



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

**Efecto de la Concentración de Proteínas en el
Título de Reacciones Inmunológicas del L. C. R.**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
Químico Farmacéutico Biólogo

P R E S E N T A

MARTHA ARROYO VILLASEÑOR

MEXICO, D. F.

1977



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CLAS. Tesis
ADQ. _____
FECHA 1977
PROC. Mt. 30



J U R A D O :

PRESIDENTE:	Ramón Ulacia Esteve.
VOCAL:	Magdalena Acosta Segura.
SECRETARIO:	Carmen Reyna Bordes.
1er. SUPLENTE:	Ernestina Ballesteros Rueda.
2do. SUPLENTE:	Socorro Cao Romero Martínez.
SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:	Instituto Nacional de Neurología.
SUSTENTANTE:	Martha Arroyo Villaseñor.
ASESOR DEL TEMA:	Magdalena Acosta Segura.
SUPERVISOR TECNICO:	Ricardo Olmedo Salido.

A MIS PADRES . . .

A MIS HERMANOS . . .

A MI ESPOSO . . .

A MIS HIJOS . . .

A MIS MAESTROS

Y AMIGOS...

I N D I C E

	INTRODUCCION.
CAPITULO I.-	IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DEL L.C.R. EN EL DIAGNOSTICO NEUROLOGICO.
CAPITULO II.-	MATERIAL Y METODOS
CAPITULO III.-	RESULTADOS.
CAPITULO IV.-	DISCUSION.
CAPITULO V.-	CONCLUSIONES.
CAPITULO VI.-	BIBLIOGRAFIA.

INTRODUCCION

En numerosas ocasiones se ha visto que los datos del laboratorio obtenidos en el L.C.R. para la investigación de cisticercosis o de lués del S.N.C. en pacientes sin tratamiento previo y empleando las técnicas usuales dan resultados normales, sin embargo, posteriormente, al realizar la intervención quirúrgica o bien la necropsia se ha visto que tales pacientes padecían cisticercosis. Por esta razón se llevó a cabo el presente trabajo haciendo un estudio de los métodos más empleados para el diagnóstico de cisticercosis y de lués.

Al practicar una evaluación de estos casos se observó que en la mayoría de ellos el contenido de proteínas era bajo menor de 30 mg por 100 ml, y si consideramos que las inmunoglobulinas representan el 20% del contenido total de proteínas, el valor correspondiente a los anticuerpos viene a ser de menos de 6 mg por 100 ml de L.C.R. de lo que se deduce que las reacciones falsas negativas en estos padecimientos pueden deberse a la escasa cantidad de inmunoglobulinas presentes. De esta consideración partió la idea de encontrar un método que sin alterar la especificidad de los anticuerpos, pudiera aumentar la concentración de las inmunoglobulinas y con estos concentrados realizar las pruebas de diagnóstico. Los métodos seguidos, se presentan en este trabajo de tesis.

CAPITULO I

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DEL L.C.R. EN EL DIAGNOSTICO NEUROLOGICO

El L.C.R. es un humor orgánico de características peculiares que - por sus propiedades y funciones merece la máxima atención tanto del clínico_ como del laboratorista. Efectivamente es de notar que este líquido orgánico no es un simple ultrafiltrado plasmático como otros líquidos séreos. Su com posición en estado normal tiene peculiaridades definidas que le distinguen - radicalmente del plasma, lo que nos obliga a exponer algunos comentarios al_ respecto.

Se han hecho desde principios de siglo numerosas investigaciones - para encontrar donde se forma el L.C.R.; diferentes investigadores han men- cionado como sitio de formación del L.C.R. los plexos coroideos, las células del espéndimo, los espacios pervalculares, el paréquima del S.N.C. y las me- ninges.

EL ESTUDIO DEL L.C.R.- El número y tipo de pruebas, así como la - selección de la metodología, naturalmente dependen en gran parte del fin al_ cual se dirige la investigación del L.C.R.; si van a ser estudiados ciertos_ problemas fisiológicos o patológicos por el significado del líquido, el núme_ ro de reacciones o determinaciones que se lleven a cabo deberán ser lo más - completo posible y siempre se buscará que los resultados sean exactos y re- producibles.

Debido a la naturaleza de este trabajo, sólo me limitaré a considerar las investigaciones ordinarias de rutina sobre las bases de los métodos más usados en el laboratorio. También discutiré varias investigaciones, las cuales no son de rutina, pero que sin embargo, pueden ser de interés en ciertos casos para practicar o verificar un diagnóstico clínico dado; las investigaciones del L.C.R. pueden ser divididas en dos secciones: la sección clínica y la sección del laboratorio.

La primera consiste en la medición de la presión del L.C.R. la cual debe ser de 100 a 200 ml de agua (7 a 15 mm de mercurio) con el paciente en decúbito lateral, y de 200 a 300 ml de agua (de 15 a 22 mm de mercurio) cuando está sentado, la determinación de la caída en presión cada vez que sean extraídos 5 ml del líquido o bien cada 3 ó 4 ml, el control del pulso y respiración, la verificación del fenómeno de "Queckenstedt" y la inhalación del nitrato de amilo, (excepto en los casos en que ambas son rigurosamente contraindicadas). Y por último puede incluirse en esta sección los caracteres físicos del L.C.R.

La parte ejecutada en el laboratorio consiste en los estudios químico, inmunológico y citológico, los cuales son importantes debido a que los datos que se proporcionan al neurólogo conjuntamente con los que él obtiene clínicamente le ayudan en su diagnóstico.

En efecto, el clínico puede ir formándose una idea acerca de la enfermedad de su paciente, desde el momento en que efectúa la punción, pues

el cuadro que presenta el líquido puede ser característico.

CARACTERES FISICOS: Aspecto.- El L.C.R. normal, tiene aspecto - incoloro, y transparente (agua de roca). Toda variación con respecto a este carácter depende de la presencia de elementos extraños como sangre, pus, bilirrubina, bacterias, etc. o bien a la elevación de los elementos que ya existen normalmente (celdillas), y tiene diversa significación patológica.

