



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



70
zey

FALLA DE ORIGEN

CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS
MONOCLONALES ANTI - EXOANTIGENOS
(ANTIGENOS DE EXCRECION - SECRECION)
DEL METACESTODO DE Taenia solium

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

JUAN GILBERTO VAUGHAN FIGUEROA

ASESORES: BIOL. YOLANDA MEDINA FLORES

Q.F.B. ANA LAURA VAZQUEZ MARTINEZ



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.

FALLA DE ORIGEN

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de Tesis: Caracterización de Anticuerpos Monoclonales anti-exoantígenos (antígenos de excreción-secreción) del metacéstodo de Taenia solium.

que presenta el pasante: Juan Gilberto Vaughan Figueroa
con número de cuenta: 9056981-0 para obtener el TITULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Mex., a 23 de Junio de 1995

PRESIDENTE	<u>Dr. Marco A. Vera López</u>	
VOCAL	<u>M. en C. Alma Virginia Lara Sacarón</u>	
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Ana Laura Vázquez Martínez</u>	
1er. SUPLENTE	<u>M en C. Andrés Romero Rojas</u>	
2do. SUPLENTE	<u>M en C Víctor M. Zendejas Buitrón</u>	

DEDICATORIA

A mi madre, por que este trabajo representa el esfuerzo de ambos.

A Mayra por haber compartido una experiencia más a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

A la Bióloga Yolanda Medina, a la **Q.F.B. Ana Laura Vázquez** y a la **Dra. Dolores Correa**, así como a mis sinodales por todos los comentarios hechos al trabajo.

A mis compañeros del departamento de Inmunoparasitología del INDRE por su apoyo y sugerencias durante la realización de mi proyecto de tesis.

INDICE

1.0.- RESUMEN	1
2.0.- INTRODUCCION	2
2.1.- EL PARÁSITO	2
2.1.1.- ASPECTOS MORFOLOGICOS	2
2.1.2.- CICLO BIOLOGICO	3
2.1.3.- LA NEUROCISTICERCOSIS	9
2.1.4.- DIAGNÓSTICO	10
2.1.5.- TRATAMIENTO	14
2.2.- LA RELACION INMUNOLOGICA HOSPEDERO-PARASITO	16
2.2.1.- LA RESPUESTA INMUNOLOGICA EN LA CISTICERCOSIS	19
2.2.2.- MECANISMOS DE EVASION	17
2.3.- ANTICUERPOS MONOCLONALES	19
2.3.1.- LA RESPUESTA HUMORAL	19
2.3.2.- GENERALIDADES	21
3.0.- JUSTIFICACION	30
4.0.- OBJETIVOS	31
5.0.- HIPOTESIS	31
6.0.- MATERIALES Y METODOS	32
6.1.- PREPARACION DE ANTIGENOS	32
6.2.- INMUNIZACION	36
6.3.- FUSION CELULAR	38
6.4.- DETERMINACION DE HIBRIDOS PRODUCTORES DE ANTI-EXOANTIGENOS	39
6.5.- CLONACION	40
6.6.- SUBCLONACION	40
6.7.- DETERMINACION DE CLASES DE ANTICUERPOS	40
6.8.- DETERMINACION DE SUBCLASES DE ANTICUERPOS	41
6.9.- DETERMINACION DE REACCIONES CRUZADAS	41

6.10.- INMUNOELECTROTRANSFERENCIA	42
6.11.- SISTEMA DE CAPTURA DE ANTIGENOS AcMo ADSORBIDO	42
6.12.- INDUCCION DE LIQUIDO DE ASCITIS EN RATONES BALB/C	43
6.13.- PURIFICACION DE ANTICUERPOS POR AFINIDAD EN COLUMNAS DE AFFI-GEL PROTEINA A	43
6.14.- PURIFICACION DE ANTICUERPOS POR TECNICA DE MAPS II	44
6.15.- SISTEMA HETEROLOGO DE CAPTURA AcPo ADSORBIDO	44
6.16.- SISTEMA HETEROLOGO DE CAPTURA AcMo E7 INMUNOADSORBIDO	45
7.0.- RESULTADOS Y OBSERVACIONES	46
7.1.- ANTIGENOS	46
7.2.- RESPUESTA HUMORAL DE LOS RATONES	46
7.3.- TAMIZADO	46
7.4.- CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	48
7.5.- CAPTURA DE ANTIGENOS	55
8.0.- DISCUSION	70
9.0.- CONCLUSIONES	77
10.0.- BIBLIOGRAFIA	78

INDICE DE FIGURAS

N. de figura	nombre de figura	pág
1	Escólex de <u>Taenia solium</u>	3
2	Rostelo de <u>Taenia solium</u>	3
3	Huevecillos de <u>Taenia solium</u>	5
4	Corte transversal de un huevo de <u>Taenia solium</u>	5
5	Tegumento del metacéstodo de <u>Taenia solium</u>	6
6	Ciclo de vida de <u>Taenia solium</u>	8
7	Diagrama general de la estructura de un anticuerpo	20
8	Diagrama general de la producción de Anticuerpos Monoclonales	22
9a	Vía clásica y alterna en la síntesis de precursores de DNA	25
9b	Análogos estructurales	26
10	Bandeo electroforético del antígeno E+P	47
11	Bandeo electroforético de los exoantígenos	47
12	Determinación de anticuerpos IgG	48
13	Líneas productoras de anti-exoantígenos	48
14	Determinación de clases de anticuerpos	49
15	Evaluación de la producción de anticuerpos	49
16	Clonación celular	50
17	Tamizaje celular	50
18	Determinación de subclases	51
19	Gráfica de reacciones cruzadas	52
20	IET Ag E+P en condiciones reductoras frente a anticuerpo monoclonal E7	53
21	IET Ag E+P frente a anticuerpo monoclonal E7	53
22	IET Ag E-S en condiciones reductoras frente a anticuerpo monoclonal E7	54
23	IET Ag E-S frente a anticuerpo monoclonal E7	54
24	Sistema heterólogo de captura	55
25	Ratón ascítico	56
26	Evaluación Espectrofotométrica	57
27	Evaluación Inmunológica	58
28a	Determinación espectrofotométrica	59
28b	Determinación inmunológica	59
29	Bandeo electroforético de purificados	60
30	Tinción en plata de purificados	61
31	IET de Anticuerpo Monoclonal	61
32	Sistema heterólogo de captura	62
33	Reacciones cruzadas entre el anticuerpo	

	policonal y monoclonal	62
34	Sistema heterólogo de captura	63
35	Efecto de la dilución del anticuerpo monoclonal sobre el sistema de captura	64
36	Efecto de la dilución del anticuerpo policlonal sobre el sistema de captura	64
37	Sistema heterólogo de captura (anticuerpo monoclonal como agente captador)	65
38	Comparación de sistemas de captura	66
39	Influencia de la dilución del anticuerpo monoclonal sobre el sistema de captura	66
40	Sistema heterólogo de captura (revelado con sistema avidina-peroxidasa)	67
41	Validación del sistema de captura	67
42	Absorbancias promedios de muestras evaluadas	68
43	Inmunoelctrotransferencia entre suero humano normal y anticuerpo monoclonal E7	69
44	Inmunoelctrotransferencia entre suero humano normal en condiciones reductoras y anticuerpo monoclonal E7	69

INDICE DE TABLAS

N. de Tabla	nombre de la tabla	pág.
1	Aplicaciones de los anticuerpos monoclonales	29

LISTA DE ABREVIATURAS

AcMo	Anticuerpo monoclonal
AcPo	Anticuerpo policlonal
Ag	Antígeno
AGPMT	Asociación Guatemalteca de Parasitología y Medicina Tropical
AMP	Adenilato
Col	Colaboradores
CPA	Célula presentadora de antígeno
CTP	Citidil trifosfato
OPS	Organización Panamericana de la Salud
DMSO	Dimetil sulfoxido
DNA	Acido desoxirribonucleico
D.O.	Densidad óptica
E+P	Antígeno crudo escólex-pared
E-S	Antígenos de excreción-secreción
Fc	Fracción cristalizable
Fab	Fracción de union al antígeno
GMP	Guanidilato
GP	Glicoproteínas
HAT	Hipoxantina-aminopterina-timidina
HGPRT	Hipoxantina-guanina-fosforibosil transferasa
IET	Inmunolectrotransferencia
Ig	Inmunoglobulinas
IL	Interleucina
IMP	Inosinato
kDa	Kilodaltones
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad o-Fenilendiamina
OPD	Organización Panamericana de la Salud
OPS	Solución amortiguadora de fosfatos
PBS	Poli(etil)englicol
PEG	Parahidroximercuribenzoato
PHMB	Fenil-metil-sulfonil fluoruro
PMSF	Acido ribonucleico
RNA	Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Tomografía Axial Computada
TAC	Timidina cinasa
TK	Tosil lisina clorometil cetona
TLCK	Tosilamida feniletil clorometil cetona
TPCK	Uridilato
UMP	Uridil trifosfato
UTP	Suero fetal bovino
SFB	

RESUMEN

Recientemente se han desarrollado técnicas que puedan poner de manifiesto la presencia del parásito, tal es el caso de los métodos de captura de antígeno en fluidos corporales. Desafortunadamente el empleo de anticuerpos policlonales en este tipo de técnicas ha llevado a detectar reacciones cruzadas en un porcentaje importante.

El objetivo de este trabajo fue la caracterización de un anticuerpo monoclonal anti-exoantígenos (antígenos de excreción-secreción) de cisticercos para su uso en el laboratorio como reactivo de diagnóstico, con el objeto de disminuir el fenómeno de reacción cruzada, es decir, aumentar la especificidad de la prueba de captura de antígenos, además de permitir la detección de una parasitosis activa.

Se llevó a cabo la producción de los exoantígenos de cisticercos por cultivo del metacáston en medio RPMI (sin complementar), se realizó la cosecha de este medio el cual se usó como antígeno en la inmunización de ratones de la cepa Balb/c. La fusión celular se llevó a cabo con células esplénicas de los ratones inmunizados y el mieloma Ag8. Los híbridos resultantes fueron enfrentados contra los exoantígenos y los hibridomas positivos fueron clonados, obteniéndose tres anticuerpos monoclonales, que posteriormente fueron caracterizados por inmunoelectrotransferencia desarrollando el mismo reconocimiento para los diferentes antígenos, poniendo así de manifiesto que se trataba del mismo anticuerpo.

Se procedió a la implementación de un sistema de captura de antígenos que mostró una baja sensibilidad (5µg/ml). Este sistema fue validado por medio del análisis de muestras positivas y negativas a cisticercosis (referidas a la técnica de captura de anticuerpo), arrojando por resultado, el reconocimiento por parte del anticuerpo monoclonal de una proteína presente en suero pero no en líquido cefalorraquídeo. Por inmunoelectrotransferencia se pudo establecer que en condiciones reductoras los polipéptidos reconocidos por el anticuerpo monoclonal (aprox. 5); presentaban tamaños que oscilan entre los 70 y los 100 kDa.

2.0.- INTRODUCCION

2.1.- EL PARÁSITO

2.1.1.- ASPECTOS MORFOLOGICOS

La Taenia solium comúnmente denominada solitaria, es un cestodo del orden Cyclophyllidae responsable de la Teniasis, parasitosis que es llevada a cabo en el intestino (particularmente en el yeyuno) del hombre, que es su hospedero definitivo. Su longevidad ha sido reportada hasta de 25 años, y su número varía desde un solo parásito, hasta unos pocos ejemplares (Asada y col,1956). Su clasificación taxonómica se describe a continuación:

PHYLUM	Platyhelminthes
CLASE	Cestoidea
SUBCLASE	Eucestoidea
ORDEN	Cyclophyllidae
FAMILIA	Taeniidae
GENERO	Taenia
ESPECIE	<i>Taenia solium</i>

La Tenia se mantiene anclada al intestino por un roseto que presenta entre 22 y 32 ganchos dispuestos en una doble corona (Figuras 1 y 2), además de dos pares de ventosas que al igual que los ganchos fungen como estructuras de fijación. Dichas estructuras se localizan en un órgano de 0.6 a 1 mm. aproximadamente denominado escólex, que es el que alberga al ganglio nervioso del parásito. Posterior al escólex se localiza el cuello de donde se origina el estróbilus que es un órgano constituido por cientos de fracciones (de 700 a 1000), denominadas proglótidos. La longitud que puede llegar a desarrollar el parásito va de 1.5 a 9 metros (Rabiela 1982).

El estróbilus consta de tres tipos de proglótidos: los inmaduros que son los de menor desarrollo, y los más próximos al cuello, no se encuentran sexualmente diferenciados; los maduros que poseen los órganos sexuales del parásito, provistos de un ovario trilobulado, con dos lóbulos laterales y uno de menor tamaño; en su interior alberga un promedio de 200 testículos y presenta un poro genital que es irregularmente alternado. Los proglótidos grávidos que se localizan en la porción final del parásito y que contienen miles de huevos, son eliminados espontáneamente junto con las heces y liberados al medio después de tres a cuatro meses de iniciada la infección. Además de contener a los órganos reproductores del parásito, y llevar a cabo la fecundación (y por consiguiente la producción de huevos), Los proglótidos son los encargados de proveer de nutrientes a la tenia por medio de una estructura denominada tegumento que envuelve a cada uno de los proglótidos del parásito (Rabiela, 1982).

El agente infeccioso de la cisticercosis es el huevecillo, que como ya hemos mencionado se origina e los proglótidos mediante la fecundación hermafrodita realiza

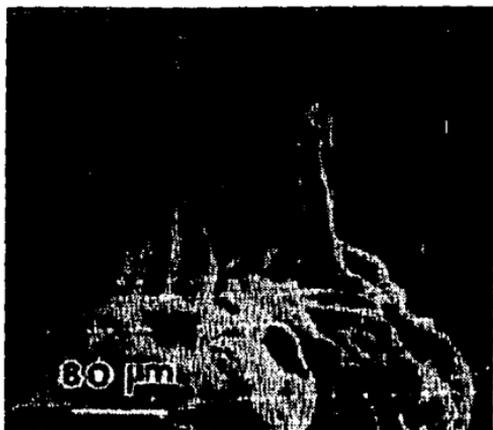


Figura 1. Escólex de Taenia solium. Se muestra el escólex de Taenia solium con el rostellum "expuesto"

(Cañedo y col, tomado de Flisser, 1982)

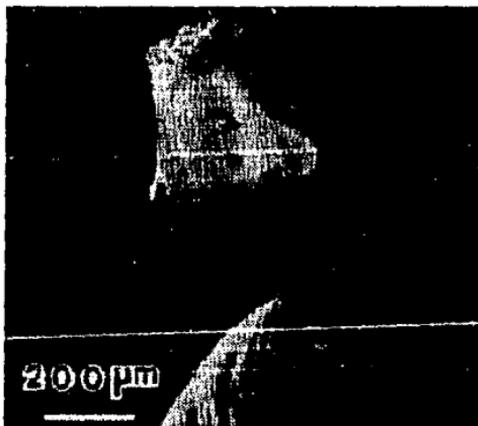


Figura 2. Rostellum de Taenia solium. El rostellum de Taenia solium retraído, característico cuando el cisticerco casi ha evaginado.

(Cañedo y col, tomado de Flisser y col, 1982)

da en cada uno de los proglótidos. Los huevos de Taenia solium miden alrededor de 40 micras de diámetro (Figuras 3 y 4), y se encuentran envueltos por una estructura denominada vitelo, que a través del cual se realiza el paso de nutrientes. Más internamente se localiza una estructura conocida como embrióforo, que se conforma de una serie de ladrillos que reciben el nombre de bloques embriofóricos, compuestos por una proteína similar a la queratina, para finalmente localizar en el centro a la membrana oncosferal que recubre al embrión hexacanto que, mediante un complejo sistema muscular regula las funciones de los tres pares de ganchos. El embrión posee las células germinativas, las cuales son las encargadas de iniciar el desarrollo al siguiente estadio del parásito, conocido como cisticerco (Laclette y col, 1982; Laclette y col, 1985). El metacéstodo de la Taenia solium, conocido como cisticerco es la fase postevolutiva de la oncosfera (que posterior a su migración desde la luz intestinal se aloja en el músculo, el tejido óptico y el cerebro). Se encuentra compuesto por un escólex invaginado, esta estructura se conforma por un canal espiral y cuatro ventosas, así como un rostelo con una doble corona de ganchos (Slais, 1982). El canal espiral se encuentra plegado y se divide en tegumento, subtegumento y parénquima. El tegumento es una membrana gruesa, esto en función a la presencia de una membrana basal bien definida, con hendiduras profundas. Esta estructura se fusiona y continúa con la estructura homóloga en la vesícula, de tal forma que el poro evaginador se encuentra cubierto por el sistema tegumentario de la vesícula. El subtegumento posee una capa de células musculares en el límite interno, que permiten la evaginación. El rostelo presenta fibrillas y células musculares. Las ventosas desarrollan células musculares con una cubierta del sistema tegumentario. Ambas estructuras al momento de la evaginación fijan al parásito al intestino con la posterior pérdida de la vesícula (Slais, 1970 y 1982; Cárdenas y col, 1982). La vesícula es la estructura a través de la cual ocurre el intercambio metabólico del parásito con su hospedero y que alberga en su interior al escólex invaginado suspendido en el líquido vesicular. Presenta finos surcos con aspecto granular en la superficie. La pared vesicular está compuesta por:

El tegumento: es la estructura más externa y las células que la conforman son denominadas citones tegumentarios, la principal característica que presenta esta membrana, es la de poseer un gran número de mitocondrias por debajo de ella, de forma similar a la estructura que presenta el epitelio intestinal (Figura 5).

Las células de almacenamiento: las cuales principalmente contienen glucógeno y algunas grasas. La existencia de prolongaciones citoplasmáticas con otros tipos celulares, es característica de estas estructuras.

Las células musculares, o también denominadas miocitones se localizan subyacentes y a lo largo de todo el tegumento.

Los fibroblastos, son estructuras encargadas de producir fibrillas, se encuentran localizadas en todo el subtegumento, sustentando al sistema excretor, a la capa muscular y a las células de almacenamiento, además de delimitar el interior de la pared vesicular, de tal forma que se encuentra en íntimo contacto con el líquido vesicular.

Las fibras nerviosas, o axones nerviosos se localizan en el estroma, en todo el subtegumento.

Por último se encuentran las células en flama y a las células de los conductos que delimitan al sistema excretor de la vesícula (Slais,1970; Tay, 1972).

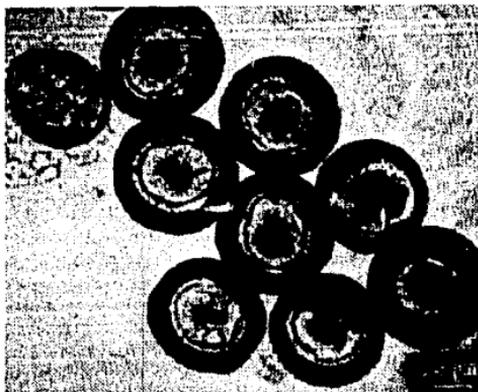


Figura 3. Huevecillos de Taenia solium. Microscopía de luz de un aislado fresco de huevos de Taenia solium.

(Laclette y col, tomado de Flisser y col,1982)



Figura 4. Corte transversal de un huevo de Taenia solium. Microscopía electrónica de barrido que muestra un huevo de Taenia solium. Las flechas señalan los ganchos oncosferales subyacentes a la membrana oncosferal.

(Laclette y col, tomado de Flisser y col,1982)

Este tipo de cisticerco es el que se encuentra en el hospedero intermediario del parásito, que en este caso es el cerdo, a este tipo de cisticerco se le conoce como cisticerco celuloso (Rabiela, 1985).

Existe una variante del cisticerco celuloso, y es la descrita para el hombre en la neurocisticercosis, a esta variante se le conoce como cisticerco racemoso, que solo es encontrado en el cerebro del ser humano (Rabiela-Cervantes, 1989). El cisticerco racemoso posee una vesícula lobulada, ésta variante de cisticerco es la de mayor talla, ya que puede alcanzar los 20cm alojando en su interior hasta 60ml de líquido vesicular (Berman y col, 1981; Jung y col, 1981), además de no presentar escólex. Ambas variantes pueden coexistir en el mismo individuo, siendo el celuloso el más frecuente (Berman, 1981; Rabiela y col, 1982 y 1985). El descubrimiento de cisticercos bilobulados con escólex visible, sugiere que dicha variante provenga del cisticerco celuloso, ya que durante un tiempo se postuló que el *C. racemoso* fuese la larva de alguna otra especie (Rabiela y col, 1982, 1985 y 1989).



