestría.
Inst. Inv. Biomédicas. U.N.A.M., 1980.
- 62.- Sigma Chemical Co.
Biochemical and organic compounds for research and
diagnostic clinical reagents.
516, Feb., 1984. U.S.A.
- 63.- Skromne-Kadlubik, G. & Celis-González, C.
Tratamiento con radionúclidos de la cisticercosis cere-
bral en el ser humano.
Sal. Pub. Mex. Vol. 19 (5): 651-653, 1977.
- 64.- Stewart Sell.
Inmunología, Immunopatología e Inmunidad.
HARLA, S.A.
2da. Ed. México, 18: 293, 1981.
- 65.- Stites, D.; Stobo, J.; Fudenberg, H. & Wells, J.
Inmunología Básica y Clínica.
El Manual Moderno, S.A.
4a. Ed. México, 37: 688-700, 1983.
- 66.- Sotelo, J.; Escobedo, F.; Rodríguez-Carbajal, J.; Torrea, B.
& Rubio-Donnadieu, F.
Therapy of parenchymal brain cysticercosis with Praziquan-
tel.
N. Engl. J. Med. (USA) Abril, 310 (16): 1001-1007, 1984.
- 67.- Thomas, J.A.; Kothare, S. & Baptist, S.
Cysticercus cellulosae.
J. Trop. Med. Hyg. 76: 106-110, 1973.

- 68.- Tuller, E.F. & Keiding, H.R.
Determination of protein bound carbohydrates by the an-
throne reaction. Effect of tryptophan.
Anal. Chem. 26: 875, 1954.
- 69.- Villanueva, D.G. & González, B.D.
Aplicación de la prueba de hemaglutinación indirecta en
la cisticercosis humana.
Rev. Med. Hosp. Gral. 43 (7): 253-256, 1980.
- 70.- Weiser, R.S.; Myrvik, Q.N. & Pearsall, N.H.
Inmunología.
Interamericana, S.A.
1ra. Ed. 26: 342-345, 1970.
- 71.- Williams, C.A.
Immuno-electrophoresis.
Sci. Am. Vol. 202 (3): 130-140, 1960.
- 72.- Zavala-Velázquez, J.; Bolic-Cicero, A. & Suárez-Hoíl, G.
Cisticercosis por C. racemosus de localización muscular.
Pat. Vol. 22: 99-103, 1984.
- 73.- Zenteno, H.G.
Frecuencia de la cisticercosis en México.
Fren. Med. Mex. 31 (5-6): 156-162, 1966.
- 74.- Zenteno, H.G.
Sintomatología de la cisticercosis humana.
Rev. Fac. Med. 40 (4): 41-45, 1968.

75.- Zenteno, H.G.; Martínez, B. & Biagi, P.F.
Observaciones sobre la cisticercosis humana.
Rev. Fac. Med. 6: 617-633, 1961.

76.- Zenteno, H.G.
Aspectos neuroquirúrgicos de 2000 enfermos.
Rev. Med. Hosp. Gral. 13: 226, 1965.