La simple inspección del líquido ya puede darnos algunos datos importantes. La pérdida de la transparencia se manifiesta por turbidez u opalescencia y se debe fundamentalmente a la existencia de una cantidad de elementos celulares, leucocitos y eritrocitos. Si se trata de leucocitos, la turbidez u opalescencia es incolora, blanquecina o amarillenta, pero cuando hay eritrocitos aparece una coloración más o menos rosada o francamente hemorrágica dependiendo de la cantidad de sangre extravasada. La sangre en el L.C.R. aparece no solamente en las hemorragias subaracnoideas, sino también en la mayor parte de hemorragias intraparenquimatosas espontáneas y en los casos de contusión cerebral traumática.

El color amarillo o xantocromia del líquido procede de la presencia de pigmentos derivados de la hemoglobina, especialmente hemoglobina o bilirrubina, como en los siguientes casos:

- a).- De una hemorragia subaracnoidea o ventricular sufrida anteriormente.

- b).- De pequeñas hemorragias locales en el paréquima nervioso.
- c).- De la bilirrubina de la sangre en las ictericias.

Al dejar el L.C.R. en reposo pueden aparecer, al cabo de unas horas fenómenos de coagulación. Esta puede ser parcial o total.

La coagulación parcial da origen a una película más o menos delicada con aspecto, algunas veces, reticular o de tela de araña. Se le llama retículo de fibrina.

La coagulación total o coagulación en masa se produce poco después de la extracción.

EXAMEN QUIMICO.- Químicamente hay caracteres que suelen alterarse cuando el L.C.R. corresponde a pacientes con problemas de las meninges o del S.N.C. El L.C.R. tiene una reacción ligeramente alcalina, pH que oscila entre 7.3 a 7.4.

La constitución total consta de alrededor de 99% de agua y 1% de sólidos.

GLUCOSA.- La cantidad de glucosa contenida en el L.C.R. varía de la mitad a las dos terceras partes de la glucosa contenida en el plasma sanguíneo, los valores normales son usualmente considerados entre 50 y 80 mg/100 ml. Se encuentran cifras bajas de glucosa en todos los casos de me-

ningitis aguda, y existen infecciones en las que puede desaparecer.

La encefalitis epidémica o letárgica, presenta como único dato -- anormal en el líquido, una cifra elevada de glucosa. Para que sea útil, la determinación de glucosa como elemento diagnóstico, es necesario saber si -- el enfermo es o no diabético.

PROTEINAS..- El L.C.R. normal posee relativamente una cantidad ba-- ja de proteínas. Una elevación del contenido total de proteínas indica la -- presencia de una alteración orgánica del S.N.C. o de sus membranas. Gene-- ralmente el aumento coincide con pleocitosis (aumento del número de célu--- las), pero hay casos en que se encuentra aumento de proteínas con elementos celulares normales, o lo contrario, pleocitosis con proteínas normales. Lo primero puede establecerse en casos de tumores cerebrales, polineuritis y -- sobre todo en el síndrome de compresión, lo segundo en ciertos estados be-- nignos que no van acompañados de la inflamación de las meninges.

Las proteínas del L.C.R. son principalmente albúminas y globuli-- nas, estas globulinas se pueden fraccionar en alfa, beta y gamma y éstas a -- su vez en subfracciones. Puede ocurrir un cambio significativo en la pro-- porción de éstos constituyentes si hay un incremento del contenido total de proteínas. Es importante hacer notar que el rango normal de proteínas va-- ría según la localización del L.C.R. Así tenemos que:

L.C.R. ventricular	10-15 mg/100 ml
L.C.R. cisternal	15-25 mg/100 ml
L.C.R. lumbar	20-40 mg/100 ml

Algunos clínicos consideran, sobre el contenido de proteínas como normal de 25 mg como límite y más de 50 mg como anormal.

CLORUROS.- Las cifras de cloruros en el L.C.R. son de 650 a 700 mg por 100 ml de L.C.R. La disminución de este elemento se observa especialmente en los procesos tuberculosos del S.N.C.

CARACTERES CITOLÓGICOS.- El L.C.R. normal se caracteriza por la presencia de células linfoides (linfocitos pequeños) cuya cantidad no debe pasar de 5 por milímetro cúbico.

El contenido celular varía con la edad: en el lactante se pueden hallar normalmente hasta 30 células, a los 4 años 20 y en la pubertad 10, pero comunmente su número es menor.

Las variaciones celulares pueden consistir en aumento del número (pleocitosis) y en la aparición de formas celulares distintas a las linfoides.

El contenido celular se puede incrementar debido a lesiones inflamatorias, ya sean del cerebro, médula espinal o meninges. Sucede lo mismo

en el caso de tumores cerebrales. En infecciones crónicas y condiciones tóxicas hay usualmente un incremento de linfocitos. En procesos parasitarios se observará la presencia de eosinófilos.

Ya que el interés primordial de este trabajo es la investigación en lo que respecta al diagnóstico de la cisticercosis y la neurolués del S. N.C. por métodos inmunológicos, considero pertinente recordar los aspectos más importantes de esas dos entidades nosológicas.

CISTICERCOSIS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.- La cisticercosis es la infestación del S.N.C. por la forma larvaria de Taenia solium.

El hombre es el huésped definitivo y exclusivo de Taenia solium,- también se puede parasitar por el cisticerco de esta taenia cuando ingiere huevecillos de dichos parásitos.

Rudolphi, pensando que el cisticerco era una especie de animal -- por sí mismo le dió el nombre de Cysticercus cellulosae, es la forma larvaria de Taenia Solium.

El tamaño de los cisticercos varía de 5 mm a varios cm (S. Obrador 1962). En el cerebro a veces los quistes se adhieren entre sí formando racimos y su número llega a veces de 100 a 200 quistes; se pueden encontrar 4 localizaciones: parequimatosa, meníngea, ventricular y mixta.

Según López Aller como el L.C.R. es la vía de circulación del parásito, resulta fácil explicar la frecuencia de la localización ventricular. Por otra parte los quistes pueden emigrar desde los ventrículos laterales.