Figura 5. Tegumento del metacéstodo de *Taenia solium*. Microscopía electrónica de transmisión del tegumento del cisticerco de *Taenia solium*. (Willms y col, tomado de Flisser y col, 1982)

2.1.2.- CICLO BIOLÓGICO

El ciclo de vida de T. solium (Figura 6), empieza cuando un individuo con teniasis elimina proglótidos grávidos o huevos en sus heces fecales, y estos son ingeridos por el hospedero intermedio (el cerdo), el huevo al encontrarse en el estómago del cerdo, y por la acción de las enzimas digestivas, libera al embrión por la digestión de sus membranas. El embrión al quedar liberado se une al epitelio intestinal mediante sus órganos de fijación, y con la ayuda de sus propias enzimas logra atravesar la pared intestinal y migrar a linfa y torrente circulatorio. La etapa de migración hacia sus órganos blanco no se encuentra bien definida. El establecimiento del parásito en los diferentes órganos trae consigo un aumento considerable de su tamaño. Así de tan sólo medir unas cuantas micras pasa a ser un organismo de algunos milímetros (Rabiela, 1985).

El ciclo biológico continúa en el momento en que el ser humano ingiere carne de cerdo infectada mal cocida o cruda, originando el paso de los cisticercos al estómago del hombre, y una vez más por la acción enzimática y la presencia de las sales biliares el parásito es reactivado, provocando su evaginación y anclaje al epitelio intestinal, para posteriormente desarrollar una estrobilación y convertirse en un parásito adulto en el transcurso de algunos meses (Cañedo, 1982).

La presencia de la fase adulta en el ser humano es el factor condicionante para el desarrollo de la cisticercosis humana, ya que el hombre accidentalmente puede adquirir la cisticercosis, y aunque desde el punto de vista del ciclo biológico no representa importancia (ya que el ser humano no practica normalmente la antropofagia), las implicaciones de esta parasitosis son de gran relevancia. El desarrollo de la fase adulta del parásito trae como consecuencia la producción de los huevecillos dentro de los proglótidos, y su liberación junto con las heces. De tal forma que un individuo teniásico, puede liberar miles de huevos, los cuales se diseminan en el ambiente, y al ser ingeridos por el hombre eclosionan en el aparato digestivo del hospedero, esto ocurre por la digestión de los bloques embrionarios bajo la acción de las enzimas proteolíticas intestinales (Laclette y col, 1982). Las oncosferas ya libres atraviesan la pared intestinal migrando hacia sus órganos blanco, por linfa o torrente circulatorio (revisado en Correa y col, 1991).

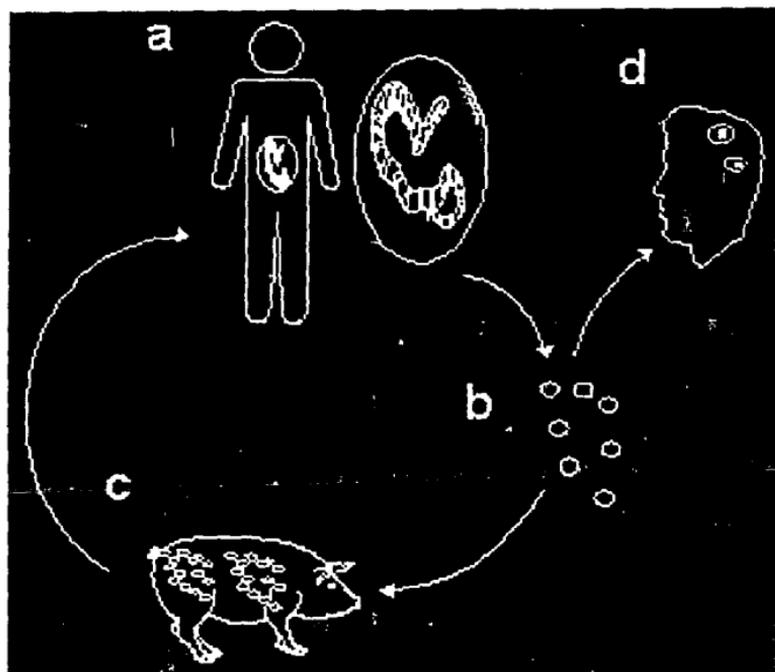


Figura 6. Ciclo de vida de *Taenia solium*. a) individuo con teniásis; b) huevecillos de la tenia liberados por el teniástico; c) cerdo infestado por cisticercos; d) individuo con cisticercosis.

2.1.3.- LA NEUROCISTICERCOSIS

ASPECTOS CLINICOS

La Neurocisticercosis es la presencia del metacéstodo en el cerebro, siendo la parasitosis mas frecuente en el Sistema Nervioso Central (Hernández y col, 1987).

Topográficamente se divide en cisticercosis encefálica o espinal. La cisticercosis espinal a su vez se subdivide en: a) Intramedular; y b) Leptomeningea (Akiguchi y col,1979). La neurocisticercosis es un padecimiento con una sintomatología muy diversa describiéndose disfunciones motoras como la parálisis hasta la presencia de crisis convulsivas (Rabiela y col,1982). La heterogeneidad de la sintomatología se puede atribuir a diferentes factores tales como: carga parasitaria; talla del parásito; localización; viabilidad del parásito; intensidad de la respuesta por parte del hospedero; etc. Los efectos de la neurocisticercosis son: la presión mecánica ejercida por el parásito; la destrucción parcial del tejido y las reacciones inflamatorias, debidas a la respuesta inmunológica del hospedero (Dixon y col,1961; Rabiela y col,1982; Del bruto y col,1988; Cárdenas F,1989).

Una de las clasificaciones de la cisticercosis cerebral, la divide en benigna y maligna. La benigna contempla a los quistes parenquimatosos, calcificados, que generalmente conllevan a una buena evolución del paciente, siendo sintomáticas o con trastornos leves, incluyendo crisis parciales dependiendo de la localización del quiste. La maligna agrupa a aquellos pacientes que desarrollan aumento en la presión intracraneana por hidrocefalia, debido a la presencia de quistes intraventriculares o del acueducto de Silvio, pudiendo ocluir los agujeros interventriculares (Estañol y col,1986).

Otros autores han descrito la posibilidad de que las formas parenquimatosas y subaracnoideas lleguen a desarrollar disfunciones neurológicas como el infarto cerebral, tal es el caso de los quistes localizados en las vecindades a grandes vasos promoviendo la oclusión de estos (Sotelo y col,1985; Mc Cormick y col,1982; Madrazo y col,1989). El periodo de latencia de esta parasitosis es prolongado, oscilando entre los 4 y 5 años, esto con base en la poca reacción inflamatoria desarrollada por el quiste, que se acrecenta con la muerte del parásito (Sotelo y col, 1985). Con base en la heterogeneidad de la sintomatología en esta parasitosis, la neurocisticercosis se encuentra entre el diagnóstico de numerosas enfermedades del Sistema Nervioso Central, pudiendo confundirse con tumores cerebrales, cuadros clínicos de meningitis, aracnoiditis, vasculitis e hidrocefalia. Así también se deben tomar en cuenta parámetros para la diferenciación de otras parasitosis como: toxoplasmosis, hidatidosis, paragonimiasis y tuberculosis. Algunos estudios realizados en México y Perú permitieron concluir que la etiología más frecuente en el inicio de crisis convulsivas tardías es la neurocisticercosis (Escobedo, 1989; García y col,1993). Donde la epilepsia y la hipertensión intracraneana son los rasgos clínicos comúnmente presentados (Monteiro y col,1993; Villa y col,1993). Algunos reportes ponen de manifiesto la importancia del sexo en el desarrollo de respuestas inflamatorias y en el pronóstico de la enfermedad, siendo mas grave en el sexo femenino (Rangel y col,1987; Del Bruto y col,1988).

Es importante hacer notar que los datos clínicos que hacen sospechar el diagnóstico de neurocisticercosis son:

- La aparición de crisis convulsivas tardías.
- La cefalea crónica (sin mejora con tratamientos comunes).
- Hipertensión endocraneana.

También es importante tomar en cuenta los factores epidemiológicos tales como:

- Haber residido en zonas endémicas.
- Antecedentes de teniasis en su entorno social (Sotelo J,1987).

La oftalmocisticercosis es la presencia del quiste detrás de la retina, o en el humor vítreo cuando logra atravesarla, produciendo desgarro de la misma, provocando una reacción inflamatoria. Sus repercusiones son diferentes grados de alteración de la agudeza visual. En el estudio oftalmoscópico se puede observar el desprendimiento de la retina, las hemorragias y el proceso inflamatorio y ocasionalmente se logra observar al cisticerco (OPS,1993).

La cisticercosis muscular o subcutánea produce una tumuración que va de 1 a 2cm de diámetro, con poco desarrollo de dolor (OPS,1993).

Los datos epidemiológicos han demostrado que la cisticercosis humana ocupa un lugar preponderante entre las enfermedades del sistema nervioso central en México. Por medio del análisis de series de autopsias se ha encontrado que entre el 1 y el 3% de los cadáveres tienen cisticercos en el cerebro (Albores y col, 1971).

A finales de la década de los años 70 se llevó a cabo la primera Encuesta Seroepidemiológica Nacional, la cual arrojó como resultado una seropositividad global del 1%, y que la prevalencia de los positivos era mayor en las áreas relacionadas con la porcicultura (Woodhouse y col, 1982), dicha encuesta fue realizada empleando la técnica de inmunolectroforesis. Recientemente se terminó la segunda Encuesta Seroepidemiológica Nacional y los datos indicaron una prevalencia de seropositivos de alrededor de 1.2% (Larralde y col, 1992). Los estudios en comunidades pequeñas estudiadas con más detenimiento han demostrado la relación física entre teniásicos y cisticercosos, concluyendo que la transmisión de la cisticercosis humana y porcina es un proceso esencialmente familiar (Flisser, 1988; Diaz-Camacho y col,1989; Aguilera-García y col, 1989).

2.1.4.- DIAGNÓSTICO

PARA EL ADULTO

Coproparasitoscópico

El diagnóstico para la fase adulta se basa en evidenciar la presencia de los huevos liberados en las heces de los individuos sospechosos. Técnicas como la observación con lugol, la técnica de Ritchie, el método de Kato-Katz, el método de frotis perianal, etc, son ejemplos de los exámenes coproparasitoscópico practicados, Y que proveen una sensibilidad que oscila alrededor del 50% (Tay y col.,1982; Schantz y col.,1990).

Inmunológico

Recientemente se ha descrito la detección de antígenos específicos de T.solium en las heces del hospedero. Esta técnica presenta las bases para poder ser empleada en el diagnóstico (Allan y col,1990; Deplazey y col,1990 y 1991; Maas y col,1991).

El método inmunológico descrito para la teniasis, se basa en la captura por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), con el uso de antisueros policlonales anti extractos totales del adulto, o anti-productos de excreción-secreción. El diagnóstico de individuos con exámenes negativos a la presencia de huevos, demostró la alta sensibilidad de la técnica (Allan y col,1990; Maas y col,1991).

Molecular

La especificidad del diagnóstico es afectada porque los huevos de la Taenia solium y la Taenia saginata son muy parecidos a la luz del microscopio (Schantz-Sarti,1989). Se han desarrollado técnicas moleculares como el análisis de proteínas de los proglótidos, y pruebas de DNA para los huevos y algunos otros componentes del gusano, para el diagnóstico diferencial de especie, pero los períodos de ausencia de proglótidos y huevos en las heces afectan la sensibilidad de dichas pruebas (Le Riche-Sewell,1978; Bursey y col,1980; Flisser y col,1988 y 1990; Harrison y col,1990).

PARA EL METACESTODO

Imagenológico

Debido a la diversidad de las expresiones clínicas de esta patología, ha sido preocupación de diversos grupos de investigadores el desarrollo de nuevas técnicas con mayor sensibilidad y especificidad. Durante mucho tiempo el único método imagenológico fueron los rayos X, que como característica solo determinaban a las formas calcificadas, limitando con esto su aplicación. Solo por el empleo de medios de contraste en forma indirecta se permitía la localización de formas quísticas sin mucha precisión (Dorfsman,1963; Rodríguez y col,1977).

Una de las técnicas más recientes para la detección de la neurocisticercosis por imagen, es la tomografía computada (TC), que revolucionó el diagnóstico en esta patología presentando una alta sensibilidad (hasta un 97%), para la neurocisticercosis con localizaciones parenquimatosas y subaracnoideas. Esta técnica también es susceptible a usarse en neurocisticercosis intraventricular, mediante el uso de medios de contraste (Rodríguez y col,1982). La correlación existente entre casos detectados por tomografía con respecto a cortes anatomopatológicos postmortem, reveló datos muy alentadores (Flisser y col, 1988).

Lo último en técnicas de imagen para el diagnóstico de esta parasitosis, es el empleo de la resonancia magnética nuclear. La imagen obtenida por esta técnica es comparable a la obtenida en un corte anatomopatológico. De gran relevancia ha sido

su uso para diferenciación de la localización parenquimatosa a la subaracnoidea, teniendo como grandes ventajas sobre las demás técnicas de imagen la de permitir una evaluación tridimensional de la médula, y la de no ser invasiva (Rodríguez y col,1982).

Inmunológico

Es importante resaltar que las pruebas inmunológicas durante mucho tiempo fueron los métodos de elección para la confirmación de la etiología en la cisticercosis. La fijación del complemento fue desarrollada en las primeras cinco décadas de este siglo. Esta prueba tiene una gran limitante, y es que no es específica para el suero, debido a la presencia del factor reumatoide en este. Posteriormente se describieron diversas técnicas tales como: La inmunoelectroforesis; la hemaglutinación pasiva; la inmunofluorescencia y la inmunodifusión doble (Niето,1956; Flisser y col,1975). La determinación de anticuerpos en líquido cefalorraquídeo y suero, mediante la reacción con un extracto crudo del metacéstodo empleado como antígeno, ha tenido como limitante el fenómeno de reacción cruzada con otras parasitosis, aunque es importante resaltar la alta correlación que existe entre sintomatología y positividad a la captura de anticuerpos. De hecho un estudio realizado recientemente puso de manifiesto el alto valor predictivo (hasta el 93%), de la prueba de captura de anticuerpos al analizar líquido cefalorraquídeo como muestra, con respecto al diagnóstico de imagen (Schantz y col,1980; Espinoza y col,1986; Olivo y col,1988; Mondragón y col,1994). La comparación de diversos antígenos empleados en esta técnica ha puesto de manifiesto la obtención de mejores resultados con el líquido vesicular del cisticerco, donde se ha llegado a obtener hasta el 81.25% de sensibilidad, y según los autores sin detectar falsos positivos (Morakote y col,1992).

El método de diagnóstico inmunológico más recientemente desarrollado es el realizado mediante inmunoelectrotransferencia (IET). El antígeno en este caso, una fracción de glicoproteínas obtenidas del cisticerco, son separadas con base en sus pesos moleculares por electroforesis en geles de poliacrilamida, teniéndose como resultado siete bandas diagnósticas reconocidas con diferentes frecuencias en sueros positivos; la sensibilidad obtenida es del 98%, mientras que la especificidad es del 100%. (Tsang y col,1989; Feldman y col,1990; Wilson y col,1991; Díaz y col, 1992). La prueba tiene una limitante, que es la presencia de lesiones únicas donde la prueba posee una baja sensibilidad (Wilson y col, 1991).

El empleo de una de estas glicoproteínas (GP24) en forma pura, en ensayos inmunoenzimáticos (ELISA y dot blot), eliminó el efecto de reacción cruzada, reportándose una sensibilidad y especificidad del 100% (Plancarte y col,1993). Últimamente se ha descrito un procedimiento similar, empleando antígenos solubles del metacéstodo de T.solium. Esta prueba fue validada mediante el análisis de muestras de cerdos infectados con cisticerco de Taenia solium, Equinococcus granulosus, Fasciola busky, y Trichinella spiralis. Todas las muestras confirmadas para cisticercosis con excepción de dos de ellas fueron positivas, y nueve de las muestras con otras parasitosis dieron reacción con alguna de las bandas diagnósticas. Se obtuvo una sensibilidad del 90% y una especificidad del 100%, en comparación con la ELISA que empleó el mismo antígeno obteniéndose una

sensibilidad del 70% y una especificidad del 73%. Las reacciones cruzadas ocurrieron con muestras positivas a E. granulosus. Las glicoproteínas de 8, 11, 16 y 23kDa fueron reconocidas específicamente por muestras de cerdos confirmados para cisticercosis (Pathak y col,1994). En suma todos estos hallazgos han revelado la mayor sensibilidad y especificidad de la prueba de IET con respecto al ensayo de ELISA (Schantz y col,1994).

Un problema de la determinación de anticuerpos en fluidos corporales es que no pone de manifiesto una infección, sino solo indica que el individuo ha estado en contacto con este parásito o con otros en caso de poderse atribuir a reacciones cruzadas. Esto originó la búsqueda de antígenos circulantes, con el propósito de determinar una parasitosis activa. La técnica elegida para determinar la presencia de antígenos fue un ELISA en el cual se empleaban anticuerpos monoclonales, dicha técnica dió una sensibilidad cercana al 70% (Correa y col,1989). La combinación de las pruebas de captura de antígeno y de anticuerpo para el diagnóstico en esta parasitosis no mejora mucho su sensibilidad (alrededor del 70%), pero con respecto a la especificidad, la prueba de captura de anticuerpos solo se ve afectada por la teniasis y la hidatidosis (Mason y col,1992).

La realización de un análisis multivariado que comprendiera a las tres últimas técnicas descritas (ELISA captura de antígenos, captura de anticuerpos e IET), y el tipo de muestra empleada, arrojó los siguientes resultados:

Con suero como muestra, la sensibilidad de la prueba de IET llegó hasta el 94%, y del 65% para captura de anticuerpos.

Con líquido cefalorraquídeo, la sensibilidad de la IET fue del 86%, del 62% para captura de anticuerpo, y del 67% para captura de antígenos. La especificidad de la IET es del 100%, en tanto que en la prueba de captura de anticuerpos apenas superó el 63%, las reacciones cruzadas para este ensayo se debieron a muestras de pacientes con hidatidosis e himenolepiasis (Díaz y col,1992).

Con base en la baja sensibilidad y especificidad que provee una técnica de captura de antígenos con anticuerpos policlonales, se han descrito recientemente pruebas similares con la variante del uso de anticuerpos monoclonales. Wang y col reportaron recientemente una prueba de detección de antígenos circulantes en líquido cefalorraquídeo con el empleo de un anticuerpo monoclonal, que condujo a una sensibilidad del 81.89%, y una especificidad del 100%. Concluyendo con esto que el método de captura de antígenos circulantes con anticuerpos monoclonales es mejor para el diagnóstico de neurocisticercosis activa (Wang y col,1992). Al comparar diferentes sistemas para la captura de antígenos circulantes del metacéfodo, se obtuvo como resultado una mayor sensibilidad para aquellos sistemas que involucraban el uso de anticuerpos monoclonales (Correa y col,1989). Otros autores han descrito el empleo de técnicas similares, reportando problemas de reacción cruzada principalmente con esparganosis y paragonimiasis. La técnica de ELISA-inhibición, ha provisto de una mayor especificidad, pero una baja importante en la sensibilidad (a Yong y col,1993). La producción de anticuerpos monoclonales contra otras parasitosis tales como sparganosis, paragonimiasis y cisticercosis por T. saginata, dieron como resultado reacciones cruzadas con muestras positivas a cisticercosis por T. solium (Brandt y col,1992; b Yong y col,1993; Yeo y col,1994).

2.1.5.- TRATAMIENTO

QUIRURGICO

El tratamiento quirúrgico de la neurocisticercosis es establecido de acuerdo a la localización del cisticerco. Esto es dependiente de si la larva se encuentra localizada en el parénquima cerebral, el espacio subaracnoideo o intraventricularmente; si la infección es con quiste único o múltiple. La cirugía no es el tratamiento de elección en todos los casos de neurocisticercosis, y no provee una cura total en el 100% de los casos. Los inconvenientes pueden ser, la presencia de quistes múltiples, inaccesibilidad hacia la larva, y la posibilidad de respuestas inflamatorias por la muerte del parásito. La aparición de edema en las áreas vecinas, o cicatrización de las áreas periféricas al cisticerco con la formación de lesiones aracnoidales, arteritis y en algunos casos oclusión vascular pueden producirse como efectos neurológicos secundarios a consecuencia de la intervención quirúrgica. Ocasionalmente este tratamiento se sugiere para el alivio de la hipertensión intracraneana. Durante algún tiempo los focos epilépticos ocasionados por cisticercosis cortical fueron eliminados por extirpación. En los casos intraventriculares, se notan evoluciones satisfactorias posteriores a la aliviación del bloqueo del líquido cefalorraquídeo. Concluyendo, en materia de tratamiento quirúrgico para pacientes neurocisticercosos, queda recomendado en quistes únicos, tomando en cuenta la accesibilidad para la intervención, no así en localizaciones meníngeas, o con presencia de reacción inflamatoria. En los casos recomendados la cura puede obtenerse por extirpación del foco irritativo, provocando la desaparición de los síntomas epilépticos (Escobedo,1989).