La cisticercosis humana es universal, pero es más abundante en los pueblos de nivel sanitario bajo. En 1912 la cisticercosis era la parasitosis cerebral más frecuente aunque ya había experimentado una notable distribución (Hennber). En la actualidad, si bien la enfermedad ha desaparecido casi totalmente de la mayor parte de los países europeos, E.U.A. y Canadá, todavía se observan casos en Polonia, España, Portugal, Rumania y países de Europa Central y en ciertas regiones de Asia, México, Brasil, Perú y Chile.

El elevado porcentaje de la cisticercosis cerebral en México se explica por el hecho de que numerosos poblados están situados en las orillas de los lagos, ríos y sistemas de irrigación. Los dispositivos de evacuación de las aguas negras residuales y las medidas higiénicas son insuficientes.

Costero (1946) encuentra el 3.6% de cisticercosis, en autopsias efectuadas en 6 años consecutivos en el Hospital General de México. Lombardo y Mateos (1961) observan 31 casos de cisticercosis entre 265 enfermos (11.8%) ingresados en el Servicio de Neurología y Neurocirugía del mismo Hospital a lo largo del año 1959, período en el que esta parasitosis provocó el 35% de las intervenciones intracraneales. Olmedo en un total de 8,000 L.C.R. investigados (1950 - 1969) encontró reacciones positivas en el 3.8%. Robles señala que el 25% de los enfermos sospechosos de tumor cerebral ingresa

dos en el mismo establecimiento padecían realmente una cisticercosis cerebral.

Igualmente en México, Guzmán encuentra una proporción de cisticercosis del 15.3% en una serie de 65 enfermos operados en dos años y Cárdenas registra una frecuencia de 12.4% en 5 años. Ramos Murguía observa en niños una frecuencia del 33% en una estadística de tumores cerebrales.

La cisticercosis cerebral no se puede considerar como un proceso patológico estable o inactivo, ya que las diferentes fases de la vida del quiste ocasionan variadas reacciones del tejido nervioso contiguo de las meninges y de los vasos, acompañados de modificaciones del cuadro clínico.

Los cisticercos se pueden mantener en el cerebro en la fase larvaria durante varios años. Ya en 1912, Henneberg comunica que el parásito puede vivir 6 años o más en el interior del neuroeje.

Greenfield observa que las reacciones inflamatorias locales son mínimas mientras vive la larva, pero que la muerte del parásito ocasiona una modificación de los cisticercos que aumentan de volumen y se calcifican en poco tiempo a la vez que se presenta una agravación de los signos clásicos a causa de la presencia de lesiones inflamatorias de tipo inmunológico y en las meninges y el tejido cerebral (Henneberg, 1912, Dixon y Hargreaves, 1944).

El diagnóstico clínico en la cisticercosis cerebral es difícil ya que los síntomas no indican la naturaleza del proceso. En ocasiones el diagnóstico solamente se comprueba con la autopsia, esto plantea la necesidad de contar con procedimientos inmunológicos eficientes para el diagnóstico.

En 1942, se emprendió una serie de investigaciones para resolver el problema del diagnóstico por medio de reacciones tanto en suero como en L.C.R., siendo considerada de mayor utilidad la reacción con el L.C.R.

De las reacciones que se pueden efectuar en L.C.R. tenemos las siguientes:

- a).- Reacción de Fijación de complemento.
- b).- Reacción de Precipitación.
- c).- Reacción de Hemaglutinación.
- d).- Reacción de Inmunodifusión.
- e).- Reacción de Cassoni.
- f).- Interreacción de Robin-Fiesenger.

De éstas, la que más frecuentemente se usa es la de Fijación de Complemento.

Dicha reacción es la más específica en el diagnóstico de cisticercosis, su uso data de 1909 (Neinberg) con resultados satisfactorios. Otros autores como Moses en 1911, Guccione en 1909, Vosnaya en 1953 y D. Nieto en

1948, la han usado con gran éxito especialmente en casos de cisticercosis -- del S.N.C. Las modificaciones del L.C.R. son más constantes en el líquido espinal que en el líquido ventricular, pues éste es normal en ciertos casos en que el líquido extraído por punción lumbar se halla muy modificado (Nieto 1956).

Las modificaciones suelen evolucionar paralelamente en las diferentes fases de la enfermedad, pero la positividad de la reacción de fijación del complemento puede durar varios años.

Por lo que respecta a la investigación de lués y cisticercosis en el suero sanguíneo la reacción no mantiene paralelismo con las reacciones de Wasserman, Kahn y Mazzini algunos resultan también positivos para cisticercosis y algunos de los sueros negativos en las reacciones sifilíticas resultan positivos para cisticercosis.

Hay además ciertas alteraciones en el L.C.R. en algunos casos de cisticercosis del S.N.C.: hay un incremento en el número de células, con alguna eosinofilia; incremento total de proteínas; reacción positiva de globulinas y un contenido bajo de glucosa con reacción negativa de Wasserman.

El incremento en el número de células oscila dentro de muy variados límites (10-100). Los elementos celulares predominantes son linfocitos.

SIFILIS CEREBRAL.- La sífilis es una enfermedad venérea contagiosa específica y peculiar de la raza humana, causada por una espiroqueta (Treponema pallidum). Generalmente es transmitida por contacto sexual directo o por transmisión materna, instrumental de dentista no esterilizado, jeringas contaminadas, etc. Su duración es indefinida, es crónica en su curso e intermitente en sus síntomas. Este microorganismo de forma espiral delgado lo descubrió en 1905 un parasitólogo llamado Fritz Schudinn, en colaboración -- con Erich Hoffman. Se dió ese nombre al microorganismo a causa de su forma espiral y porque se tiñe con dificultad, apareciendo siempre pálido en contraste con otros tipos de espiroquetas que se tiñen intensamente.

El microorganismo mide de 0.25 a 0.5 micras de diámetro y varía -- considerablemente de longitud (4 a 25 micras). Tiene de 6 a 24 espirales; -- se mueve muy lentamente a lo largo de su eje mayor, aunque gran parte del movimiento de vaiven observado en las preparaciones ultramicroscópicas se debe al líquido que transporta el treponema consigo.

El movimiento principal es el de rotación sobre su eje. Un tercer movimiento que practicamente no se ve en ningún otro organismo, es el de una curvatura en el centro, conservando la rigidez característica en ambos extremos. En las preparaciones que se han dejado en reposo durante un tiempo, el organismo abandona en ocasiones su firme rigidez y hace movimientos irregulares de curvatura y torsión, como si intentara escapar de su ambiente desfavorable, pero aún no se pierde el contorno de las espiras.

El microorganismo en la mayoría de los casos probablemente entra a la persona a través de la capa epidérmica lesionada. Cuando la persona reacciona frente al T. pallidum, se obtiene una respuesta con características inflamatorias conocida como chancro. Esta etapa es conocida con el nombre de sífilis primaria y ocurre en un período de 10 a 90 días. El chancro se encuentra generalmente en la región ano-genital, sin embargo, puede residir en cualquier parte del cuerpo, en la mujer el sitio elegido para un chancro generalmente es el cervix del útero o la base de los grandes y pequeños labios. Para el diagnóstico de sífilis primaria se efectúa el exámen de la lesión haciendo la observación del material obtenido por raspado en campo oscuro.

De 2 a 12 semanas después de la aparición del chancro primario aparece un sarpullido en la piel en la cual pueden demostrarse las espiroquetas. Esta etapa de la enfermedad se refiere a lo que se llama sífilis secundaria. Durante ésta puede efectuarse la detección del T. pallidum en las lesiones por el método del campo oscuro y ya existe positividad de las pruebas serológicas sifilíticas.

En las sífilis terciarias el treponema puede atacar a los distintos órganos incluyendo el sistema nervioso tanto periférico como central.

Se debe a Fournier el mérito de haber individualizado la sífilis en el neuroeje. Numerosos trabajos señalan que la sífilis cerebral aparece más precozmente en los casos de un tratamiento insuficiente de la sífilis inicial que en las formas no tratadas.

La frecuencia y la variedad de las formas clínicas de la sífilis cerebral son tales, que ante toda lesión del cerebro debe siempre investigarse lués.

La sífilis cerebral aparece entre el cuarto y décimo año de la contaminación sífilítica. Esto no quiere decir que no haya sífilis cerebrales precoces, habiéndose observado uno o dos años después de la contaminación y sífilis tardías, 30 años después del chancro.

Según Claude sólo el 25% de los sífilíticos presentarían manifestaciones cerebrales. La sífilis cerebral parece ser más frecuente en el hombre que en la mujer, atacando por lo general a sujetos de 25 a 30 años. También puede observarse la sífilis en sujetos muy jóvenes y aún niños, tratándose en estos casos de heredosífilis.

La neurolués invade el sistema nervioso por la vía sanguínea. Si si en el período secundario el treponema llega a los vasos meningeos, se producirá una meningitis aguda o subaguda con sintomatología, o lo que es más común, ella será latente pudiendo sólo revelarse mediante el examen del L.C.R. las lesiones meningeas producirán luego secundariamente una lesión parenquimatosa (meningoencefalitis). Si el treponema llega a los vasos cerebrales se llega a producir una arteritis que tendrá como consecuencia la producción de los procesos de hemorragia o reblandecimiento.

En la sífilis asintomática del S.N.C. hay alteraciones en el L.C.-

R. con ausencia de síntomas clínicos aparentes.

Esta condición es generalmente considerada como precursora de la -
 sintomatología de la sífilis del S.N.C. y la severidad de las alteraciones -
 en el L.C.R. puede ser paralela a la probabilidad de un desarrollo clínico -
 de neurosífilis. En la variedad benigna, los cambios son mínimos. Las célu-
 las y las proteínas pueden verse ligeramente incrementadas, pero las pruebas
 serológicas son negativas. En la variedad moderada las reacciones serológi-
 cas pueden ser positivas y en la variedad severa las reacciones serológicas_
 son siempre positivas.

La respuesta del organismo a la invasión por Treponema pallidum es
 una sustancia llamada reagina, la cual es un anticuerpo complejo que se en-
 cuentra en el suero del individuo sifilítico, pero no sólo la presencia del_
T pallidum puede causar su formación, sino que otros microorganismos pueden_
 también originarla. Las reacciones positivas no debidas a sífilis, se lla-
 man falsas positivas de tipo biológico; como sucede en las siguientes enfer-
 medades:

Padecimientos treponémicos: Mal del pinto, Frambuesia, Bejel.

Parasitosis: Paludismo, Kala-azar, Cisticercosis.

Virosis: Vacunación antivariolosa (después de meses), Sarampión,
 Rubeola, Manonucleosis infecciosa.

Infecciones bacilares: Lepra, Tuberculosis.

Padecimientos neoplásicos: Carcinomas, Linfomas.

Enfermedades de la colágena: Lupus eritematoso disseminado.

Para aclarar los casos anteriores es necesario recurrir a reacciones de gran especificidad como la de anticuerpos fluorescentes del Treponema Pallidum o la reacción de aglutinación con treponema.

Las pruebas que comúnmente se usan para detectar la cantidad de -- reagina son de dos tipos: floculación y fijación de complemento.

Las pruebas de floculación que más se usan son: V.D.R.L., Mazzini, Kline, cardiolipina y la de Kahn standar.

La prueba de fijación de complemento es extraordinariamente sensible y se utiliza para descubrir indicios de reagina. Esta es la base de la reacción de Wasserman y sus diversas modificaciones.

Otras pruebas empleadas para investigar Treponema Pallidum son las siguientes: Aglutinación, Inmunofluorescencia e Inmovilización del T. Pallidum.

CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS

Material Clínico:

Se practicó el estudio de L.C.R. a enfermos internados en el Instituto Nacional de Neurología correspondientes a los servicios de Neurología, Neurocirugía y Pediatría y en el laboratorio a los pacientes de la consulta externa.

Toma de Muestras:

La extracción del L.C.R. se practicó invariablemente en decúbito lateral izquierdo o derecho, se utilizó aguja del número 20 y raquimanómetro de Ayer; en todos los casos se tomó la presión inicial, signo de "Queckenstedt" y tensión final, después de la extracción de 5 ó 6 ml necesarios para los estudios de rutina del L.C.R.