QUIMIOTERAPIA

En el tratamiento farmacológico de esta parasitosis se han empleado medicamentos de control sintomático o denominados paliativos, que reducen la sintomatología de la enfermedad, sin afectar directamente al agente causal (Escobedo,1989).

Los fármacos cestocidas más ampliamente usados en esta parasitosis han sido el metrifonato y también ha sido descrito el uso del praziquantel. El metrifonato es un compuesto organo-fosforado que afecta a la enzima acetilcolinesterasa del parásito, desafortunadamente este medicamento tiene efectos colaterales de importancia, situación por la cual se ha restringido su uso (Trujillo,1989).

El praziquantel que es una pirazin-isoquinoleína acetilada, ha demostrado su efectividad contra el cisticerco de diversas especies, incluyendo al de la T. solium en cerdos (Chavarría-Díaz,1978). Aunque este fármaco ha sido estudiado ampliamente en cisticercosis experimental (Thomas y col,1986), las investigaciones preliminares muestran una limitada información sobre el efecto en la parasitosis natural. Un estudio realizado en Corea, mostró la aparición de los primeros cambios histopatológicos a las dos semanas de iniciada la terapia cestocida con praziquantel, en pacientes con cisticercosis subcutánea (Rim y col,1980). La desaparición de las microticas y la degeneración del tegumento son efectos observados posteriores a la

administración del praziquantel (Thomas y col,1981). Las biopsias han puesto de manifiesto la desintegración y necrosis unos meses después del tratamiento (Rim y col,1980). Los estudios histopatológicos concluyen que la muerte del parásito sobreviene al final de la segunda semana de iniciado el tratamiento con praziquantel (Baranski y col,1980). A partir del inicio del tratamiento y en lo sucesivo el parásito ve reducido su tamaño y en la mayoría de los casos desaparece hacia los tres meses (Escobedo,1989). El desarrollo de epilepsia por algunos individuos con neurocisticercosis afecta su tratamiento con praziquantel (Srivastava y col,1993). Recientemente se ha sugerido el empleo del albendazol, que es un antihelmíntico de amplio espectro derivado del benzimidazol, aunque ambos fármacos no se indican en cisticercosis intraventricular ni oftalmocisticercosis (Flisser,1988). El seguimiento de la evolución de 38 pacientes con neurocisticercosis activa, fue realizada para evaluar la acción de una combinación de ambos fármacos, 23 de los 38 pacientes fueron tratados con los fármacos solos o en combinación. En la localización parenquimatosa la eficacia del medicamento fue completa, en el 81% y parcial en el resto de los pacientes. En contraste, en los casos de cisticercosis extraparenquimatosa los resultados fueron desalentadores (Monteiro y col,1993; Villa y col,1993). Otros estudios han puesto de manifiesto que dichas drogas solo pueden ser usadas en determinados casos (Monteiro y col,1993).

2.2.- LA RELACION INMUNOLOGICA HOSPEDERO-PARASITO

2.2.1.- LA RESPUESTA INMUNOLOGICA EN LA CISTICERCOSIS

Durante el desarrollo de la relación hospedero-parásito parece haber una adaptación del parásito para alargar su sobrevivencia con daño mínimo sobre el hospedero, con respecto al transcurso de la parasitosis. Esta aseveración se basa en el hecho de que un individuo teniásico aun manteniéndose en un ambiente de potencial riesgo de infección generalmente no desarrolla una cisticercosis, de lo anterior es lógico proponer un mecanismo de defensa, lo que sugiere un tipo de inmunidad local mediada por el parásito adulto a nivel de mucosa intestinal, que protege al hospedero de un efecto de autoinfección. En función a esto se ha reportado la baja incidencia de neurocisticercosis en pacientes teniásicos. Otra observación que favorece dicha hipótesis es la continua reinfección del cerdo, esto se explica al proponer la no inducción de inmunidad por parte de los huevos de T. solium, en función de que la oncosfera atraviesa rápidamente la pared intestinal no dando oportunidad de estimular una respuesta inmunitaria (Uribarren y col,1987).

Desde hace algún tiempo se ha estudiado la respuesta humoral en la cisticercosis; su estudio ha aportado importantes datos que han evidenciado la relevancia de las inmunoglobulinas de clase IgG, que son las inmunoglobulinas predominantes en los sueros de pacientes (hasta un 85%), las IgM ocupan el segundo lugar (50%), en tercer lugar las de clase IgA (26%), y contrario a lo esperado las inmunoglobulinas de la clase IgE estuvieron sólo en el 3% de los pacientes (Espinoza y col,1986). Los antígenos reconocidos son ocho, con distintas frecuencias. El denominado antígeno B, es el que con mayor frecuencia es reconocido por los sueros de los pacientes cisticercosos, presentándose hasta en el 84% de los sueros. La caracterización de este antígeno ha puesto de manifiesto, su composición química, que lo define como una glicoproteína de aproximadamente 95 kDa. Este antígeno se localiza tanto en la superficie del parásito como en los metabolitos de excreción y secreción (Guerra y col,1982; Laclette y col,1987). La presencia de este antígeno ha sido evidenciada en otros parásitos filogenéticamente cercanos al cisticerco de T. solium (Olivo y col, 1988). La secuencia de este antígeno ya ha sido determinada, reportándose una alta homología con respecto a la paramiosina de Schistosoma mansoni (Laclette,1991).

Algunos estudios realizados en pacientes con cisticercosis han puesto de manifiesto la falta de correlación entre los anticuerpos presentes en suero y aquellos del líquido cefalorraquídeo. La observación más importante de este estudio, fue el denotar la integridad de la barrera hematoencefálica, confirmando con esto la síntesis de anticuerpos *in situ* (Miller y col,1985).

Al referirnos a la respuesta celular, es importante hacer notar que ha sido pobremente estudiada, sin embargo, los hallazgos reportados han permitido sugerir algunas hipótesis. El análisis de la capacidad de la respuesta celular inespecífica por prueba cutánea frente a un purificado de Micobacterium tuberculosis realizada en un grupo de pacientes cisticercosos, demostró una disminución en dicha respuesta con respecto a lo establecido (Correa,1989).

De igual forma el examen de transformación blastoide de linfocitos mediante el uso de mitógenos reportó un muy pobre resultado con respecto al grupo de individuos sanos.

2.2.2.- MECANISMOS DE EVASION

Refiriéndonos a los casos concretos de la neurocisticercosis y de la oftalmocisticercosis, podríamos describir a la localización del parásito como un mecanismo de evasión inmune, ya que esto sitúa al cisticerco en zonas aisladas del sistema inmunológico, por la presencia de las barreras tanto hematoencefálicas y hematocoroideas. Algunos experimentos realizados con otras especies, pusieron de manifiesto que los animales previamente inmunizados contra el parásito no permiten el alojamiento del cisticerco en la cavidad ocular, mientras que aquellos que no habían estado en contacto con el parásito alojaron el parásito en el ojo (Cárdenas, 1989)

El principal mecanismo de evasión descrito para la cisticercosis es el mediado por el antígeno B, el cual se ha reportado como un exoantígeno, además de ser un muy buen inmunógeno (Plancarte y col, 1983), características que le permiten ejercer diferentes acciones tales como:

- Desviación de los anticuerpos específicos por el efecto de "cortina de humo" hacia los tejidos adyacentes.
- Depósito de complejos inmunes, puesto que este antígeno posee gran afinidad por la colágena presente en la pared vascular. Este fenómeno trae consigo la aparición de focos de reacción inflamatoria a distancia del parásito, distraendo una vez más al sistema inmunitario.
- Acción inhibitoria sobre el complemento, con base en que el antígeno B puede unirse al C1q a través de su fracción colagénica, pudiendo crear efectos inhibitorios sobre la cascada del complemento (Laclette y col, 1991)

Un mecanismo de evasión ampliamente descrito en las parasitosis es el enmascaramiento del agente por medio de una cubierta de antígenos del hospedero, de tal forma que el sistema inmune lo reconoce como propio, es este el caso para resaltar la posible presencia de un receptor para la fracción Fc en la membrana del cisticerco, además de existir evidencias de la internalización de inmunoglobulinas del hospedero por el cisticerco en otras especies (T. taeniaeformis), teniendo como consecuencia un efecto no solo evasor, además como mecanismo de nutrición para el parásito (Hayunga y col, 1989; Ambrosio y col, 1994).

La presencia de moléculas del MHC en la superficie del cisticerco, se consideró en algún tiempo como un efecto de enmascaramiento como el anteriormente descrito, ya que al encontrarse antígenos propios del hospedero en el parásito, traía como consecuencia un efecto de identidad inmunológica que disminuía la antigenicidad del cisticerco (Correa y col, 1986). Posteriormente se describió que la presencia de moléculas del MHC se correlaciona con la coexistencia de respuestas inflamatorias, luego entonces, se ha postulado que este fenómeno se asocia más con mecanismos de daño, que con mecanismos de evasión (Trejo y col, 1989).

La estimulación policlonal inespecífica también se ha postulado, con base en el gran número de antígenos liberados por el cisticerco, ya que muchos de estos productos son mitógenos para los linfocitos B y T. Se cree que este fenómeno conduce a un trastorno en la función de los linfocitos B, y una disminución progresiva de los linfocitos B específicos, con la consiguiente inmunosupresión, es decir, una extenuación clonal derivada de una proliferación inespecífica (Roitt y col, 1991). Una evidencia más que puede sugerir la inmunosupresión del hospedero por acción del parásito, es la presencia de una elevada cantidad de linfocitos con cromosomas anormales periféricos en la cisticercosis porcina (Flisser, 1989).

Ensayos de viabilidad *in vitro* de eosinófilos, reportaron la posible existencia de un factor eosinotóxico presente en los metabolitos de excreción y secreción del cisticerco, explicándose así la sobrevivencia *in vivo* del parásito, aun rodeado de eosinófilos. (Medina, 1992).

2.3.- ANTICUERPOS MONOCLONALES

2.3.1.- LA RESPUESTA HUMORAL

La respuesta inmunitaria es una serie de eventos complejos que se inicia con la presencia de un inmunógeno o antígeno, que estimula una gran diversidad de fenómenos que tiene como objeto la eliminación del agente que la provoca (Stites-Terr,1993).

La respuesta inmunológica depende principalmente de tres tipos de células: los macrófagos, los linfocitos T, y los linfocitos B. Estas estirpes celulares poseen receptores membranales que reconocen ciertas regiones del antígeno denominadas determinantes antigénicas o epítomos. Al entrar en contacto con sus epítomos correspondientes dichas células se activan y proliferan formando una clona celular diferenciada (Escobar y col,1992; Stites-Terr,1993).

La respuesta a la mayoría de los inmunógenos requiere de un evento de procesamiento de dicho inmunógeno por las células presentadoras de antígeno. La razón de esto es que las células T son las orquestadoras de la respuesta inmunitaria, y que por lo general solo reconocen a los inmunógenos cuando estos se encuentran unidos a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), que se encuentran presentes en la superficie de otras células. Como hemos mencionado, las células T son las moderadoras de la respuesta inmune, la activación de éstas requiere de al menos dos señales. La primera es la presentación del antígeno por parte de las células presentadoras de antígeno, y la segunda la liberación de interleucina-1 (IL-1). Estas señales originan la expresión de la interleucina-2 (IL-2) y de otra serie de factores de crecimiento para otras células, de tal forma que la función principal de la IL-2, es la amplificación de la respuesta de células T.

La producción de anticuerpos requiere la activación de linfocitos B y su consiguiente diferenciación a células plasmáticas, el orden cronológico de esta cascada de eventos podría definirse de la siguiente forma; mientras las células T se activan como se describió anteriormente, las células B específicas se unen al inmunógeno por medio de sus receptores. El siguiente paso es la internalización del complejo antígeno-receptor por parte de la célula B proporcionando la señal de activación, que por si sola no es suficiente, este fenómeno requiere de factor de crecimiento para células B (Interleucina 4), y el factor de diferenciación de células B (Interleucina 6), que las diferencian hasta células plasmáticas que es la fase encargada de la secreción de anticuerpos. Un hecho a tomarse en cuenta en este proceso es que la interacción realizada entre las células B y T deberá ser en una estrecha proximidad, por la característica que presentan estos factores de poseer un radio pequeño de actividad, situación que se comprende bajo la consideración de que las células B tienen la capacidad de actuar como células presentadoras de antígenos (CPA), y por lo tanto mantener un íntimo contacto con los linfocitos T (Roitt y col,1991; Escobar y col,1992; Stites-Terr,1993). Durante el curso de esta cascada de eventos, una fracción de los linfocitos B no son diferenciados a células plasmáticas, creándose así un grupo de fondo denominado células de memoria que responden a encuentros subsiguientes con el antígeno que las indujo (Stites-Terr,1993).

Las inmunoglobulinas (Ig), son un grupo de proteínas que poseen la capacidad de unirse específicamente a la molécula que indujo su formación, y son las estructuras que comprenden a la rama humoral de la respuesta inmunitaria (Stites-terr,1993). Las Ig son glicoproteínas que contienen de un 3 y hasta un 12% de carbohidratos. Las Ig se conforman de dos tipos de cadenas polipeptídicas la menor (ligera) con un peso molecular de 25,000 y una mayor (pesada) de 50,000-77,000 kDa, y que es diferente para cada clase y subclase de Ig. Las cadenas polipeptídicas de las Ig están unidas por fuerzas covalentes y no covalentes formando una estructura de cuatro cadenas, compuesta de un par de cadenas ligeras y pesadas idénticas. En el ser humano existen cinco clases diferentes de Ig (IgG,IgM,IgA,IgE,IgD). A su vez las clases de Ig se dividen en subclases (IgG1,IgG2,IgG3,IgG4,IgA1,IgA2). Se ha demostrado que las cadenas ligeras de la mayoría de los vertebrados se presentan en dos formas Kappa y lambda. Cualquiera de las cadenas ligeras pueden combinarse con cualquiera de las cadenas pesadas, pero en una misma molécula siempre serán las mismas, de tal forma que no existen moléculas híbridas naturales. La estructura de las Ig puede dividirse en dos partes, la primera que es la encargada de la unión con el epítopo y que ha sido denominada Fab, y la segunda que no participa en la reacción con el antígeno conocida como Fc, y que es la encargada de la fijación del complemento, la liberación de histamina por células cebadas, paso a través de placenta, la opsonización, etc. La característica principal de esta familia de proteínas es la especificidad que posee por su estructura antigénica correspondiente. Los extremos aminoterminales de las cadenas se caracterizan por la variabilidad de frecuencia, por lo que se designan como regiones V_H y V_L (Figura 7). El resto de la molécula es relativamente constante, las porciones constantes de la cadena ligera se conoce como CL, y la porción constante de la cadena pesada se divide en tres $CH1$, $CH2$, y $CH3$, estas regiones globulares se hallan estabilizadas por enlaces disulfuro, y se conocen como dominios. La región de la bisagra se halla entre los dominios $CH1$ y $CH2$, y es la encargada de conferirle flexibilidad a la molécula (Stites-Terr,1993).

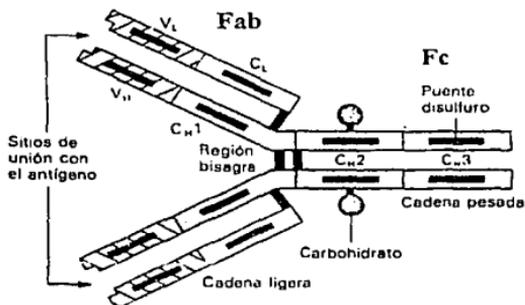


Figura 7. Diagrama general de la estructura de un anticuerpo.

(tomado de Roitt y col, 1991)

2.3.2.- GENERALIDADES

La metodología para la producción de anticuerpos monoclonales descrita en 1975 (Kohler y Milstein, 1975), ha sido desde entonces motivo de constante uso en las áreas biológicas, biotecnológicas y clínicas, teniendo un gran impacto.

Los anticuerpos monoclonales han sido de gran utilidad debido a las siguientes características: su especificidad, la homogeneidad química, física e inmunológica de dichos anticuerpos y la posibilidad de producción en grandes cantidades (Stites y Terr, 1993). Aunado a esto la producción de anticuerpos monoclonales puede realizarse a partir de antígenos impuros obteniéndose anticuerpos específicos, ya que los hibridomas al ser clonados proveen anticuerpos mono-específicos, aunque su producción haya sido estimulada por mezclas complejas de antígeno (Harlow-Lane, 1988).

Esta técnica está basada en la fusión de dos clases de células, mediante el uso de un desestabilizador de membranas, tal es el caso del polietilenglicol (PEG). Las células involucradas son las células B sensibilizadas contra un antígeno específico, provenientes de bazo (aunque pueden emplearse ganglios), y una célula tumoral para este caso un mieloma, nos da por resultado un híbrido que posee las características de secretar anticuerpos específicos para un determinado antígeno, y la característica de la inmortalidad heredada del mieloma (Milstein, 1984; De Groth-Scheidegger, 1980). De tal forma que estas células pueden ser manipuladas en cultivo (Figura 8) o expandidas en gran escala en animales genéticamente compatibles (Milstein, 1984; Gavilondo, 1987). Últimamente se pueden expandir en compartimentos concentradores con mejor resultado al obtenido por la inducción en ratones.

El protocolo de inmunización empleado para la obtención de células B, reviste una gran importancia ya que con base en este se puede desviar la producción de anticuerpos monoclonales hacia una clase o subclase de inmunoglobulina en particular.

Tal es el caso del uso del adyuvante que en los antígenos de parásitos promueve la formación de anticuerpos de la subclase IgG1 principalmente. De igual forma el empleo del bazo trae como consecuencia hibridomas que muestran una distribución de anticuerpos muy semejante a la encontrada en el suero (Johnson y col, 1981). En contraste a lo que sucede cuando se sensibiliza a los ratones por una infección crónica, lo que trae como consecuencia la obtención de anticuerpos de la subclase IgG2 e IgG3 principalmente (Handman-Remington, 1980).

Los primeros hibridomas fueron hechos con un virus como agente fusionante (virus Sendai), pero ahora las fusiones son realizadas con polietilenglicol (PEG), y como resultado se ha obtenido una alta frecuencia de fusiones y una gran reproducibilidad. La fusión con PEG da como resultado células multinucleadas (*heterokaryons*), que en su posterior división celular fusionan sus núcleos pudiendo mantener igual, menor o mayor cantidad de material genético respecto al inicialmente presentado por las células.

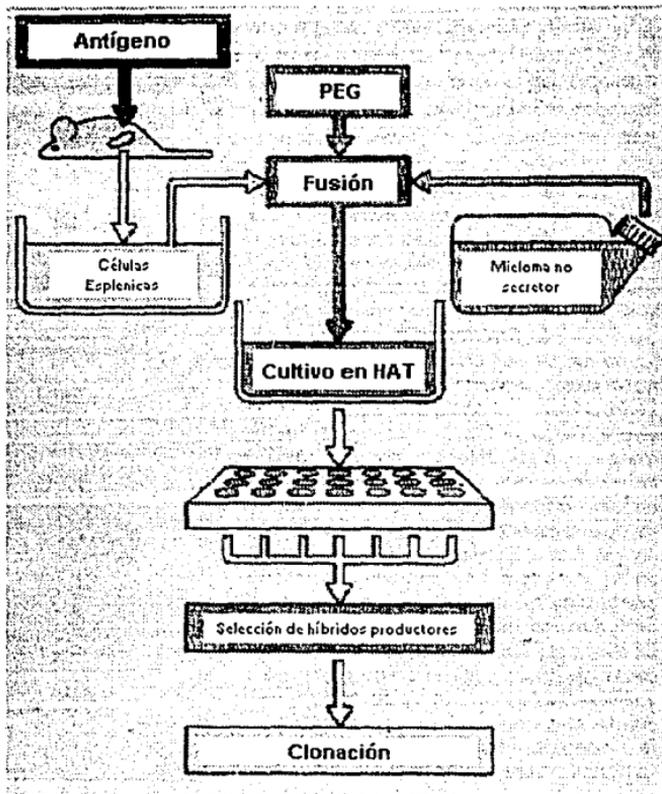
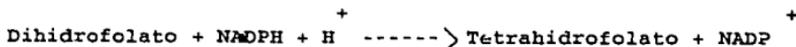


Figura 8. Diagrama general de la Producción de Anticuerpos Monoclonales.
(Roitt y col, 1991)

Por esta razón estos híbridos no son estables genéticamente, y presentan la tendencia a ir perdiendo cromosomas, aunque la pérdida no es completa (Ringertz-Savage, 1976; Ruddle, 1981), y muestra preferencia a perder los cromosomas de una u otra célula progenitora (Goding, 1983). La primera fusión con el uso del PEG fue descrita por Galfré (Galfré y col, 1977), posteriormente se han descrito algunas modificaciones para esta técnica, pero en esencia sigue siendo la misma. Las variables más importantes son las siguientes: a) la concentración del PEG; Galfré describió el uso del PEG al 50%, siendo este muy tóxico para las células, aunque las concentraciones por debajo del 30%, forma pocos híbridos. b) Sharon y col en 1980 demostraron la importancia del pH en la alta frecuencia de fusión, obteniéndose el mayor número de hibridomas en un rango de pH de 8.0 a 8.2. c) el tiempo de exposición al PEG, la frecuencia de fusión disminuye conforme aumenta el tiempo de exposición del PEG, las concentraciones de PEG que oscilen entre el 30 y el 35%, son toleradas por las células hasta por siete minutos (Goding, 1983). Algunos factores de menor importancia para la efectividad de la fusión pueden ser la temperatura (entre 20 y 37°C), el número de células totales, el peso molecular del PEG, así como la presencia o ausencia de suero y/o eritrocitos durante la fusión (Zola y col, 1982).