Estudios Realizados:

A cada uno de los líquidos se le registraron sus caracteres físicos, tales como: consistencia, aspecto, color sedimento y coagulabilidad.

El examen químico cuantitativo consistió en la investigación de: -

glucosa, proteínas totales y células.

Se practicó, además estudio citológico: anotando número de células por mm^3 , así como cuenta diferencial porcentual previa tinción por la técnica de May Grunwald-Giemsa.

Las reacciones inmunológicas practicadas para la investigación de neurolués y cisticercosis consistieron en una reacción de fijación de complemento usando la misma técnica en ambos casos, variando únicamente el antígeno. Esta fase que comprende la parte medular del presente estudio se detalla a continuación:

Material de laboratorio: (Aproximado para una reacción)

15 Tubos de ensaye de 10 X 100 mm

4 Tubos de ensaye de 13 X 130 mm

1 Tubo de Folin

2 Matraces Erlenmeyer de 250 ml

1 Pipeta de glóbulos blancos

6 Pipetas de 5.0 ml graduados en 0.1

2 Pipetas de 1 ml graduada en 0.1

2 Pipetas de 0.1 ml graduada en 0.01

1 Cámara de Fuchs-Rosenthal

Tubo de celofán para diálisis de 3.0 cm de diámetro

Microscopio

Fotocolorímetro

Baño de Agua a 37° C

Baño de Agua a 45-50° C

Reactivos:

Solución cuproalcalina

Solución fosfomolibdica

Reactivo de Exton

Solución colorante de Wright

Solución colorante de Giemsa

Diluyente de Unna

Antígeno para reacción de neurolués

Antígeno para reacción de cisticercosis

Suero humano fresco

Glóbulos rojos de carnero.

Técnicas para la preparación de reactivos:

Solución cuproalcalina.- Se disuelven 40 g de carbonato de sodio - anhidro en 400 ml de agua destilada en un matríz aforado de 1000 ml y se agregan 7.5 g de ácido tártrico, 4.5 g de sulfato de cobre pentahidratado, disolver y aforar a 1000 ml con agua destilada.

Solución fosfomolibdica.- En un vaso de 1000 ml se colocan 35 g de ácido molibdicco, 5 g de tungstato de sodio, 200 ml de solución de hidróxido -

de sodio al 10% y 200 ml de agua destilada. Se hierve de 20 a 40 minutos y se enfría. Se transfiere a un matr az aforado de 500 ml lavando el residuo del vaso con una pequeña cantidad de agua destilada. Se adicionan 125 ml de ácido fosfórico concentrado (85%) se afora a 500 ml con agua destilada y se mezcla perfectamente.

Reactivo de Exton.- En un matr az aforado de 500 ml se colocan 25 mg de ácido sulfosalicílico, se adicionan 300 ml de agua y se disuelven. Se agregan 5 g de sulfato de sodio anhidro y se disuelven, se afora con agua destilada a 500 ml.

Solución colorante de Wright.- En un mortero seco se trituran 2 g de colorante de Wright en 500 ml de alcohol met lico, dejar en maduración 8 días y filtrar antes de usarlo.

Solución colorante de Giemsa.- Se prepara por adición de 2 gotas de colorante concentrado de Giemsa a cada ml de agua destilada. Esta solución únicamente puede usarse dentro de las primeras 4   6 horas después de su preparación.

Diluyente de Unna.- En una mezcla de 90 ml de agua destilada y 10 ml de ácido acético glacial se disuelven 0.2 g de cristal violeta y se mezcla perfectamente.

Antígeno para reacción de Neurolués.- Se utilizó uno comercial, -

que consiste en un extracto alcohólico de corazón bovino adicionado de coles terol.

Preparación de la disolución que se usó. La dilución del extracto comercial se efectúa de la siguiente forma: En un matrás Erlenmeyer se colocan 80 ml de solución salina al 0.85%, se adicionan 0.05 ml del extracto y se mezcla perfectamente. Se prepara momentos antes de usarse.

Antígeno para reacción de cisticercosis.- Se obtiene a partir de vesículas de Cysticercus cellulosae que se liberan del tejido que las envuelve, se lavan con solución salina fisiológica, y seguidamente con acetona pura, se colocan en una caja de Petri y se secan a la estufa a 37°C. Después del secado completo, se trituran en un mortero hasta pulverizarlas y de este polvo se suspenden 10 g por 100 ml de alcohol metílico formando una suspensión homogénea, se deja reposar una semana, para filtrar después (Extracto antigénico).

Preparación de la dilución de uso: En un matrás Erlenmeyer se colocan 80 ml de solución salina al 0.85%, se agregan 0.10 ml del extracto antigénico y se mezcla perfectamente. Esta dilución se prepara momentos antes de usarse.

Suero Humano Fresco.- Como fuente de complemento y hemolisinas se usó suero humano fresco proveniente de la sangre de individuos no sifilíticos ni parasitados por Taenia solium o Cysticercus cellulosae en el cual se

demonstró la existencia de hemolisinas naturales anticarnero. Se extrae antes de usarse o se conserva en congelación.

Glóbulos rojos de carnero.- Los glóbulos rojos de carnero se lavan tres veces con solución salina al 0.85% y se prepara una suspensión al 2% en solución salina, momentos antes de usarse.

EXAMEN QUIMICO CUANTITATIVO.