Después de la fusión, la selección de los hibridomas se realiza por el empleo de un medio denominado HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina), el efecto de este medio está basado en la acción que ejerce la aminopterina al bloquear la síntesis de desoxitimidilato (dTMP) y de nucleótidos purínicos por disminución de los derivados del ácido fólico (Figura 9a).

Como es sabido el DNA se compone de timina (5-metiluracilo), a diferencia del RNA que contiene uracilo. La conversión del uracilo a timina, tiene lugar en el desoxirribonucleósido monofosfato, en este caso el desoxitimidilato (dUMP), que se metila a dTMP, bajo la acción de la enzima timidilato sintetasa que cataliza esta reacción de metilación, utilizando a un ácido fólico como coenzima, concretamente al N,N-metilentetrahidrofolato, que es el donador de los metilos y los electrones. Esta reacción trae como consecuencia la oxidación del N,N-metilentetrahidrofolato a dihidrofolato. Bajo el condicionamiento de que la transferencia de los metilos se lleva a nivel del N,N-metilentetrahidrofolato, luego entonces, se debe contemplar la regeneración del tetrahidrofolato mediante la acción de la dihidrofolato-reductasa descrita en la siguiente reacción:



Es aquí donde actúa la aminopterina, ya que con base en la semejanza que guarda con el dihidrofolato actúa como inhibidor competitivo de éste (Figura 9b), bloqueando así, la regeneración del tetrahidrofolato, y por consecuencia la inhibición en la síntesis del desoxitimidilato (Leningher y col, 1976; Stryer, 1981).

Es importante hacer notar que este mecanismo afecta tanto al mieloma, como a las células del bazo. Es aquí cuando hay que hacer destacar la manipulación génica a la que son expuestas las células del mieloma empleadas en esta técnica, que con base en un tratamiento previo no cuenta con las enzimas hipoxantina-guanina-

fosforribosil transferasa (HGPRT) y timidina cinasa (TK), que son de gran importancia en la vía alterna de la síntesis de DNA (recuperación de purinas). Es así que al bloquear ambas rutas metabólicas en las células del mieloma, finalmente mueren para desaparecer del cultivo. En tanto las células B (células esplénicas), que poseen una vida media corta aproximadamente 6 o 7 días, también terminan sucumbiendo al paso del tiempo. De esta forma las únicas células que sobreviven a este tratamiento son aquellas que se han logrado fusionar y que han heredado las dos características fundamentales; por un lado la presencia de ambas enzimas (la HGPRT y la TK), proporcionada por las células esplénicas; y por otro la capacidad de inmortalidad heredada por las células del mieloma (Goding,1979; Milstein,1980). Es este el mecanismo de acción del medio HAT, que además de inhibir el crecimiento del mieloma, provee de las materias primas para el seguimiento de la ruta alterna en la síntesis de DNA, que comienza con la obtención del AMP y el GMP a partir del IMP, que es el producto de la catálisis efectuada sobre la hipoxantina. El AMP se obtiene por la inserción de un grupo amino, en el oxígeno carbonílico del C-6 del IMP. La formación de GMP, es llevada a cabo por la oxidación primero del IMP, y la posterior inserción del grupo amino en el C-2. Estos ribonucleótidos se reducen para finalmente obtener a los correspondientes desoxirribonucleótidos. La obtención del dTMP, es llevada a cabo por la acción catalítica de la TK en la reacción de fosforilación del desoxirribonucleósido timidina. Finalmente el CTP deriva de la aminación del UTP en el C-4, con la consiguiente sustitución del oxígeno carbonílico (Leningher,1978; Stryer,1981). Alternativamente la selección de híbridos puede realizarse por medio del uso de otras drogas como la azaserina y el metotrexato. La azaserina que es un análogo de la glutamina (aminoácido que provee los nitrógenos N-3 y N-9 del anillo púrico), bloquea por inhibición competitiva a la enzima amidofosforribosil transferasa interrumpiendo de este modo el "paso concomitante" en la síntesis de novo y afecta la aminación del UTP en la formación del CTP. La ametopterina también denominada metotrexato, es un derivado metilado de la aminopterina, y ha sido descrita como una droga empleada en la selección de hibridomas (Milstein,1980; Stryer,1981; Harlow-Lane,1988; Goding,1983).

El siguiente paso es el tamizado de los hibridomas, para detectar sólo a aquellos que presenten positividad a la producción del anticuerpo deseado. Esto se realiza por un ensayo que ponga en evidencia la presencia de los anticuerpos específicos en los sobrenadantes de cultivo de los híbridos resultantes de la fusión. Los pozos con resultados positivos son clonados, es decir, se siembran en placas de cultivo de forma que sólo haya una célula por pozo (Hoributa,1970; Milstein,1984). Este finalmente es el concepto de anticuerpo monoclonal, donde una célula, da origen a una clona, que secreta anticuerpos homogéneos, contra un sólo determinante antigénico (Milstein,1984).

Para caracterizar anticuerpos monoclonales se requieren diferentes técnicas. Un grupo de propiedades importantes de los anticuerpos es determinada por la estructura final del anticuerpo (fracción Fc), que son secuencias codificadas para las regiones comunes del anticuerpo. Estas propiedades incluyen a la clase y la subclase de las cadenas pesadas y ligeras.

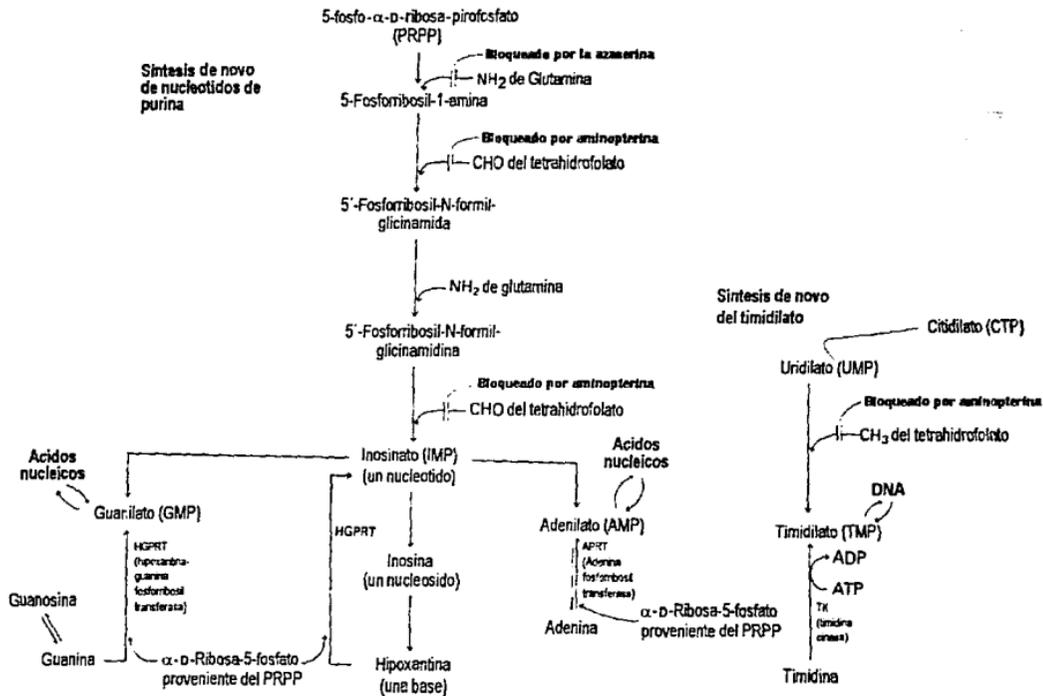
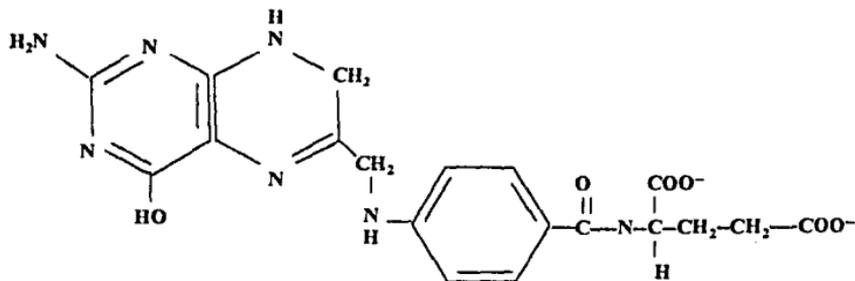
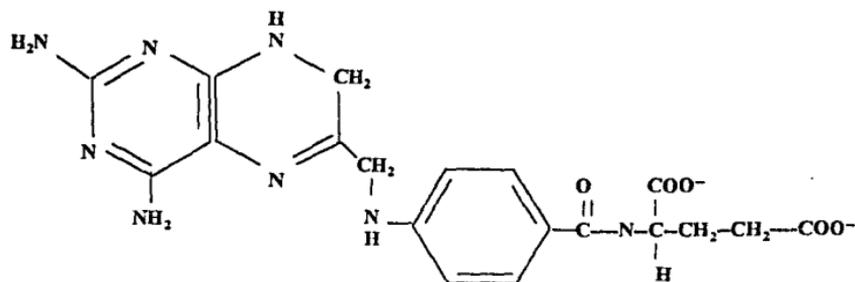


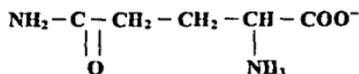
Figura 9a. Vías clásica y alterna de la síntesis de precursores del DNA. Se observan los "sitios" inhibidos por la acción de la aminoptetina (antifólico), y por la azaserina (análogo de la glutamina).



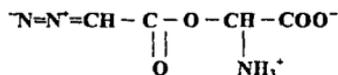
Dihydrofolato



Aminopterina



Glutamina



Azaserina

Figura 9b. Análogos estructurales. Se muestra la analogía estructural de las drogas empleadas en la producción de anticuerpos monoclonales con los metabolitos utilizados en la síntesis de DNA.

La diferenciación de la clase y la subclase puede ser establecida por la afinidad a un segundo reactivo, como es el caso de la proteína A. El tipo de cadena ligera o pesada, puede ser distinguido por un ensayo inmunoquímico que revele la presencia de las cadenas polipeptídicas ligeras y pesadas. Esto se realiza con el uso de un segundo anticuerpo anti-cadenas polipeptídicas de ratón, esto es posible ya que dichas cadenas son lo suficientemente diferentes de especie para ser diferenciadas por un anticuerpo (Harlow-Lane,1988). El marcaje de los anticuerpos anti-isotipos a una enzima, provee de una herramienta valiosa que puede emplearse en un ELISA (Hawkes y col,1982), o por inmunofluorescencia indirecta con el empleo de anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína. Los métodos descritos van desde la técnica de Ouchterlony o ensayo de inmunodifusión doble; la captura de anticuerpos por antígeno específico acoplado a placas de ELISA, y reveladas con anti clases específico; y la captura de anticuerpo por inmunoglobulinas anti-ratón clase específica acopladas a placas de ELISA (Harlow-Lane,1988).

El empleo de la inmunoelectrotransferencia (IET), ha sido descrito para la caracterización de las proteínas reconocidas por un anticuerpo monoclonal en un determinado extracto o purificado antigénico. Esta técnica combina la resolución de una electroforesis en gel con la especificidad de la detección inmunoenzimática, es decir, la separación de las proteínas por el método electroforético (SDS-PAGE), y la consiguiente transferencia a una membrana de nitrocelulosa es la base de dicho proceso (Towbin y col,1979). La mayor ventaja en el empleo de anticuerpos monoclonales en IET, es la especificidad de estas interacciones. Con base en que un anticuerpo monoclonal se une a un solo epítipo, esto provee una herramienta muy útil

para la identificación de una región en particular de un antígeno. Una de las principales dificultades en el empleo de los anticuerpos monoclonales en esta técnica, es la posibilidad de la destrucción del epítipo reconocido por el anticuerpo, por acción de los reactivos empleados en la preparación de la muestra. Un segundo problema con el uso de anticuerpos monoclonales en la inmunoelectrotransferencia es la posibilidad de detectar reacciones cruzadas con otros polipéptidos, ya que un epítipo es una estructura proteica relativamente pequeña, que puede estar compuesta por sólo cuatro o cinco aminoácidos, dando una gran oportunidad de que dicha estructura se localice en otro polipéptido. Ocasionalmente los anticuerpos monoclonales pueden reconocer estructuras repetidas entre antígenos, en este caso dichos anticuerpos pueden ser empleados para detectar antígenos relacionados. Dependiendo del juego de anticuerpos monoclonales que se tenga, las reacciones cruzadas pueden llegar a presentarse. Por esto es importante tener en cuenta que una banda no esperada en la inmunoelectrotransferencia deberá ser tratada como una reacción cruzada, siempre y cuando no se cuente con evidencia que sugiera una relación fisiológica (Harlow-Lane,1988).

Otras técnicas descritas son la inmunofluorescencia (Manawadu-Voller,1978), y la inmunohistoquímica electrónica mediante marcaje con oro coloidal (Sanchez y col,1994).

Los anticuerpos puros se requieren para un número considerable de técnicas, la correcta elección del método de purificación depende de diferentes variables que incluyen la clase y subclase del anticuerpo, la muestra inicial que contiene al

anticuerpo, la especie en que fue producido, y el uso final que se le quiere dar al anticuerpo. Alternativamente son requeridos la combinación de dos o más métodos de purificación. Los anticuerpos del suero o de líquido de ascitis pueden ser purificados a partir de columnas de afinidad o por protocolos de precipitación. Métodos similares pueden emplearse en el caso de sobrenadantes de cultivo celular, desafortunadamente el grado de pureza puede ser bajo, ya que la concentración de los anticuerpos presentes en este tipo de muestra es mínima. Las técnicas por columnas de proteína A y las columnas de afinidad por anticuerpos anti-inmunoglobulinas son recomendadas para la purificación de anticuerpos monoclonales a partir de sobrenadantes de cultivos. Durante el proceso de purificación de los anticuerpos, deben ser monitoreadas diferentes variables tales como: la pureza que puede ser evaluada por el corrimiento de una porción de la muestra en geles poliacrilamida (SDS-PAGE); la cantidad que puede evaluarse por comparación con un standard en SDS-PAGE cuando no está totalmente puro, o por la absorbancia desarrollada a 280 nm cuando no hay contaminantes presentes (1 OD = 0.75 mg/ml de anticuerpo puro); y la actividad del anticuerpo medida por la unión a su antígeno, realizando titulaciones del purificado y evaluadas con respecto a la materia de la cual se parte inicialmente (Harlow-Lane, 1988). Las aplicaciones de los anticuerpos monoclonales, como ya se ha mencionado son muy variadas, en la tabla 1 se describen algunas de ellas.

TABLA 1
Algunas aplicaciones de los Anticuerpos Monoclonales

Diagnóstico

- Identificación de leucocitos
- Determinación de subgrupos de linfocitos
- Determinación de antígenos HLA
 - Especificidades individuales de los loci A, B, C, DR
 - Especificidades de estructura
- Detección viral y subclasificación
- Identificación de parásitos
- Detección de otros microorganismos
- Detección de hormonas polipeptídicas
- Similitud entre hormonas
- Determinación de proteína carcinoembrionaria
- Detección de miosina cardiaca por lesión del miocardio
- Tipificación de leucemias y linfomas
- Detección de antígenos relacionados con tumor
- Aplicaciones inmunohistoquímicas en secciones de tejido

Terapéuticos

- Terapéutica antitumoral
 - Antígeno específico de tumor individual
 - Antiidiotipo contra inmunoglobulina de superficie en linfoma de células B

Inmunosupresión

- Transplante de órganos
- Enfermedades autoinmunitarias e hipersensibilidad
- Tratamiento de enfermedad GVH

Control de la fertilidad

- Anticuerpo anti-hcg o antitrofoblasto
- Reversión de toxicidad por medicamentos

Investigación múltiple

(Stites y Terr, 1988)

3.0.- JUSTIFICACION

La respuesta inmunológica humoral en la cisticercosis humana ha sido ampliamente estudiada, y aunque ha permitido la implementación de algunos métodos inmunodiagnósticos, hasta ahora no ha sido posible establecer el método "ideal". La gran variedad de técnicas descritas para el diagnóstico fácil y rápido de esta patología no han logrado conjuntar las principales propiedades de una prueba ideal, las cuales son por un lado la alta especificidad y sensibilidad del ensayo, y la rapidez y bajo costo. Además de que dichas pruebas carecen de la capacidad de identificar una parasitosis activa (presencia del agente).

Con el objetivo de mejorar el sistema de captura de antígenos que emplea anticuerpos policlonales, se planteó como alternativa el empleo de anticuerpos monoclonales, para promover un bajo costo de operación, un aumento en la especificidad del inmunodiagnóstico y que además pudiese diferenciar entre una respuesta de memoria y una parasitosis activa. Es por esto que se inició el proyecto de producción de anticuerpos monoclonales anti-exoantígenos del cisticerco de Taenia solium, ya que estas moléculas son las que se pueden localizar circulantes en los fluidos corporales.

4.0.- OBJETIVOS

- * Identificar clonas positivas a la producción de anticuerpos anti-exoantígenos (antígenos de excreción secreción), del metacéstodo de T. solium.
- * Caracterizar inmunoquímicamente dichos anticuerpos.
- * Elaborar un modelo de captura de exoantígenos (con una sensibilidad mínima de 1 µg/ml).
- * Validar el modelo de captura mediante el análisis de muestras empleando como estándar de oro la resonancia magnética.

5.0.- HIPOTESIS

Si se produce un anticuerpo monoclonal específico contra un exoantígeno del cisticerco de Taenia solium, entonces la estandarización de un sistema de captura de antígenos traerá como consecuencia un aumento en la especificidad de la prueba de detección de antígenos, y por consiguiente dicho sistema apoyará el inmunodiagnóstico en esta parasitosis.

6.0.- MATERIALES Y METODOS

6.1.- PREPARACION DE ANTIGENOS

Preparación de extracto crudo E+P (escólex-pared)

El extracto crudo se preparó de acuerdo a la técnica descrita por Espinoza y col. en 1986, con algunas modificaciones. La recolección de cisticercos se realizó a partir de la disección de carne de cerdo fresca infestada, la extracción se hizo lo más limpia posible, evitando el arrastrar residuos de tejido del hospedero. Los cisticercos se punsionaron para eliminar el líquido vesicular. Ya punsionados se colocaron en un recipiente que contenía en solución salina 0.15M, amortiguada con fosfatos 0.01M, pH 7.2 (PBS). Se realizaron varios lavados, se eliminó el exceso de líquido, se pesaron y congelaron a -70°C . Los cisticercos se descongelaron y se les maceró y añadió 0.5ml de agua destilada por cada gramo de cisticercos, con inhibidores de proteasas en las siguientes proporciones: fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) al 0.006%, parahidroximercuribenzoato (PHMB) al 0.04%, L-1-tosilamida 2-feniletíl clorometil cetona (TPCK) 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, N- α -p-tosil-lisina clorometil cetona (TLCK) 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, la maceración se favoreció por ciclos de congelación y descongelación. Posteriormente se centrifugó a 2000g durante 1 hora a 4°C , el precipitado se resuspendió en solución salina 0.15M, amortiguada con fosfatos 0.01M, pH 7.2 (PBS); se sonicó dos veces a 7 Hz durante un minuto y se centrifugó, al primer sobrenadante se le añadió 1 ml de solución de fosfatos 0.1M (PB10x) y se mezcló con el obtenido en la segunda centrifugación. El extracto se fraccionó y se congeló a -70°C . La concentración de proteínas se determinó por el microensayo de Bradford empleando para esto un equipo comercial, y se verificó su calidad por medio de geles de poliacrilamida (Laemmli, 1970).