Determinación de Proteínas Totales.- A 0.5 ml de L.C.R. se adicionan 2.5 ml de reactivo de Exton, la turbidez producida en 10 minutos se mide en el fotocolorímetro a una longitud de onda 460 milimicras. La lectura se hace contra blanco de agua y la concentración se calcula por medio de la fórmula:

$$\frac{\text{D.O. Sol. Desconocida}}{\text{D.O. Sol. Patron}} \times \text{Concent. Sol. Patron} = \text{Concent. Sol. Desconocida.}$$

Determinación de Glucosa.- Si el contenido proteico es bajo el L.C.R. se diluye directamente con agua destilada: a 0.5 ml de L.C.R. se adiciona 4.5 ml de agua destilada. En un tubo de Folin se colocan 1 ml de solución cupro alcalina y 1 ml de la dilución de L.C.R. se hierve por 8 minutos, se enfría y se adiciona 1 ml de solución fosfomolibdica, se afora con agua destilada a 12.5 ml se agita el tubo y se observa en el fotocolorímetro a 520 milimicras. La lectura se hace contra blanco de agua y la concentración

se calcula por medio de la fórmula:

$$\frac{\text{D.O. Sol Desconocida} \times \text{Concent. Sol Patron}}{\text{D.O. Sol Patron}} = \text{Concent. Sol Desconocida.}$$

En caso de que el L.C.R. presente un alto contenido proteico, se practica la determinación de glucosa, previa desproteización.

Determinación de Células.- La cuenta celular se practica inmediatamente después de la extracción de L.C.R. (para evitar la citolisis o deformación celular). Se utilizó para tal objeto una pipeta de glóbulos blancos para la cuenta de leucocitos. Se toma diluyente de Unna hasta la marca 0.5 y L.C.R. hasta llenar la pipeta a la marca 11; después se deja en reposo unos minutos y se efectúa su recuento en la Cámara de Fuchs-Rosenthal.

Para investigar el tipo de células presentes en el L.C.R. se centrifuga el líquido después de haber practicado la cuenta de sus células y a partir del sedimento se hace un frotis que después de su fijación se tiñe por el método de May Grundwald-Giemsa.

Técnica de Tinción por el Método de May Grundwald-Giemsa.

- a).- Sobre un frotis seco se vierte, colorante de Wright y se deja actuar 2 minutos.
- b).- Se adiciona agua destilada, se mezcla bien con el colorante

y se deja actuar por 2 minutos.

c).- Se lava y se adiciona colorante de Giemsa diluido que se deja actuar por 7 minutos.

d).- Se lava y se deja secar.

PRUEBAS INMUNOLOGICAS.

Las reacciones de fijación de complemento se efectúan con el L.C.

R. previamente centrifugado.

Titulación del Suero (Fuente de complemento y hemolisinas), e Investigación del poder anticomplementario del antígeno:

Tubo No.	Sol.Sal. Isot.	Antígeno	Suero Fresco (Compl. y Hem.)	G.R. de carnero al 2%
1	0.4	0.5	0.1	0.1
2	0.3	0.5	0.2	0.1
3	0.2	0.5	0.3	0.1
4	0.4	0.5	0.1	0.2
5	0.3	0.5	0.2	0.2
6	0.2	0.5	0.3	0.2

Incubar a 37°C por 30' y después agregar:

Incubar a 37°C 5 ó 10'

La cantidad de suero (complemento y hemolisinas) que debe usarse en las reacciones será la correspondiente al tubo donde primero se observó hemólisis y se anota el tiempo que tardó en efectuarse dicha hemólisis, ya

que será el que deba emplearse al efectuar las reacciones. Generalmente se usan 0.2 ml de suero (fuente de complemento y hemolisinas) para cada prueba.

La titulación del suero y la investigación del poder anticplementario del antígeno se efectúa siempre inmediatamente antes de practicar las reacciones debido a su inestabilidad.

Reacción modificada de Wassermann a Suero Activo (Reacción de Hecht), para la investigación de anticuerpos.

Tubo No.	Sol.Sal. Isot.	L.C.R.	Antígeno	Suero Fresco (Compl. y Hem.)	G.R. de carnero al 2%
1	0.5	0.5	0.5	0.2	0.1
2	1.0	0.5	0.5	0.2	0.1
3	0.8	0.2	0.5	0.2	0.1
4	-	1.0	0.5	0.2	0.1
Testigos de L.C.R.					
(control)					
1	0.5	(neg) 0.5	0.5	0.2	0.1
2	0.5	(pos) 0.5	0.5	0.2	0.1

Incubar a 37°C 30' y después agregar:

Incubar a 37°C el tiempo necesario para que el testigo negativo de L.C.R., presente hemólisis total.

El mismo esquema se usó para la determinación de neurolués y cisticercosis variando sólo el tipo de antígeno.

METODO USADO PARA LA CONCENTRACION DE L.C.R.

El L.C.R. (no menos de 1.5 ml) se coloca en una bolsa de celofán - para diálisis de 5 cm de largo y 3 de diámetro aproximadamente y se suspende en agua destilada durante 8 horas, pasado este tiempo se transfiere el L.C.R. a un tubo de ensaye el cual lleva un tapón de hule con 2 horadaciones en una de las cuales se introduce un tubo de vidrio que llega 1.0 cm arriba de la superficie del líquido y en la otra se coloca otro tubo de vidrio doblado en ángulo que se hace llegar hasta 0.5 cm abajo de la superficie del líquido, por este tubo se hace pasar una corriente de aire frío para efectuar una evaporación. Con el objeto de tener una evaporación más rápida se coloca el tubo -- que contiene el líquido en un baño de agua a 45 - 50°C. Se suspende la operación cuando el L.C.R. queda concentrado aproximadamente a 1/10 de su volumen original, generalmente ésto se logra al cabo de una hora.

Con el objeto de estudiar si las reacciones falsas negativas se deben a la baja concentración de anticuerpos en el L.C.R., en el presente trabajo, se utilizaron tanto muestras del L.C.R. original como muestras del L.C.R. concentrado.

Tanto el volumen como el contenido proteico del L.C.R. fueron anotados antes y después del proceso de concentración.

Promedio en volumen del L.C.R. antes y después de la concentración del L.C.R.

L.C.R. Original: 7.3 ml

L.C.R. Concentrado: 1.2 ml

Promedio del contenido total de proteínas antes y después de la -
concentración de L.C.R.:

L.C.R. Original: 63.2 mg %

L.C.R. Concentrado: 327.6 mg %

CAPITULO III

RESULTADOS

El total de expedientes examinados en el laboratorio es de 4,789_ a partir de lo cual se obtuvieron los siguientes resultados:

REACCIONES A CISTICERCOSIS Y NEUROLUES

	No.	%
1.- Reacciones Negativas:	4,498	93.9
2.- Reacciones Positivas:	280	5.8
3.- Reacciones Dudosas:	9	.18
4.- Reacciones Anticomplementarias:	2	.04

RESULTADO DE LA CONCENTRACION DE L.C.R., QUE ORIGINALMENTE DIERON REACCION NEGATIVA O DUDOSA A CISTICERCOSIS QUE NO CONCORDABA CON LA CLINICA:

No. de Casos	Reacción en L.C.R. Original	Reacción en L.C.R. Con centrado
13	Negativa	Positiva
1	Dudosa	Positiva
17	Negativa	Negativa

RESULTADO DE LA CONCENTRACION DE L.C.R. QUE ORIGINALMENTE DIERON_ REACCIONES POSITIVAS O NEGATIVAS A NEUROLUES:

No. de Casos	Reacción en L.C.R. Original	Reacción en L.C.R. Con centrado
6	Positiva	Aumentó positividad
3	Negativa	Negativa

CASOS EN QUE SE PUDO COMPROBAR POR MEDIO DEL HALLAZGO QUIRURGICO_ O NECROPSIA LA EXISTENCIA DE CISTICERCOSIS PREVIO DIAGNOSTICO (POSITIVO O NEGATIVO), DE LA MISMA EN EL LABORATORIO:

CASO	DIAGNOSTICO DEL LABORATORIO (CON L.C.R. ORIGINAL O CONCENTRADO)	HALLAZGO QUIRURGICO	NECROPSIA
1	Negativo	Cisticercosis	
2	Positivo	Cisticercosis	
3	Positivo		Cisticercosis
4	Positivo	Cisticercosis	
5	Positivo		Cisticercosis
6	Negativo	Cisticercosis	
7	Positivo		Cisticercosis
8	Negativo	Cisticercosis	
9	Positivo		Cisticercosis
10	Positivo		Cisticercosis
11	Positivo		Cisticercosis
12	Positivo	Cisticercosis	
13	Positivo	Cisticercosis	

CASO	DIAGNOSTICO DEL LABORATORIO (CON L.C.R. ORIGINAL O CON- CENTRADO)	HALLAZGO QUIRURGICO	NECROPSIA
14	Positivo		Cisticercosis
15	Negativo		Cisticercosis
16	Positivo	Cisticercosis	
17	Negativo	Cisticercosis	
18	Positivo	Cisticercosis	
19	Positivo	Cisticercosis	
20	Negativo	Cisticercosis	
21	Positivo	Cisticercosis	
22	Positivo	Cisticercosis	
23	Positivo	Cisticercosis	
24	Negativo	Cisticercosis	
25	Positivo	Cisticercosis	
26	Positivo	Cisticercosis	
27	Positivo		Cisticercosis
28	Negativo		Cisticercosis
29	Positivo	Cisticercosis	

ANALISIS DEL CUADRO ANTERIOR:

Reacciones falsas negativas a Cisticercosis con hallazgo quirúrgico positivo: 31.57 %

Reacciones positivas a Cisticercosis comprobadas por medio del ha

llazgo quirúrgico: 68.43 %

Reacciones falsas negativas a Cisticercosis comprobándose en la -
necropsia la existencia de la misma: 20.0 %

Reacciones positivas a Cisticercosis comprobadas por medio de ne-
cropsia: 80.0 %

CAPITULO IV

DISCUSION

En el curso de mi experiencia pude observar que en el L.C.R. proveniente tanto de individuos con cisticercosis del S.N.C. como de individuos con neurolués, raramente hay alteraciones en cuanto a sus características organolépticas (aspecto y color).

Desde el punto de vista citológico, se presenta un incremento en lo que respecta a número de células que oscila dentro de límites muy variados, siendo característica la eosinofilia.

En el caso de cisticercosis hay incremento moderado en el contenido total de proteínas en tanto que en neurolués dicho incremento tiene valores más altos.

En el caso de cisticercosis del S.N.C. así como en neurolués se observan valores bajos de glucosa. En un caso de cisticercosis masiva del S.N.C. el contenido de glucosa fue de 0 mg/100 ml. En neurolués la glucosa también baja notablemente.

Respecto al aspecto inmunológico:

Debe tenerse sumo cuidado al efectuar la reacción de fijación del

complemento ya que suele dar reacción positiva a cisticercosis sin existir tal enfermedad, en el caso de que el individuo al cual corresponda el L.C.R. padezca neurolués por éso es recomendable efectuar las reacciones de neurolués y la cisticercosis al mismo tiempo.

Posiblemente esto se deba a que el antígeno de cisticercosis utilizado no es un antígeno purificado, por lo que sería conveniente que en estudios posteriores se intente la purificación del antígeno de cisticercosis.

La concentración del L.C.R. produce aumento en el título de la reacción de fijación de complemento.

Así reacciones positivas empleadas como control aumentan su positividad y reacciones negativas y dudosas que no concordaban con el aspecto clínico del paciente se volvieron positivas en algunos casos.

Llegan a presentarse casos en los que existiendo neurolués o cisticercosis del S.N.C., ni aún con la concentración de proteínas se obtiene la reacción positiva, y ésto puede deberse a las siguientes causas:

- a) La localización de la cisticercosis, pues los quistes hemisféricos producen con frecuencia reacciones negativas.
- b) La terapia a base de substancias corticoesteroides influye negativamente en la producción de anticuerpos.
- c) Otro motivo puede ser el fenómeno de anergia, que se presenta

en ciertos individuos.

Por definición anergia, es la falta de capacidad de reacción del organismo para una sustancia que es ofensiva en iguales cantidades para la mayoría de los individuos de la misma especie.

Es bien sabido que los esteroides suprimen las respuestas inflamatorias y que también disminuyen la permeabilidad capilar y el tono vascular causando por ésto anergia. (Amer. Rev. Resp. Dis. 95: 415 1966).

Muchos estudios epidemiológicos prueban el hecho de que la reacción negativa en piel puede ocurrir en personas con evidencias radiográficas de tuberculosis muy avanzada, como en el caso de tuberculosis miliar. (Amer. Rev. Resp. Dis. 95: 416 1966).