Exoantígenos (antígenos de excreción-secreción)

La recolección de los cisticercos se realizó por la necropsia de carne de cerdo infestada, los cisticercos fueron colectados (cuidando que la integridad de la vesícula no fuera afectada), y depositados en solución amortiguada de fosfatos estéril, se realizaron varios lavados en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar, para posteriormente lavarse varias veces con PBS estéril suplementado con antibióticos concentrados cinco veces (500 U/ml de penicilina G sódica y 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina). Los cisticercos ya lavados fueron puestos en cultivo en medio RPMI sin complementar, y el medio se cosecha cada día durante tres días. Las fracciones recolectadas fueron tratadas con inhibidores de proteasas para llegar a las concentraciones anteriores, y posteriormente fueron congeladas. Se formó una mezcla de las tres cosechas, la cual fue concentrada (por sacarosa en membranas de diálisis, con poro de 12,000 kDa), después se procedió a determinar la concentración de proteínas empleando el microensayo de Bradford. El antígeno se fraccionó y se almacenó a -20°C .

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL METODO DE BRADFORD

La técnica empleada para la determinación de proteínas fue el microensayo diseñado por BIO-RAD (Modificado de Bradford, 1976). Los sistemas fueron preparados como a continuación se describe

tubo	Agua destilada (μ l)	μ l de albumina (1mg/ml)	Reactivo de Bradford (μ l)
1	800	0	200
2	795	5	200
3	790	10	200
4	785	15	200
5	780	20	200
muestra	800-vol de muestra	vol de muestra	200
blanco	1000	0	0

El reactivo de Bradford fue adicionado al final, y todos los tubos fueron mezclados en vórtex y se dejaron reposar durante 20 minutos antes de ser leídos en un espectrofotómetro Beckman DU-62 a 595 nm

La absorbancia dada por las muestras fue interpolada a una gráfica que se construyó con los datos de los tubos 1, 2, 3, 4 y 5, se calibró al aparato con la solución del tubo blanco. La curva alineó en el eje de las abscisas la cantidad en mg/ml de proteína (albúmina en la determinación de proteínas en los extractos e IgG para la determinación en los purificados). Y la absorbancia dada por cada una de las soluciones en el eje de las ordenadas. Se realizó la regresión lineal de dichos puntos, y se interpoló en la curva el valor de absorbancia dado por las muestras en cuestión, obteniéndose así la concentración de proteína.

ELECTROFORESIS (SDS-PAGE)

La integridad de los antígenos empleados en la inmunización de los ratones utilizados para la obtención de anticuerpos monoclonales, fue verificada por electroforesis en geles de poli-acrilamida, el procedimiento se describe a continuación.

1.-La cámara y el cartucho para geles fueron lavados con agua tridestilada al igual que los vidrios y todos los implementos

2.-En el cartucho de geles fueron colocadas las placas de alúmina y los vidrios con sus respectivos separadores (1 mm), ya colocados el cartucho de geles fue cerrado y se procedió a añadir la siguiente mezcla (para formar el gel separador), hasta aproximadamente 3 cm del borde superior del vidrio, formándose un gel al 10%:

Reactivo	Volumen
* Bis-Acrilamida	5.0 ml
Agua destilada	7.22 ml
Tris-Base 2M pH 8.8	1.875 ml
SDS 10%	150 µl
Persulfato de Amonio	750 µl
TEMED	7.5 µl

* La solución de Bis-Acrilamida se preparó con Bisacrilamida al 0.8%, y acrilamida al 30%.

(el TEMED y el persulfato de amonio fueron agregados al final de la mezcla y posteriormente agitados)

3.-Después de algunos segundos se añadió agua hasta el límite del borde superior, esto para evitar una formación irregular en la parte superior del gel separador, y se esperó a que la mezcla polimerizara.

4.-El exceso de agua fue desechado del cartucho de geles.

5.-Los geles empleados fueron colocados en la cámara de electroforesis con un peine apropiado para el número de muestras a correr.

Por los extremos fue añadida la mezcla del gel concentrador de la muestra.

Reactivo	Volumen
Bis-Acrilamida	540 µl
Agua destilada	2.5 ml
Tris-HCl 2M pH 6.8	1.11 ml
SDS 10%	44 µl
Persulfato de Amonio	222 µl
TEMED	3.2 µl

-Las muestras fueron preparadas colocando 50 µg de proteína que se mezclan volumen a volumen con la solución desnaturizadora (SDS 0.1%, EDTA 10%, Glicerol 10%, Tris-HCl 2M, Azul de bromofenol). En los casos en que la muestra se encontraba muy diluída y no se pudo cumplir la condición de cantidad de proteína en un volumen máximo de 30 µl, se colocó el volumen máximo, y se mezcló con 3 µl de la solución de cocktail preparada 10X. Para condiciones reductoras (con β-mercaptoetanol, que es un agente que rompe enlaces disulfuro), a la solución desnaturizadora se le añadió por cada mililitro, 20 µl de 2-mercaptoetanol.

6.-Se colocó una muestra por carril, colocándose el estándar de pesos moleculares en el primer carril.

7.-Se procedió a llenar la cámara con la solución amortiguadora de corrida (tris-glicina 1X y SDS al 0.08%) hasta el límite, y se conectó a una fuente de poder aplicándole 100 volts a la cámara. La corriente se dejó de aplicar hasta que el frente de corrimiento (el colorante del cocktail, en nuestro caso azul de bromofenol), salió del gel.

-La Tinción de proteínas con azul de Coomasie se realizó por inmersión del gel (previamente corrido), en el colorante (azul Coomasie al 0.06%, metanol absoluto al 0.6% y ácido acético glacial al 0.1%) durante dos horas. El desteñimiento se llevó a cabo por calentamiento en una solución de etanol al 50% y ácido acético al 10%, o a temperatura ambiente durante toda la noche (sensibilidad de 0.1-0.5 µg/banda).

6.2.- INMUNIZACION

La inmunización se realizó con los exoantígenos en ratones hembras de la cepa Balb/c de seis a ocho semanas de edad. El esquema de inmunización se presenta a continuación.

Día	Antígeno (ug/ml)	Administración	Adyuvante
0	80	intraperitoneal	completo
15	40	intraperitoneal	incompleto
21	40	intraperitoneal	incompleto
35	40	intravenosa	ausente

* La fusión se realizó en el día 37

EVALUACION DE LA INMUNIZACION POR ELISA

La efectividad de la inmunización se confirmó por el empleo de la técnica de captura de anticuerpos en ELISA; ésta se realizó con diluciones seriadas del suero de los ratones inmunizados.

a) Los exoantígenos se diluyeron en una solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6 obteniéndose una concentración final de 10µg por ml. Se colocaron 100 µl/pozo de esta solución en placas para ELISA (Costar 3590 de alta adherencia), las placas fueron incubadas 2 hrs a 37°C, o toda la noche a 4°C.

b) Después de la incubación se eliminó el exceso de la solución y se realizaron tres lavados de la placa con PBS con Tween 20 al 0.05% pH 7.2 (PBS-T).

c) Se colocaron 200 µl/pozo de una solución al 5% de leche en PBS-T (L-PBS-T), y se incubó a 37°C durante 30 min.

d) Se preparó una dilución 1:100 del suero a evaluar con PBS-T y se colocaron 100 µl/pozo de esta solución. A partir de ésta se realizaron diluciones seriadas hasta un título de 1:6400, y se incubaron durante 2 hrs a 37°C.

e) Después de transcurrido este tiempo, se removió el exceso y se lavó tres veces más con la solución de lavados.

f) Se adicionaron 100 µl/pozo de una dilución 1:500 de conjugado anti-inmunoglobulinas totales de ratón-peroxidasa (SIGMA). Se procedió a su incubación durante 2 hrs a 37°C. Posterior a ella se lavó y se reveló como a continuación se describe.

g) Se añadieron 100 µl/pozo de solución de sustrato-cromógeno (10 ml solución amortiguadora de citratos 0.1M; 4 mg de o-fenilendiamina (SIGMA); y 4 µl de peróxido de hidrógeno al 30% (Merck). Se observó el desarrollo de coloración, y se detuvo la reacción con una solución de H₂SO₄ 2N.

La lectura de la placa fue realizada en un lector de ELISA (BIO-RAD 3550), a 490 nm.

Los animales con títulos 1:5000 fueron seleccionados como fuente de células productoras de anticuerpos. -

DESCONGELACION DE CELULAS DEL MIELOMA

Las células del mieloma X63Ag8.653 (Ag8), fueron mantenidas en congelación a -196°C en nitrógeno líquido. La descongelación de los criotubos que las contenían se realizó en baño María a 37°C en campana de flujo laminar. Posteriormente fueron transferidas a medio RPMI 1640 (GIBCO) en tubos cónicos para cultivo celular; se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 min para eliminar los residuos del dimetilsulfóxido (DMSO), el sobrenadante fue desechado y el botón celular fue resuspendido en medio RPMI complementado con suero fetal bovino (SFB) al 20%. Se sembró en placas de 96 pozos para cultivo celular, y se vigiló su crecimiento y expansión sucesiva a placas de cultivo de 24 pozos, botellas de 25 cm², y finalmente a botellas de 75 cm².

OBTENCION DE MACROFAGOS PERITONEALES DE RATON

El papel que juegan los macrófagos durante la selección de híbridos, en la producción de anticuerpos monoclonales, se basa en que dichas células proveen al medio de factores de crecimiento que promueven el desarrollo de los híbridos, además de eliminar del medio de cultivo los detritus celulares que se originan durante esta misma etapa. Los macrófagos que se emplearon en la fusión fueron obtenidos tres días antes de su uso.

El ratón fue sacrificado por dislocación del cuello y sumergido en benzal. El animal fue sujetado a una plancha de disección, y se procedió a rasgar la piel que cubría la pared abdominal anterior, quedando así expuesta. Le fueron inoculados 5 ml de medio RPMI frío en la cavidad peritoneal. El aspirado de este fluido se realizó por medio de una jeringa. El aspirado fue transferido a un tubo cónico para cultivo celular que contenía 5 ml de medio sin complementar, se centrifugó y eliminó el sobrenadante, para posteriormente resuspender el "botón" celular en medio RPMI complementado. La suspensión celular se sembró en placas de 96 pozos para cultivo celular, colocando 100 µl de la suspensión por pozo, dichas placas fueron puestas en cultivo en incubadora con presión parcial de oxígeno 95% y CO₂ al 5%.

OBTENCION DE CELULAS ESPLENICAS

La obtención de células B sensibilizadas con nuestro antígeno, se llevó a cabo el mismo día de la fusión y fue realizada mediante la extirpación del bazo de los ratones inmunizados que desarrollaron títulos altos de anticuerpos anti-exoantígenos. La metodología se describe a continuación.

Los ratones elegidos mediante el criterio provisto por el ELISA, fueron sacrificados por dislocación del cuello. El resto del procedimiento se efectuó en condiciones estériles en campana de flujo laminar. Se realizó una incisión en el costado izquierdo del animal, hasta la exposición del bazo; este órgano le fue extraído para posteriormente colocarlo en una caja Petri estéril, que contenía aproximadamente 5

ml de RPMI y un trozo de tela de organza, la cual se usa como tamiz. El bazo se envolvió en la tela y se maceró muy suavemente. La suspensión celular fue recolectada y centrifugada a 1200 rpm con 15 ml más de medio RPMI. El sobrenadante fue eliminado y el "botón" celular se resuspendió en 3 ml de cloruro de amonio 0.17M durante 5 min a 4°C para lisar a los eritrocitos contaminantes. Después de transcurrido el tiempo, el volumen fue ajustado a 12 ml con medio RPMI y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. El "botón" obtenido en la última centrifugación fue resuspendido en 5 ml de medio RPMI.

6.3.- FUSION CELULAR

Se realizó la cuantificación de ambas estirpes celulares (la línea del mieloma empleada es la conocida como X63Ag8.653, que no secreta ningún anticuerpo o fracción de anticuerpo y en cultivo posee la característica de formar monocapa), se mezclaron en una proporción de 2:1 (dos células de bazo, por una célula del mieloma), se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Al botón celular se le añadió polietilenglicol 4000 (GIBCO) a razón de 0.1 ml por cada 10 millones de células con un tiempo de exposición de 45 seg. Se adicionaron 5 volúmenes más de medio, y finalmente se ajustó el volumen para obtener una concentración de 500 000 células/ml, distribuyéndose esta suspensión en 5 placas de 96 pozos colocando 100 µl por pozo. La selección de los híbridos se realizó por cultivo en medio HAT, el itinerario se describe a continuación:

Día	Medio
1	RPMI complementado y al 20% con SFB
3	RPMI complementado y al 20% con SFB + HAT 100X
5	RPMI complementado y al 20% con SFB + HAT 100X
8	RPMI complementado y al 20% con SFB + HAT 100X
10	RPMI complementado y al 20% con SFB + HT 100X
12	RPMI complementado y al 20% con SFB + HT 100X
14	RPMI complementado y al 20% con SFB + HT 100X
16	RPMI complementado y al 20% con SFB

La revisión de la células durante este período se realizó diariamente, eligiéndose los pozos positivos al crecimiento en medio HAT (se describen en la sección de resultados), de dichos pozos fueron seleccionados los híbridos que dieron resultados positivos a la prueba de captura de anticuerpos por la técnica de ELISA, efectuada cuando dichos pozos presentaron una confluencia aproximada del 75%.

6.4.- DETERMINACION DE HIBRIDOS PRODUCTORES DE ANTI-EXOANTIGENOS

(Tamizado)

La determinación de hibridomas positivos a la producción de anticuerpos anti-antígenos de excreción secreción, fue llevada a cabo por la evaluación de los sobrenadantes de cultivos de los híbridos, dicha evaluación se realizó por ELISA como se describe a continuación.

a) El antígeno se diluyó a una concentración final de 50 µg/ml en solución amortiguadora de carbonatos 0.1M pH 9.6, sensibilizándose pozos de placas para ELISA (Costar 3590 alta adherencia), con 100 µl de la solución antes mencionada e incubándose a 4°C durante toda la noche.

b) El exceso de la solución fue desechado y se removieron los restos con PBS-T.

c) Se incubaron las placas con 200 µl/pozo de L-PBS-T durante 30 min a 37°C. y se lavaron tres veces con PBS-T.

d) Se colocaron los sobrenadantes de los cultivos en cuestión, añadiéndose 100 µl de sobrenadante por pozo para posteriormente incubarse durante dos horas a 37°C.

e) Las placas se lavaron, y se les colocó 100 µl por pozo de una dilución 1:500 de anti-Inmunoglobulinas totales de ratón-peroxidasa (SIGMA). Se incubó durante 2 horas, se lavaron y se les añadió 100 µl por pozo de la solución sustrato-cromógeno dando oportunidad al desarrollo de la coloración correspondiente y deteniendo la reacción con 100 µl por pozo de una solución de H₂SO₄ 2N. La lectura se realizó a 490 nm en un lector de placas de ELISA (BIO-RAD 3550). Los pozos positivos a la producción de anticuerpo fueron expandidos y congelados para su posterior clonación.

DESCONGELACION DE LINEAS DE HIBRIDOMAS

Para la elaboración de este proyecto de tesis se eligieron dos líneas de hibridomas (1C6 y 3D2) y se procedió a su caracterización. Los criotubos fueron identificados y extraídos del tanque de nitrógeno, para posteriormente ser descongelados rápidamente en baño María a 37°C. La suspensión celular de los criotubos fue transferida a tubos cónicos para cultivo celular, previamente preparados con 8 ml de medio RPMI, se centrifugó y se eliminó el medio de conservación para evitar su toxicidad. Las células fueron resuspendidas en medio RPMI complementado con 20% de SFB, y sembradas en placas de cultivo de 24 pozos. Posteriormente fueron supervisadas al microscopio invertido para ver su integridad. Las células fueron expandidas y el sobrenadante cosechado a lo largo de un mes, durante este tiempo los últimos sobrenadantes fueron sometidos a prueba de producción de anticuerpos anti-exoantígenos dando resultados positivos (las gráficas se muestran en la sección de resultados). Los pozos positivos fueron establecidos para su posterior clonación.

6.5.- CLONACION

La clonación de las células se realizó como se describe a continuación. Se llevó a cabo una suspensión de las células de los pozos elegidos para clonarse. Posteriormente se tomaron 100 µl de esta suspensión celular y se colocaron en un pozo de placa de 96 pozos, que contenía 100 µl de medio RPMI con 20% de SFB. Se homogenizó la suspensión de dicho pozo, y se realizaron diluciones dobles seriadas. Con el uso del microscopio se realizó la elección de un pozo, que con el efecto de la dilución presentó un número aproximado de 50 células, las cuales fueron transferidas a un tubo estéril que contenía 20 ml de medio RPMI con 20% de SFB. La suspensión se homogeneizó y se sembró en placas de cultivo de 96 pozos, colocándose 200 µl/pozo. La metodología antes descrita se realizó para ambas líneas celulares (1C6 y 3D2). La revisión del cultivo se llevó a cabo diariamente durante el tiempo que requirieron las clonas para crecer (aproximadamente dos semanas).

Cuando las clonas celulares se desarrollaron lo suficiente (50% de confluencia), se realizó la prueba de captura de anticuerpos en sobrenadantes

6.6.- SUBCLONACION

La subclonación se hizo a partir de los pozos positivos al tamizado realizado en la clonación. La técnica es similar a la descrita para la clonación, con la salvedad de que el pozo elegido en las diluciones seriadas solo presentó 15 células aproximadamente. Al igual que en la clonación las células fueron sembradas con 200 µl por pozo en 3 placas de cultivo de 96 pozos.

6.7.- DETERMINACION DE CLASES DE ANTICUERPOS

El ensayo de determinación de clases de inmunoglobulinas se les practicó exclusivamente a los pozos que reunieron los criterios de monoclonalidad evaluados en el proceso de subclonación.

La clase de inmunoglobulina se determinó por medio del ELISA, con la ayuda de varios conjugados anti-clases de ratón-peroxidasa (SIGMA), el procedimiento se siguió de acuerdo al siguiente protocolo:

Una solución de antígeno de excreción-secreción a 50 µg/ml fue colocada en placas para ELISA (Costar 3590) a razón de 100 µl/pozo, y se incubó toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavó con PBS-T.

Fue incubada 30 min con L-PBS-T y después lavada, para posteriormente incubarla 2 horas a 37°C con los sobrenadantes frescos obtenidos de los cultivos provenientes de la subclonación (100 µl/pozo).

Se lavó e incubó con el conjugado correspondiente (anti-IgG y anti-IgM de ratón-peroxidasa (SIGMA), diluidos 1:500 añadiéndoseles 100 µl/pozo. Se lavó con solución de lavado y se les colocó la solución de sustrato-cromógeno a 100 µl por pozo, y se dejó desarrollar el color, deteniéndose la reacción con H₂SO₄ 2N

6.8.- DETERMINACION DE SUBCLASES DE ANTICUERPOS

La determinación de subclases de los anticuerpos monoclonales descritos en este protocolo se realizó por medio de dos tipos de anticuerpos: los primeros fueron anticuerpos de conejo anti-subclases de ratón (SIGMA), y el segundo un anticuerpo anti-IgG de conejo peroxidado (SIGMA).

Se sensibilizaron pozos de placas para ELISA (costar 3590) con 100 µl de antígeno de excreción secreción de cisticerco, y se incubaron 18 hrs a 4°C. se lavaron y posteriormente se incubaron con solución bloqueadora 30 min.

Los sobrenadantes de cultivo frescos se incubaron y el exceso se eliminó y los pozos se lavaron, para posteriormente incubarlos con los anticuerpos anti-subclases de ratón en una dilución 1:500 durante dos horas.

Después de la incubación se volvieron a lavar y se les colocó el anticuerpo anti-IgG de conejo peroxidado diluido 1:500, incubándoseles dos horas.

Los pozos se lavaron nuevamente y se les añadió la solución sustrato-cromógeno, el color se desarrolló y se detuvo el proceso con la solución 2N de H₂SO₄.

6.9.- DETERMINACION DE REACCIONES CRUZADAS

Las determinación de reacciones cruzadas de los anticuerpos (monoclonales y policlonales), se hicieron con los siguientes antígenos:

- * Extracto total de Taenia solium
- * Extracto crudo de Trichinella spiralis

* Diferentes proteínas (albúmina sérica humana, albúmina sérica bovina, ovoalbúmina, fibrinógeno, lisozima, β-lactoglobulina y pepsina)

Los diferentes antígenos se diluyeron a una concentración final de 50 µg/ml, sensibilizándose pozos de placas para ELISA (Costar 3590, alta adherencia), con 100 µl de las soluciones antes mencionadas, e incubándose a 4°C durante toda la noche.

El exceso de la solución fue desechado y se removieron los restos con solución de lavado tres veces.

Se incubaron las placas con 200 µl/pozo de solución bloqueadora durante 30 min a 37°C. y se lavaron tres veces con la solución de lavado.

Se colocaron las muestras de anticuerpos a evaluar (sobrenadantes de cultivo, AcMo purificado, Suero de conejo anti-E+P), añadiéndose 100 µl de sobrenadante por pozo para posteriormente incubarse durante dos horas.

Las placas se lavaron, y se les colocó 100 µl por pozo de una dilución 1:500 del conjugado correspondiente (anti-ratón o anti-conejo peroxidado), y se incubó 2 horas, se lavaron y se les añadió 100 µl por pozo de la solución sustrato-cromógeno dando oportunidad al desarrollo de la coloración correspondiente y deteniendo la reacción con 100 µl por pozo de una solución de H₂SO₄ 2N.

6.10.- INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

La IET se realizó para la determinación de los polipéptidos reconocidos en el extracto proteico de los antígenos de excreción secreción, y se llevó a cabo de la siguiente forma. Se hizo una SDS-PAGE como la mencionada en la página 34.

TRANSFERENCIA

La transferencia se realizó en cámaras BIO RAD, y se preparó de la siguiente forma: se colocó la placa negativa y sobre ésta una rejilla de plástico y dos fibras scotch, todo esto sumergido en solución amortiguadora de transferencia (tris 0.025M, glicina 0.192M a pH 8.3, metanol 20% v/v).

a) Sobre las fibras se colocaron dos cubiertas de papel filtro y el gel previamente sometido a electroforesis.

b) Sobre el gel se colocó un trozo de membrana de nitrocelulosa cubriendo toda la superficie del gel, se colocaron dos papeles filtro, dos fibras y finalmente la placa positiva

c) Todo lo anterior fue colocado dentro de la cámara de transferencia y corrido a 100 volts durante una hora.

d) La membrana de nitrocelulosa fue extraída y cortada a las dimensiones adecuadas, posteriormente fue incubada durante toda la noche a 4°C en solución bloqueadora (leche descremada en polvo al 5% en PBS-Tween al 0.05%).

e) Se lavó tres veces en solución de lavados y dos con PBS

f) Después del bloqueo se incubó con los sobrenadantes de cultivo (o purificados), durante dos horas a temperatura ambiente con agitación.

g) Se lavó tres veces con PBS-T y dos con PBS

h) Se colocó el conjugado correspondiente en una dilución 1:500 durante dos horas a temperatura ambiente.

i) Las membranas se lavaron como anteriormente se describió y se les colocó la solución sustrato-cromógeno (25 mg de 4-cloro1-naftol en 5 ml de etanol absoluto, se le añadió 25 ml de PBS y 25 µl de peróxido de hidrógeno; ó 10 ml de PBS con 5 µg de DAB y 5 µl de peróxido de hidrógeno). La reacción fue detenida por lavado con agua destilada al observarse el desarrollo de las bandas en la membrana.

6.11.- SISTEMA DE CAPTURA DE ANTIGENOS AcMo ADSORBIDO

Los sobrenadantes frescos obtenidos de botellas para cultivo celular de 75 cm² fueron fijados a pozos de ELISA (Immunolon II Dynatech), diluyéndolos vol. a vol. en solución amortiguada de boratos 0.2M pH 8.2. Dichos pozos fueron incubados a 4°C durante toda la noche.

Se lavaron en solución de lavados y se incubaron con L-PBS-T durante 30 min. a 37°C. Posterior a este tiempo los pozos fueron lavados y les fue colocado el antígeno a diferentes concentraciones (0, 5, 10, 15 y 20 µg/ml diluidos en PBS-T)

Después de incubar los pozos durante 2 horas con las diferentes diluciones de antígeno, éstos se lavaron y se les colocó IgG de conejo anti-E+P acoplado a biotina a una concentración de 2 µg/ml, colocando 100 µl por pozo incubándose 2 hrs a 37°C.

Se lavaron los pozos y se les colocó un conjugado de avidina-peroxidasa a una dilución de 1:500 y se incubó dos horas más.

Se colocaron 100 µl por pozo de la solución sustrato-cromógeno y se dejó desarrollar el color, para posteriormente parar la reacción con H₂SO₄ 2N.

6.12.- INDUCCION DE LIQUIDO DE ASCITIS EN RATONES BALB/C

Los ratones Balb/c hembras (de seis semanas de edad), fueron inyectados intraperitonealmente unos con 0.5 ml de pristano, y otros con adyuvante incompleto de Freund. Estas soluciones irritan el peritoneo y proveen de nutrientes la zona inoculada.

A los 7 días de la inyección del agente irritante se inoculó intraperitonealmente una suspensión celular de hibridomas conteniendo aproximadamente 1 000 000 de células en 0.5 ml de PBS.

Se realizó una inspección diaria de los animales involucrados durante un mes.

6.13.- PURIFICACION DE ANTICUERPOS POR AFINIDAD EN COLUMNAS DE

AFFI-GEL PROTEINA A

El empaqueo de la columna de Affi-Gel proteína A (5 ml), se realizó hidratando la columna con 15 ml de PBS y se colocaron 5 ml de ésta suspensión en una columna de plástico previamente preparada:

a) La columna fue equilibrada con 50 ml de solución de unión (10mM de fosfato de sodio, 0.15M de cloruro de sodio pH 8.2)

b) 20 ml de sobrenadantes de cultivo del hibridoma E7 fueron llevados a pH 8.2 por adición de NaOH 1M, y aplicados a la columna a un flujo de 0.6 ml/min

c) La columna fue lavada con 75 ml de solución de unión (con este volumen se asegura que la columna ha quedado libre de residuos que no participan en la unión a la proteína A)

d) Las fracción rica en inmunoglobulinas fue eluida de la columna mediante la adición de 25 ml solución de elución (citrato de sodio 0.1M pH 3.0), recolectándose 1 ml por tubo hasta un volumen de 15 ml. El volumen eluido de la columna fue monitoreado en un espectrofotómetro a 280 nm (luz ultravioleta), en celdas de cuarzo en un espectrofotómetro Beckman DU64

e) La columna se lavó con 15 ml de solución de regeneración (tiocianato de sodio 1.5M)

f) Finalmente la columna fue tratada con 50 ml de solución de unión y guardada a 4°C.

6.14.- PURIFICACION DE ANTICUERPOS POR TECNICA DE MAPS II

5 ml de la columna fueron equilibrados con 25 ml de solución de unión a un flujo de 0.6 ml/min

La muestra diluida en solución de unión fue aplicada a la columna

La columna fue lavada con 25 ml de solución de unión

La columna fue eluida con 25 ml de solución de elución, neutralizándose el eluido al recolectarse 1 ml de éste en 1.6 ml de Tris-HCl 1M pH 9.0. Posteriormente 50 ml de solución de elución fueron aplicados a la columna para la remoción total de IgG

La columna se lavó con 25 ml de solución de regeneración

El volumen eluido de la columna fue leído en un espectrofotómetro a 280 nm (ultravioleta), en celdas de cuarzo

DETERMINACION INMUNOLOGICA DE IgG

El eluido total de cada columna fue dividido en tres fracciones (los cinco primeros ml 1era fracción, los cinco segundos 2da fracción y los cinco terceros tercera fracción), y puestos en diálisis durante toda la noche y a 4°C en membranas para diálisis con tamaño de poro de 12 000 kDa

Los purificados ya dializados fueron congelados a -20°C, tomándoles una alícuota de 400 µl para evaluarse por ELISA la presencia de anticuerpos anti-exoantígenos.

CONCENTRACION DE PROTEINAS

El concentrado de los purificados del anticuerpo monoclonal se efectuó con base en el criterio proporcionado por la determinación inmunológica de las IgG. De tal forma que las fracciones con títulos mayores a 1:3 fueron sometidas al tratamiento

Los 80 ml purificados y previamente dializados fueron colectados en el recipiente (Amicón) de 180 ml, y fue conectado a presión positiva de nitrógeno hasta llevarlo a un volumen final de 8 ml.

El concentrado fue alícuoteado en tubos tipo ependorf de 500 µl y congelado a -20°.

6.15.- SISTEMA HETEROLOGO DE CAPTURA AcPo ADSORBIDO

Los pozos para ELISA (Immunolon II) fueron sensibilizados con suero de conejo anti-E+P en una dilución 1:500 en PBS-Tween al 0.05%, colocándose 100 µl por pozo e incubándose toda la noche a 4°C.

Fueron lavados e incubados a 37°C por 30 min con la solución bloqueadora

Se realizaron los lavados correspondientes y se colocó el antígeno a las concentraciones de 0, 5, 10, 15 y 20 µg por ml y posteriormente se incubaron dos horas

Después de los lavados se colocó el anticuerpo monoclonal purificado a una dilución de 1:50 y se incubó dos horas más, posteriores a las cuales se realizaron los

lavados. Se colocó el conjugado anti-IgG de ratón-peroxidasa a una dilución de 1:500, añadiéndose 100 µl de esta dilución por pozo

Se dejó incubando durante dos horas y se le colocaron 100 µl por pozo de la solución sustrato-cromógeno llevándose a cabo la reacción y deteniéndola con una solución de H₂SO₄ 2N. La lectura se llevó a cabo en un lector para placas de ELISA (BIO RAD) 3550

6.16.- SISTEMA HETEROLOGO DE CAPTURA AcMo E7 INMUNOADSORBIDO

Las placas para ELISA (Costar 3590) fueron sensibilizadas con suero de conejo anti-E+P en una dilución 1:500 en solución amortiguadora de boratos a pH 8.2, de esta solución se colocaron 100 µl por pozo de esta solución y se incubaron toda la noche a 4°C. Las placas fueron lavadas e incubadas con la solución bloqueadora durante 30 min. Posteriormente se realizó el lavado correspondiente

Una dilución 1:5 del anticuerpo monoclonal semipurificado y concentrado fue colocada a razón de 100 µl por pozo en las placas antes mencionadas y se incubaron durante dos horas. Después de la incubación la solución fue retirada y colocada en otros pozos previamente sensibilizados con suero anti-E+P, como se describió anteriormente y de igual forma fueron incubadas durante dos horas.

La solución fue retirada de los pozos y se formó un "pool" del sobrenadante de todos los pozos. Este "pool" se diluyó 10 veces en solución amortiguadora de boratos 0.2M pH 8.2 (1:50 con respecto a la solución original), y se fijó a pozos para ELISA (Immunolon 2) incubándose toda la noche

El exceso de solución se desechó y se lavó con solución de lavados y se procedió a incubar con solución al 5% de leche en PBS-Tween al 0.5% durante 1 hora, posterior a lo cual se realizaron los lavados correspondientes

Después de lavar se añadió el antígeno diluido en PBS-tween a las concentraciones de 0, 5, 10, 15 y 20 µg/ml, y se realizó una incubación a 37°C durante dos horas

Después de incubar los pozos con las diferentes diluciones de antígeno, estos se lavaron y se les colocó 100 µl por pozo de una dilución 1:500 de suero anti-E+P la cual se incubó a 37°C durante dos horas

Se lavaron los pozos y se les colocó un conjugado anti-IgG de conejo-peroxidasa a una dilución de 1:500 y se realizó una incubación más de dos horas.

Se colocaron 100 µl por pozo de la solución sustrato-cromógeno y se dejó desarrollar el color, para posteriormente detener la reacción con H₂SO₄ 2N. Las lecturas fueron hechas en un lector de ELISA (BIO RAD 3550) a 490 nm

7.0.- RESULTADOS Y OBSERACIONES

Los resultados se muestran en orden cronológico, de tal forma que se pueden dividir en ensayos de fusión; ensayos de caracterización y finalmente ensayos de captura de antígenos.

7.1.- ANTIGENOS

El método empleado para la determinación de proteínas en los extractos antigénicos dió como resultado una concentración de 12 mg/ml para el extracto antigénico E+P y su patrón electroforético se muestra en la Figura 10, se encontró un número reducido de bandas (12 aprox.) con pesos moleculares entre los 25 y 200 kDa. La concentración del antígeno de excreción secreción fue 1.5 mg/ml, su calidad se demostró por electroforesis desarrollándose alrededor de 22 bandas reveladas por la tinción con azul de Coomasie a lo largo de toda la escala de pesos moleculares - entre 16 y 200 kDa- (Figura 11).

7.2.- RESPUESTA HUMORAL DE LOS RATONES

El protocolo de inmunización fue evaluado por muestras de suero tomadas de los animales sensibilizados, estas muestras fueron sometidas a prueba de captura de anticuerpos por ELISA. En la Figura 12 se observa como los continuos estímulos elevan gradualmente la presencia de anticuerpos.

7.3.- TAMIZADO

De la fusión realizada (481 pozos) se obtuvieron 25 pozos positivos a crecimiento en medio HAT (5.2% de fusión).

1B3	1D1	2B10	3A3	3G2
1B4	1G1	2D3	3B7	3G6
1B6	1H10	2F11	3D1	3H6
1C2	2A3	2F2	3D2	3H11
1C6	2A5	2H6	3D6	3H12

Estos pozos fueron crecidos y sometidos a prueba de captura de anticuerpos en ELISA para determinar los pozos productores de los anticuerpos anti-exoantígenos, de los cuales seis clonas fueron positivas (1.25% de híbridos específicos). 1C2 1C6 2A3 2D3 3D2 3H6. Los resultados del tamizado se muestran en la Figura 13.

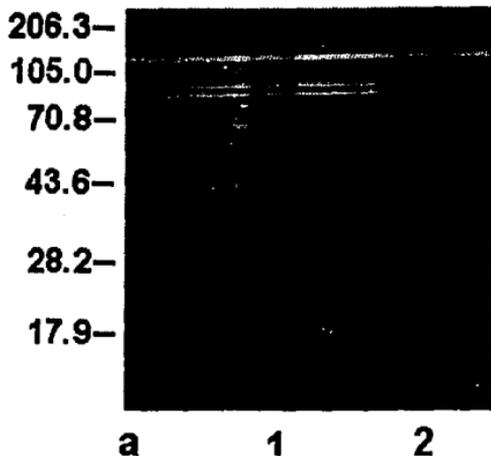


Figura 10. Patrón electroforético del antígeno E+P. a) Estándar de pesos moleculares; 1) Antígeno E+P en condiciones no reductoras; 2) Antígeno en condiciones reductoras.

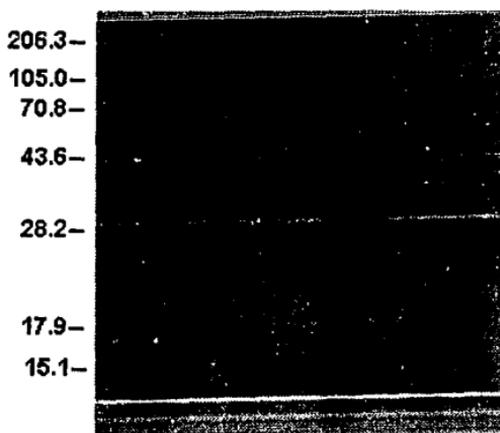


Figura 11. Patrón electroforético característico de los exoantígenos. Se muestran el antígeno cosechado en diferentes días. El asterisco señala el primer sobrenadante cosechado.

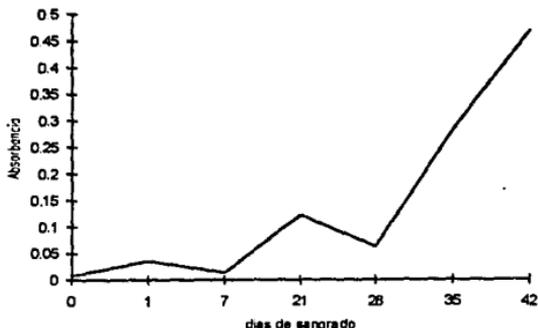


Figura 12. Se muestra la determinación de anticuerpos IgG de ratón anti-exoantígenos del metacéstodo de Taenia solium.

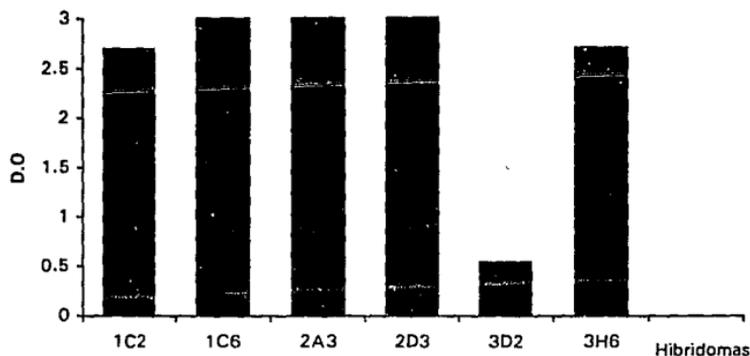


Figura 13. Líneas productoras de anticuerpos anti-exoantígenos. Se muestran los resultados del ELISA usando los sobrenadantes de las seis líneas positivas a la producción de anticuerpos anti-exoantígenos de cisticerco de Taenia solium.

7.4.- CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

El primer paso en la caracterización de las clonas fue el establecer la clase de anticuerpos a la que pertenecían. La determinación de clases reveló que las seis líneas fueron de la clase IgG y los resultados se muestran en la Figura 14.

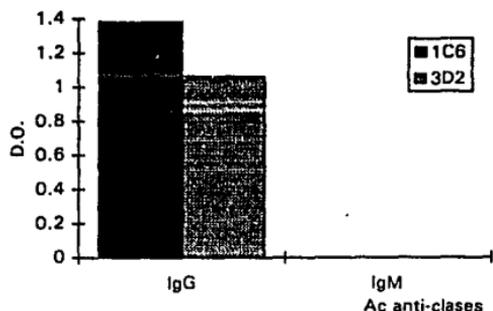


Figura 14. Determinación de clases de anticuerpos para las líneas 1C6 y 3D2. Se muestran los resultados del ELISA usando los sobrenadantes de cultivo de ambas líneas.

Como se mencionó en la sección de métodos, para la elaboración de este proyecto se eligieron dos de las seis líneas positivas (1C6 y 3D2). Dichas líneas fueron expandidas para realizar los ensayos correspondientes.

La expansión de las líneas 1C6 y 3D2 se realizó y los resultados del tamizado por ELISA se muestran en la Figura 15.

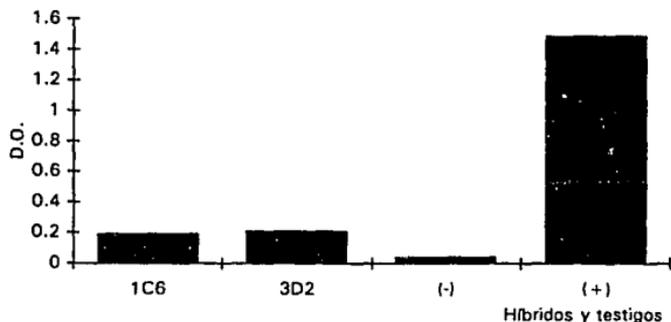


Figura 15. Evaluación de producción de anticuerpos para las líneas 1C6 y 3D2 por ELISA. Empleando como testigo negativo a la línea Ag8 (-), y como testigo positivo suero de ratón inmunizado (+).

Aun cuando los valores de absorbancia fueron muy bajos, se decidió realizar la clonación de ambas líneas. Los resultados se exponen a continuación.

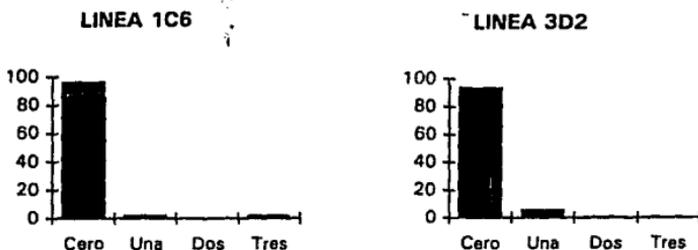


Figura 16. Clonación celular. El esquema muestra el porcentaje de pozos con células y el número de células por pozo. A la izquierda se muestra la gráfica de la clonación para la línea 1C6. Al lado derecho se representa la gráfica de clonación para la línea 3D2.

Después de realizada la clonación, las "líneas" fueron expandidas en cultivo hasta alcanzar una confluencia del 75% aproximadamente, al alcanzar este grado de crecimiento los sobrenadantes de dichos pozos fueron sometidos al ensayo de producción de anticuerpos anti-exoantígenos. El porcentaje de pozos positivos a la producción de anticuerpos fue de 0.052%, con respecto al número de pozos obtenidos de la clonación. Con respecto a los híbridos totales el porcentaje fue del 10.52 al 12.5%. Los resultados se muestran en la Figura 17.