Así teniendo en cuenta lo anterior, no es difícil explicar el hecho de porque en muchos casos en que se comprueba quirúrgicamente o por necropsia la existencia de cisticercosis en S.N.C. la reacción de fijación de complemento resulta negativa o dudosa.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1.- De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede deducir, que: El contenido de células, proteínas y glucosa en L.C.R., así como la reacción de fijación de complemento nos proporcionan datos muy importantes que ayudan al diagnóstico de Cisticercosis del S.N.C. y de Neurolués.

Es necesario efectuar la reacción de fijación del complemento para Cisticercosis y Neurolués debido a que es la prueba del laboratorio que más precisión nos brinda. Es importante también, el estudio clínico que viene a complementarse con los datos que proporciona el laboratorio para llegar al diagnóstico.

El resultado falso negativo que se obtiene frecuentemente cuando el contenido total de proteínas de L.C.R. es bajo, puede ser rectificado concentrando el líquido y efectuando nuevamente la reacción de fijación de complemento.

2.- De los L.C.R. sometidos a concentración que originalmente resultaron con reacción negativa o dudosa a Cisticercosis que no concordaba con la clínica, se encontró que: 41.9% de los casos con reacción negativa en L.C.R. original dieron después de la concentración, reacción positiva. El 3.2% que originalmente resultaron dudosas dieron positiva con el respectivo L.C.R.

concentrado y asimismo un 54.8% de los casos con reacción negativa en L.C.R. original permaneció negativa, aún después de la concentración.

3.- De los L.C.R. que originalmente resultaron con reacción positiva o negativa a Neurolués se encontró: 66.66% de reacciones originalmente positivas aumentaron su positividad en el L.C.R. concentrado y un 33.33% de los casos con reacción negativa en L.C.R. original permanecieron negativos - aún después de la concentración.

4.- Revisando las historias clínicas de los pacientes se pudo -- comprobar el diagnóstico del laboratorio por medio del hallazgo quirúrgico o por necropsia. Así, tenemos 31.57% de los casos con reacción falsa negativa a Cisticercosis con hallazgo quirúrgico, asimismo en 20% de los casos se encontró reacción falsa negativa comprobándose con la necropsia la existencia de la enfermedad y en 80% de reacciones positivas se pudo comprobar por medio de la necropsia que en realidad existía la enfermedad.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Barraquer B.L. Neurología Fundamental. 2a. Edición. Ediciones Toray, - S.A. Barcelona. 1968 (693).
- 2.- Becker, W.S. y Obermayer M.E. Dermatología y Sifilología. 1a. Edición. Salvat Editores. México. 1945 (749).
- 3.- Biogi, F. Estudio de Tres Reacciones Serológicas en el Diagnóstico de la Cisticercosis. Rev. Méd. del Hosp. Gen. 25: México. 1962 (501).
- 4.- Boyd, W.C. Fundamentos de Inmunología. 3a. Edición Inglesa. Editorial Universitaria de Buenos Aires. 1959 (333).
- 5.- Carpenter, P.L. Inmunología y Serología. 1a. Edición. Editorial Four--nier. México. 1963 (70).
- 6.- Crofton, J. and Douglas A. Respiratory Diseases. First Published. ---- Blackwell Scientific Publications. Oxford and Edimburgh. 1969 (206).
- 7.- Fuentes Delgado M. Cisticercosis Cerebral. Gac. Méd. de México 78: México. 1948 (154).
- 8.- Gardner, E. Fundamentals of Neurology. Fourth Edition. W.B. Saunders - Company. 1963 (51).

- 9.- González Arroyo M. Aspecto Clínico de la Cisticercosis Cerebral. Rev. - Méd. del Hosp. Gen. 21: México. 1958 (611).
- 10.- Gradwohl, R.B.H. Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. Second Edition. The C.V. Mosby Company. St. Louis Mo. U.S.A. 1938 (994).
- 11.- Gradwohl, R.B.H. Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. Sixth Edition. Frankel and Reitman, Editors. St. Louis Mo. U.S.A. 1963 (85).
- 12.- Harshman, S. y Najjar A.V. The Theory of Subcomplementary as It Pertains to the Mechanism of Anti Body-Antigen Reaction. Amer. Jour. of Hyg. Mono graphic Series 22: 1963 (20).
- 13.- Kent, C.D. and Schwartz, R. Active Pulmonary Tuberculosis with Negative Tuberculin Skin Reactions. Amer. Rev. Resp. Dis. 95: 1967 (415).
- 14.- Litter, M. y Wexselblatt. Tratado de Neurología. 4a. Edición. "El Ate--- neo" Editorial. México. 1952 (757).
- 15.- Lupus, S.M.D. and Hann, A.M.H. The Cerebrospinal Fluid. Elsevier Publi--- shing Company. New York. 1954 (92).
- 16.- Merrit. Textbook of Neurology. 4th. Edition (110).
- 17.- Proxis Médica. Neurología y Psiquiatría. Clínica y Terapéutica. Vol. --- VII. Ediciones Latinoamericanas (Mónaco). 1960 (7.120).

- 18.- Nieto, D. Cysticercosis of the Nervous System. Neurology. 6. 1958 --- (725).
- 19.- Portocarrero Navarro M. Alteraciones del L.C.R. en la Neurocisticercosis. Rev. Méd. del Hosp. Obrero de Lima. 12. Perú. 1963 (162).
- 20.- Reyes Armijo E. y P. Beltrán Goñi. Cisticercosis Intracraneana. Rev.- Méd. del Hosp. Gen. 30. México. 1967 (317).
- 21.- Russell N. de Jong M.D. The Neurologic Examination. Third Edition. -- Harper & Rox. Publishers. New York, U.S.A. 1967 (1056).

Esta edición se imprimió en los talleres de
TESIS GUADARRAMA IMPRESORES, S. A.
Av. Cuauhtémoc 1201, Col. Vértiz Narvarte,
México 13, D. F., Tel. 559-22-77 con tres líneas