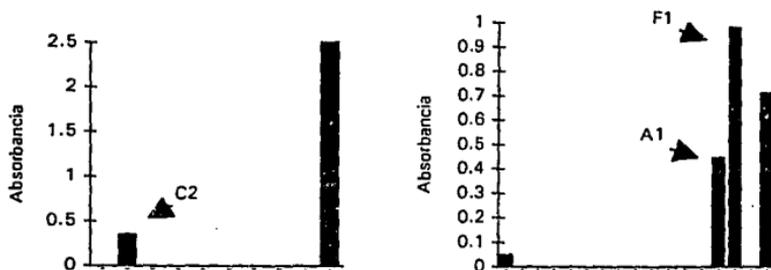


Figura 17. Tamizaje celular. Se muestran las clonas positivas a la producción de anticuerpos anti-exoantígenos de cisticerco de *T. solium*, derivadas de la clonación. La gráfica de la izquierda pertenece a la línea 1C6 (una clona positiva C2), y la gráfica de la derecha la de la línea 3D2 (dos clonas positivas A1 y F1). La última barra a la derecha de cada una de las gráficas representa al testigo positivo (suero de ratón inmune).

La clona obtenida a partir de la línea 1C6 no se logró expandir y murió al cultivo a los pocos días de realizada la clonación. Las dos clones provenientes de la línea 3D2 si se lograron expandir y fueron reetiquetadas A1 (3D2H4) y F1 (3D2H7).

Las dos clones (A1 y F1) fueron sometidas al proceso de subclonación con el objeto de que cumpliera el requisito de monoclonalidad (una célula, una clona). La clona A1 no fue positiva al crecimiento en el proceso de subclonación y fue congelada a -70°C. La subclonación de F1 arrojó los siguientes datos:

Pozos con células 9.72%

Pozos con una sola célula 1.041% (tres pozos)

Los tres pozos que cumplieron con el requisito de presentar una sola célula (criterio de monoclonalidad), fueron ensayados para establecer su capacidad de producir anticuerpos anti-exoantígenos, dando positivo al ensayo de captura de anticuerpos por ELISA.

Los tres híbridos monoclonales se denominaron D11, E2 y E7 se expandieron en cultivo y sus sobrenadantes fueron cosechados cada tercer día para someterlos a la caracterización inmunquímica correspondiente.

El siguiente paso en la caracterización de los anticuerpos monoclonales fue el establecimiento de su subclase. La determinación de la subclase puso de manifiesto que el anticuerpo pertenecía a la subclase IgG1 para los tres híbridos (Figura 18).

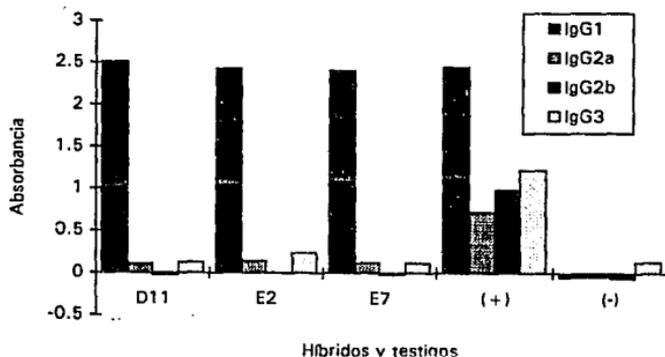


Figura 18. Determinación de subclases. El esquema muestra la distribución de las subclases para los anticuerpos monoclonales D11, E2 y E7. Suero de ratón inmunizado fue empleado como testigo positivo (+), y sobrenadante de la línea del mieloma como testigo negativo (-).

El ensayo de reacciones cruzadas que enfrente al anticuerpo monoclonal con los antígenos de Extracto Crudo de *Trichinella spiralis* y antígeno total de *Taenia solium* fue negativo mostrándose los resultados de dicho ensayo en la Figura 19.

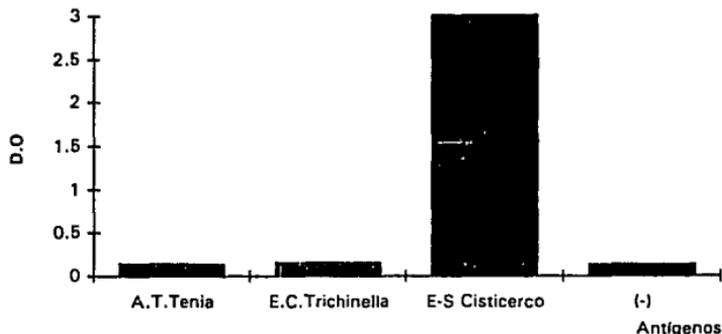


Figura 19. Gráfica de Reacciones Cruzadas. El ensayo no detectó el fenómeno de reacción cruzada con los antígenos implicados en el experimento. El símbolo (-) muestra el testigo sin anticuerpo monoclonal.

La caracterización inmunoquímica por inmunoelectrotransferencia se realizó con los dos extractos antigénicos. Al enfrentar al anticuerpo monoclonal contra el antígeno E+P en condiciones reductoras en IET evidenció el mismo patrón antigénico (siete bandas) para los tres monoclonales, así como para las dos clonas previas (A1 y F1) y las bandas que fueron reconocidas en el extracto crudo del cisticerco presentaron los siguientes pesos moleculares 102.5; 91.1; 77.5; 72.8; 64.5; 24.2 y 10.2 kDa (Figura 20). Al enfrentar tanto a los monoclonales como a las clonas al mismo antígeno en condiciones no reductoras se presentó la misma situación, es decir, el patrón desarrollado por los diferentes tipos celulares fue el mismo dando cuatro bandas con los siguientes pesos moleculares: 98.4; 93.1; 63.7; 31.9 kDa (Figura 21). Con base en que los resultados arrojados por la técnica de inmunoelectrotransferencia indicaban que se trataba de un solo anticuerpo, se les trató como el mismo anticuerpo monoclonal y se le denominó E7.

Al enfrentar al anticuerpo monoclonal E7 contra el antígeno de excreción secreción en condiciones reductoras se revelaron tres bandas de bajo peso molecular, los pesos moleculares de las bandas son los siguientes: 39.05, 20.9 y 12.4 kDa (Figura 22). En condiciones no reductoras se desarrollaron tres bandas de bajo peso molecular debidas a la reacción del anticuerpo monoclonal (59.0; 50.6 y 28.0 kDa), y dos más debidas a la reacción única del conjugado peroxidado de alto peso molecular (150.7 y 141.1 kDa), se muestran en la Figura 23. Al enfrentar el anticuerpo monoclonal a una fracción enriquecida de glicoproteínas del metacéstodo en inmunoelectrotransferencia la reacción fue negativa (datos no mostrados).

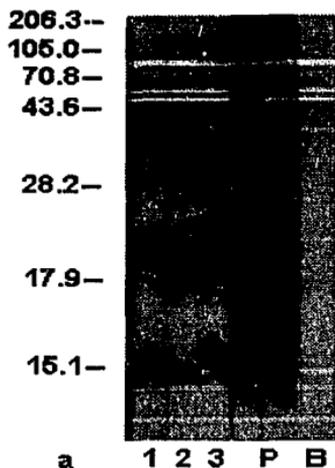


Figura 20. IET Ag E+P en condición reductora vs AcMo E7. 1, 2 y 3 muestran diluciones del anticuerpo (1 es la dilución mayor); "P" son los testigos positivos (Anti ES y Anti E+P); y "B" muestra la tira sin anticuerpo monoclonal (tira blanco).

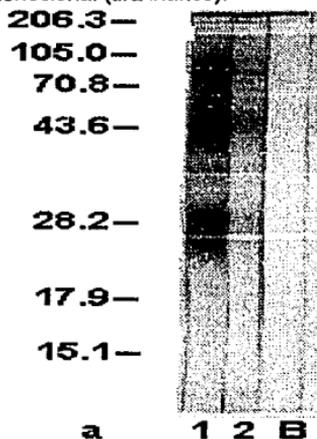
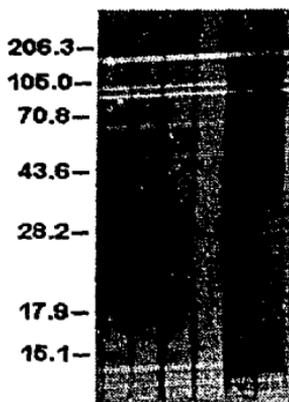
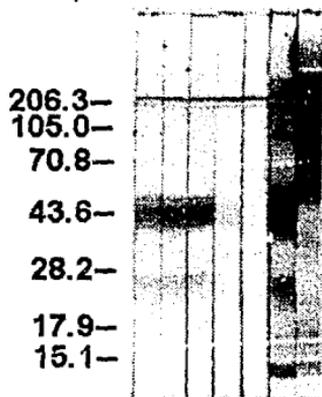


Figura 21. IET Ag E+P en condiciones no reductoras vs AcMo E7. 1 y 2 son diluciones del anticuerpo monoclonal (2 es la dilución mayor), y "B" es la tira blanco (tira sin anticuerpo monoclonal).



a 1 2 3 B P

Figura 22. IET Ag E-S en condición reductora vs AcMo E7. Se muestran las bandas reconocidas por el anticuerpo monoclonal E7 en los exoantígenos en condiciones reductoras. 1, 2 y 3 son diluciones del anticuerpo monoclonal (3 es la dilución mayor), las diluciones se emplearon para establecer que dichas bandas no eran producto de uniones inespecíficas; "B" es la tira blanco (sin anticuerpo monoclonal) y "P" los testigos positivos (anti E-S y anti E+P).



a 1 2 3 4 B (+)

Figura 23. IET Ag E-S en condiciones no reductoras vs AcMo E7. 1, 2, 3 y 4 muestran diluciones del anticuerpo monoclonal (4 es la dilución mayor); "B" es la tira blanco; y (+) señala a los testigos positivos (anti E-S y anti E+P).

7.5.- CAPTURA DE ANTIGENOS

El primer sistema de captura diseñado con el uso de los sobrenadantes del anticuerpo monoclonal E7 como agente de captura y el anticuerpo policlonal (anti-E+P), como anticuerpo de revelado fue desalentador, ya que el sistema no diferenciaba entre un pozo con antígeno y un pozo sin antígeno, o sea, las absorbancias no se veían influenciadas por la presencia o la ausencia del antígeno (Figura 24). Los anticuerpos de revelado (anti-E+P), se emplearon biotinilados y sin biotinilar, para los anticuerpos sin biotinilar se empleó un conjugado anti conejo-peroxidasa para evidenciar la reacción. Al mismo tiempo se evaluó el efecto del sistema revelador (S.A.), en estos pozos solo se fijaba el anticuerpo monoclonal, se bloqueaba y se colocaba PBS-Tween en lugar del antígeno y del anticuerpo policlonal, y finalmente se colocaba el sistema revelador (Avidina-peroxidasa o anti conejo-peroxidasa). Las barras referidas al bloqueo evaluaban una posible reacción del policlonal con nuestro sistema de bloqueo (leche descremada al 5% en PBS-Tween al 0.05%), en dichos pozos solo se bloqueaban y se colocaba el antígeno, el Anticuerpo policlonal y el sistema amplificador.

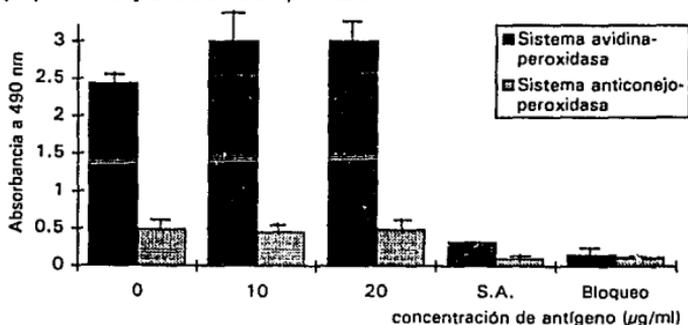


Figura 24. Sistema Heterólogo de Captura. El ELISA se diseñó usando el anticuerpo monoclonal como anticuerpo de captura y al policlonal como anticuerpo de revelado. S.A muestra al testigo sin anticuerpo policlonal, y las barras de bloqueo muestran al testigo sin anticuerpo monoclonal.

Con el planteamiento de la reacción entre el policlonal y algún componente del sobrenadante de cultivo, se decidió expandir la línea en peritoneo de ratón y purificar a los anticuerpos monoclonales a partir de éste fluido.

La purificación de anticuerpos monoclonales a partir de líquido de ascitis está ampliamente descrita (Goding, 1983; Harlow, 1988). Por esta razón se decidió inocular cuatro ratones hembras con los hibridomas productores del anticuerpo monoclonal E7. El resultado de esta inoculación fue negativo a la producción de ascitis, aun después de 1 mes de haber sido efectuado el tratamiento de los animales (Figura 25).

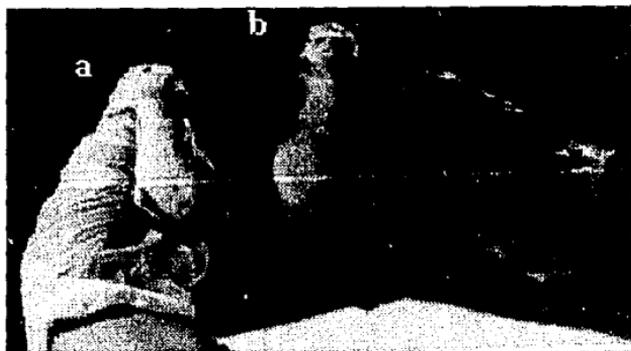


Figura 25. Ratón ascítico. a) ratón inoculado con hibridomas productores de anticuerpo monoclonal E7; b) ratón inoculado con hibridomas productor de líquido de ascitis. Se puede observar el gran volumen del abdomen desarrollado en el ratón "b" por la presencia de las células híbridas. Nótese como los hibridomas productores del monoclonal E7 no inducen la producción de líquido de ascitis.

Se procedió entonces a purificar el anticuerpo monoclonal directamente del sobrenadante de cultivo.

La purificación del anticuerpo monoclonal E7 llevada a cabo por la técnica descrita en la sección de métodos se evaluó espectrofotométricamente a 280 nm, dando por resultado la Figura 26.

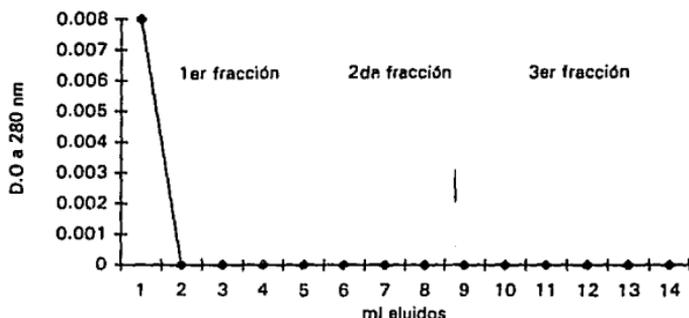


Figura 26. Evaluación espectrofotométrica del purificado del anticuerpo monoclonal E7 en la columna de Affi-Gel Proteína A.

Como se puede observar en la Figura 26 la sensibilidad del sistema no fue capaz de detectar las pequeñísimas cantidades de anticuerpo presentes en las fracciones eluidas de la columna de proteína A. Con base en esto se realizó un ensayo de captura de anticuerpos por ELISA (determinación inmunológica), para poner en evidencia la presencia del anticuerpo monoclonal en la fracción eluida de la columna (Figura 27).

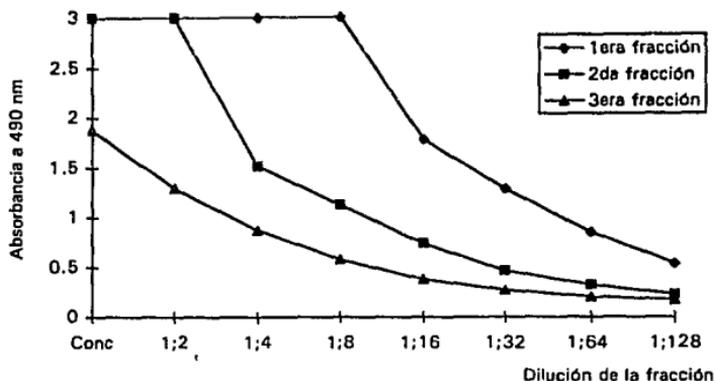


Figura 27. Evaluación inmunológica realizada a las fracciones purificadas.

Ya que el método inmunológico nos proveía de un parámetro de cuantitatividad se decidió emplearlo como indicador de la cantidad de anticuerpos presentes en los purificados, fue así como se planteó el empleo de los purificados en el ensayo de captura. Al realizarse el ensayo de captura empleando el anticuerpo monoclonal purificado y usándolo como anticuerpo de captura, y al anticuerpo policlonal anti E+P como anticuerpo de revelado, la gráfica que se obtuvo no cambió con respecto a la obtenida empleando sobrenadantes del anticuerpo monoclonal (Figura 24).

La determinación de la calidad del purificado se llevó a cabo con la técnica de electroforesis en gels de poliacrilamida los cuales mostraron una banda de aproximadamente 70 kDa, con lo cual se cree que se trató una contaminación por albúmina (Figura 29).

Con base en los resultados poco eficientes obtenidos por la purificación del anticuerpo monoclonal con la columna de Affi-gel Proteína A, se decidió cambiar el método de purificación, empleando para esto un kit descrito para la purificación de anticuerpos monoclonales de subclase IgG1 (MAPS II), los resultados de dicho proceso se muestran en las Figuras 28a (determinación espectrofotométrica) y 28b (determinación inmunológica).

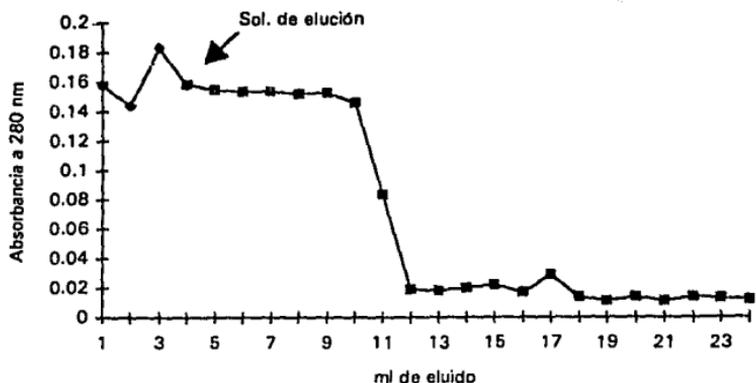


Figura 28a. Determinación espectrofotométrica a 280 nm de la fracción de IgG eluidas de la columna de MAPS II.

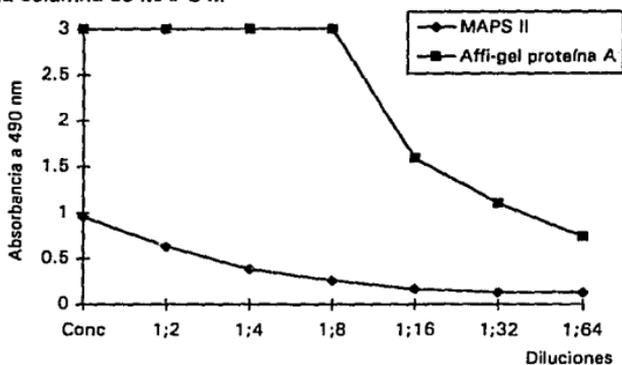


Figura 28b. Determinación inmunológica. Se esquematiza la determinación inmunológica de las fracción de las IgG obtenida de la columna de MAPS II, en comparación con las fracciones obtenidas por la técnica de Affi-gel Proteína A.

La calidad del purificado obtenido de la técnica de MAPS II se evaluó por el método de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y tinción de azul de Coomassie. Como se puede observar en la Figura 8, el resultado es muy similar al obtenido por el método de Affi-Gel Proteína A, la banda de 69 kDa (sospecha de albúmina) se mantuvo. Aun cuando aparentemente no hay grandes diferencias entre ambos métodos de purificación, se decidió emplear a los purificados obtenidos de la

técnica de MAPS II en el sistema de captura, con la idea de que la calidad de dichos purificados fuese superior a la de los purificados obtenidos de la columna de Affi-Gel proteína A, es decir, que el problema de contaminación por albúmina se eliminara.

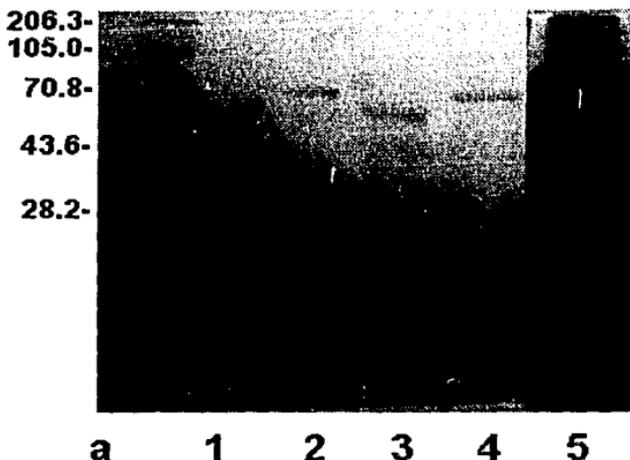


Figura 29. Patrón electroforético de purificados. Control de Calidad realizado a las fracciones puras del anticuerpo monoclonal E7. a) Estándar de pesos moleculares; 1) Purificado por columna de proteína A en condiciones no reductoras; 2) Purificado por columna de proteína A en condiciones reductoras; 3) Purificado por MAPS II en condiciones no reductoras; 4) Purificado por MAPS II en condiciones reductoras; 5) Sobrenadante de cultivo.

Al no poder poner en evidencia el patrón característico de un anticuerpo de clase IgG con la tinción de Coomasie, se decidió realizarle a los purificados tinción de plata e inmunolectrotransferencia, empleando como revelador un conjugado anti-IgG de ratón. Los resultados se muestran en las Figuras 30 y 31.

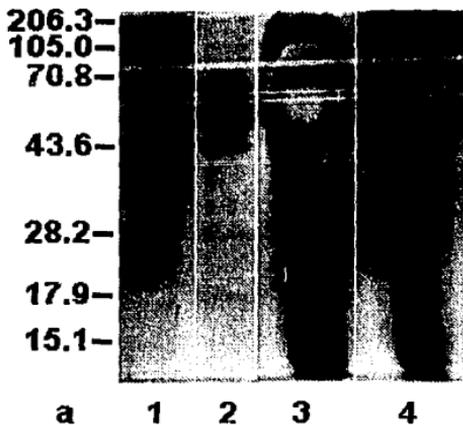


Figura 30. Tinción de plata en geles de poliacrilamida al 10%. a) Estándar de pesos moleculares; 1) Anticuerpo monoclonal purificado (condiciones no reductoras); 2) Anticuerpo monoclonal purificado (condiciones reductoras); 3) Sobrenadante de cultivo (condiciones no reductoras); 4) Sobrenadante de cultivo (condiciones reductoras).

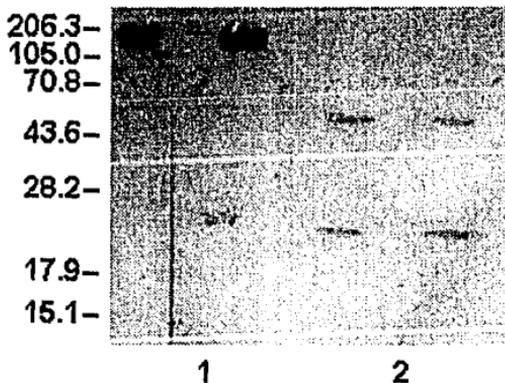


Figura 31. IET del anticuerpo monoclonal E7. 1) Anticuerpo monoclonal E7 en condiciones no reductoras (por duplicado); 2) Anticuerpo monoclonal en condiciones reductoras (por duplicado).

El anticuerpo purificado por la columna de MAPS II, fue empleado como anticuerpo de captura, en el sistema antes referido y los resultados se muestran en la Figura 32.

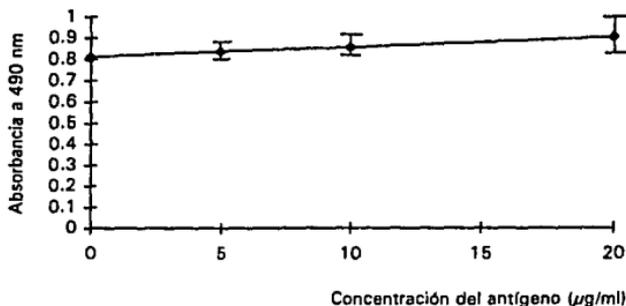


Figura 32. Sistema heterólogo de Captura. Se utilizó al Anticuerpo Monoclonal puro obtenido por la técnica de MAPS II como anticuerpo de captura.

Los resultados mostraron una reacción entre el anticuerpo policlonal de conejo anti E+P y el "purificado" obtenido de cualquiera de las dos técnicas empleadas de purificación. Como se hizo notar el eluido obtenido de las columnas presentaba una contaminación considerable de albúmina, por lo tanto se procedió a enfrentar al anticuerpo policlonal contra esta y otras proteínas. El ensayo mostró la alta inespecificidad del anticuerpo policlonal. El anticuerpo monoclonal también fue sometido al ensayo, y solo presentó una ligera reacción con el fibrinógeno (Figura 33).

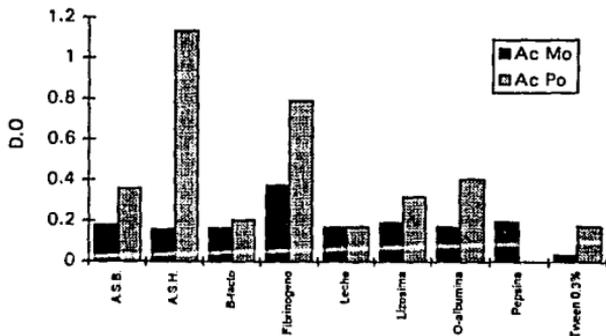


Figura 33. Reacciones Cruzadas de los anticuerpos policlonal y monoclonal contra algunas proteínas puras. Obsérvese la reacción ocurrida entre el anticuerpo

policlonal α -E+P y la mayoría de las proteínas ensayadas, principalmente con albúmina sérica bovina (A.S.B.), albúmina sérica humana (A.S.H.), fibrinógeno y ovoalbúmina.

Al enfrentarnos a la imposibilidad de elaborar una curva Dosis-Respuesta con nuestro sistema heterólogo de captura, y tomando en cuenta la "inespecificidad" mostrada por el anticuerpo policlonal, se decidió invertir el sistema. Se colocó el anticuerpo policlonal anti E+P como agente de captura de antígenos y al anticuerpo monoclonal E7 como el anticuerpo de revelado. El ensayo descrito hizo posible la realización de la curva dosis-respuesta, aunque mostró una sensibilidad muy baja, los resultados se resumen en la Figura 34.

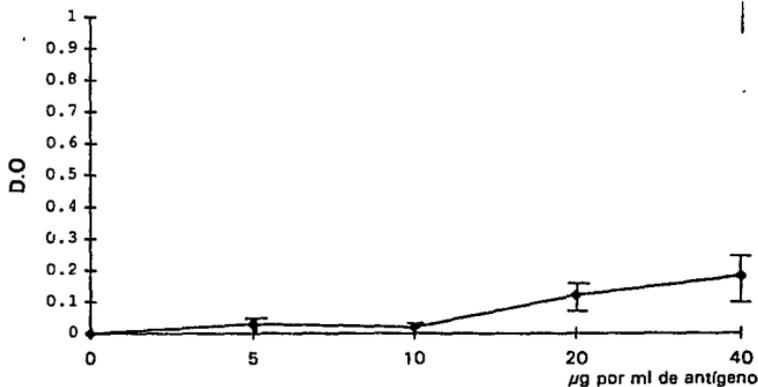


Figura 34. Sistema heterólogo de captura. Se emplea al anticuerpo policlonal anti-E+P como anticuerpo de captura (dil. 1:250), y al anticuerpo monoclonal como anticuerpo de revelado (dil. 1:50). Como lo demuestra la gráfica, la sensibilidad dada por este sistema es limitada.

Las conclusiones obtenidas del experimento arriba mostrado fueron de gran importancia, ya que puso de manifiesto que la interacción detectada en los anteriores ensayos de captura se debía básicamente a la reacción del anticuerpo policlonal con algún contaminante presente en las fracciones eluidas de las columnas de purificación y no con el anticuerpo monoclonal como tal.

La baja sensibilidad se atribuyó en un principio a la cantidad tan pequeña del anticuerpo monoclonal manejada en el ensayo, es decir, que pudiese ser un factor limitante en el ensayo. Teniendo en cuenta esta observación se propuso manejar diferentes concentraciones del anticuerpo monoclonal para discriminar esta posibilidad.

Las concentraciones de anticuerpo monoclonal 1:50 y 1:25 fueron empleadas para contestar la pregunta planteada acerca de la concentración del anticuerpo monoclonal. Los resultados se observan en la Figura 35, como se puede observar la cantidad de anticuerpo monoclonal no mostró ninguna influencia sobre la sensibilidad del sistema de captura.

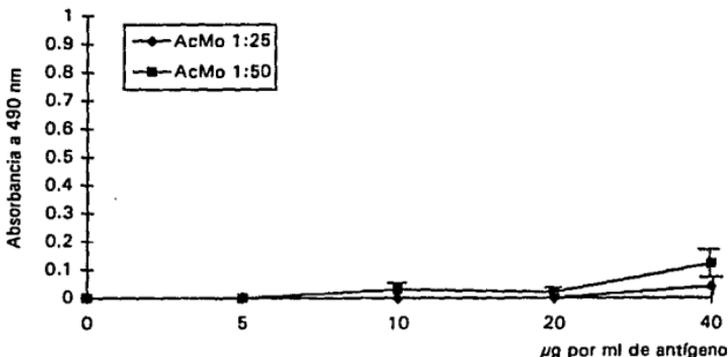


Figura 35. Efecto la dilución del anticuerpo monoclonal E7 sobre el sistema de captura. El anticuerpo policlonal se utilizó en una dilución 1:250 (como anticuerpo de captura). Se concluye que la concentración del anticuerpo monoclonal no limita la sensibilidad del sistema

Existía la posibilidad de que el anticuerpo policlonal anti E+P a la dilución de trabajo empleada pudiese provocar el fenómeno de efecto estérico inhibiendo así la unión del anticuerpo monoclonal con su epítipo. Para discriminar esta hipótesis se realizaron diluciones del anticuerpo policlonal y se fijaron a los pozos para ELISA. El ensayo demostró que el anticuerpo policlonal no provocaba dicho fenómeno (Figura 36).

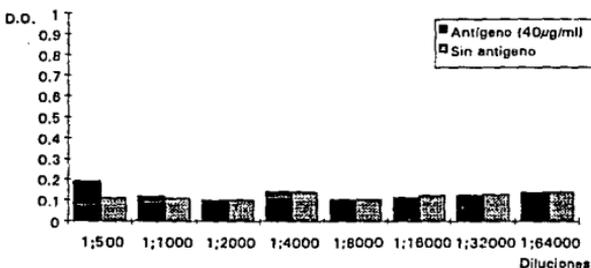


Figura 36. Efecto de la dilución del anticuerpo policlonal sobre el sistema de captura. Se observa como la cantidad del policlonal no afecta la sensibilidad.

Tratando de mejorar la sensibilidad del ensayo y después de poner en evidencia la inespecificidad del anticuerpo policlonal anti E+P, se decidió regresar al primer modelo de captura, es decir, al sistema que emplea como anticuerpo de captura al anticuerpo monoclonal, con la salvedad de que en lugar de emplear al anticuerpo policlonal anti E+P, se empleó el anticuerpo policlonal anti E-S. Los resultados no demostraron mejoría con respecto al ensayo con el policlonal anti E+P (Figura 37). Ya que la reacción se presentaba con otro componente del purificado distinto al anticuerpo monoclonal, se desarrolló un método de inmunoadsorción como un paso de purificación adicional que mejorara la calidad de los anticuerpos puros.

Al no contar con un mejor método de purificación se decidió realizarle al semipurificado del anticuerpo monoclonal E7 un proceso de inmunoadsorción frente al anticuerpo policlonal de conejo anti-E+P, y posteriormente emplear dicho inmunoadsorbido en el sistema de captura fijándolo a la placa, es decir, como anticuerpo de captura (el procedimiento se describe en la sección de métodos, Sistema de captura inmunoadsorbido). Los resultados fueron alentadores (Figura 38), con base en que la sensibilidad se elevó notoriamente con respecto a los ensayos de captura previamente probados.

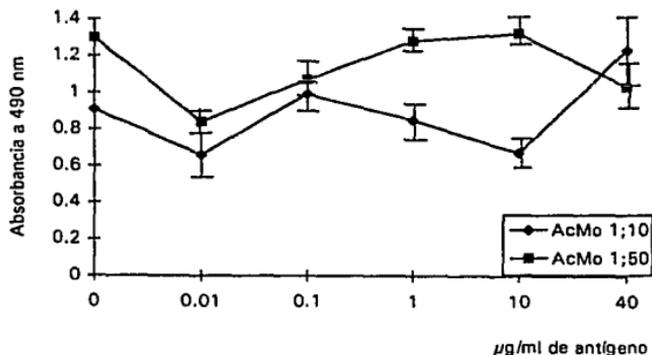


Figura 37. Sistema heterólogo de captura con AcMo E7 como capturador y AcPo anti E-S como anticuerpo de revelado con anti-conejo peroxidado como sistema amplificador.

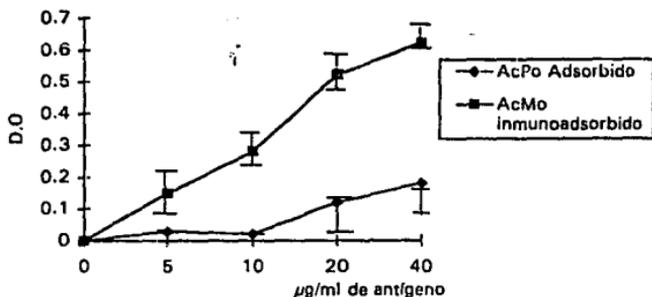


Figura 38. Comparación de los sistemas de captura. Se muestra la mayor sensibilidad presentada en el Sistema de Captura Inmunoadsorbido. El anticuerpo policlonal se empleó a 1:500; y el anticuerpo monoclonal 1:50.

Una vez más se debió discriminar la posibilidad de que el anticuerpo monoclonal fuese un reactivo limitante en el sistema, para establecerlo se emplearon dos diluciones diferentes del anticuerpo monoclonal en el ensayo de captura. Al igual que en los ensayos previos se pudo constatar que la dilución de trabajo no limitaba la sensibilidad del sistema (Figura 39).

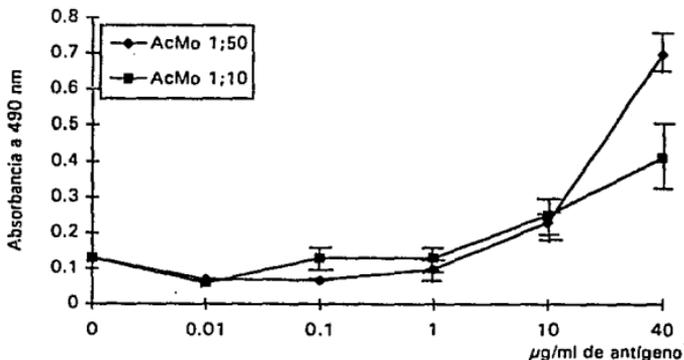


Figura 39. Influencia de la dilución del anticuerpo monoclonal E7 en el sistema de captura (inmunoadsorbido).

Buscando mejorar la sensibilidad de la prueba y con base en los reportes del sistema de biotina-avidina como un gran amplificador, se decidió emplear al anticuerpo policlonal anti E+P biotinilado y utilizarlo en el sistema de captura, pero el ensayo fue incapaz de distinguir entre pozos con antígeno y pozos sin antígeno (Figura 40)

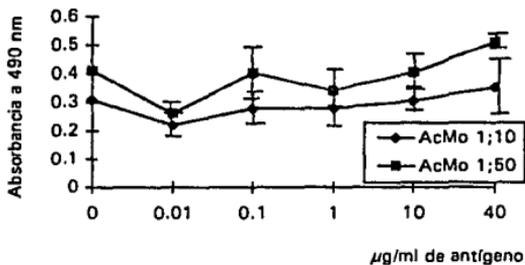


Figura 40. Sistema heterólogo de captura empleando conjugado avidina-peroxidasa como sistema amplificador.

Aun cuando la sensibilidad del sistema inmuoadsorbido (empleando anti conejo-peroxidasa), nunca fue la óptima y de alguna forma el sistema no se postulaba como un buen método de diagnóstico, se decidió realizar su validación. La validación del Sistema Heterólogo de Captura Inmuoadsorbido se llevo a cabo con muestras de líquido cefalorraquídeo y suero con diagnóstico referido por la prueba de detección de anticuerpos realizada en el Instituto Nacional de Diagnostico y Referencia Epidemiológicos. La validación arrojó por resultado la reacción positiva -valores mas allá de 0.20- con 19 de los 20 sueros ensayados (solo un suero tuvo un valor de absorbancia 0.178), no importando si dichos sueros eran muestras positivas o negativas. En el caso de las muestras que eran líquidos cefalorraquídeos, todas cayeron por debajo de 0.20 de valor de absorbancia (Figura 41).

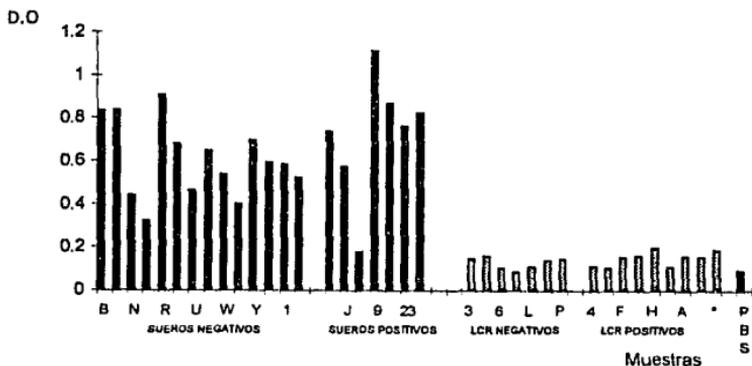


Figura 41. Validación del Sistema Heterólogo de Captura. Alineados a la izquierda se muestran los sueros evaluados y a la derecha los LCR.

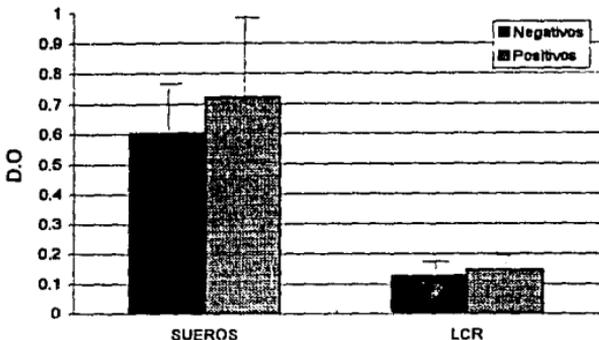


Figura 42. Absorbancias promedio de muestras evaluadas. Se muestran las absorbancias promedio de muestras positivas y negativas con sus respectivas desviaciones estandar.

La conclusión del ensayo de validación es el planteamiento de una reacción entre el anticuerpo monoclonal y algún componente del suero, no presente en LCR. El paso inmediato postulado fue el enfrentar al anticuerpo contra un suero normal en ELISA de captura de anticuerpos empleando a dicho suero como antígeno. Los resultados no fueron graficados ya que los pozos que actuaban como blancos del ensayo dieron una reacción muy importante con el suero normal.

Al no poderse establecer la reacción del anticuerpo monoclonal con suero normal en ELISA, se decidió realizar un ensayo en inmunoelectrotransferencia, es decir, correr por electroforesis un lote de suero normal humano, y transferirlo a una membrana de nitrocelulosa, para posteriormente enfrentarlos al anticuerpo monoclonal. Como se presentó un efecto de reacción cruzada entre el suero de humano y el anti-IgG's de ratón en el método de ELISA, el objetivo de la inmunoelectrotransferencia era evidenciar las bandas desarrolladas por el anticuerpo monoclonal y no tomar en cuenta las promovidas por el conjugado anti-ratón. Como resultados se reportó una serie de bandas (atribuidas al anticuerpo monoclonal), con peso molecular entre 100 y 70 kDa. Las bandas reveladas por el conjugado fueron tres presentando pesos moleculares de 160, 46 y 24 kDa (Figura 44, tira blanco (B)).

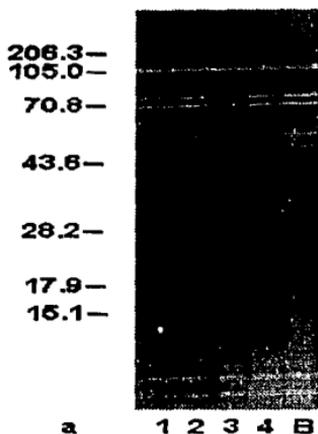


Figura 43. IET entre anticuerpo monoclonal E7 vs suero normal humano en condiciones no reductoras. 1, 2, 3, y 4 son diluciones del anticuerpo monoclonal empleadas para demostrar que las reacciones no eran por uniones inespecificas; y "B" es la tira sin anticuerpo monoclonal; "a" es el estandar de pesos moleculares.

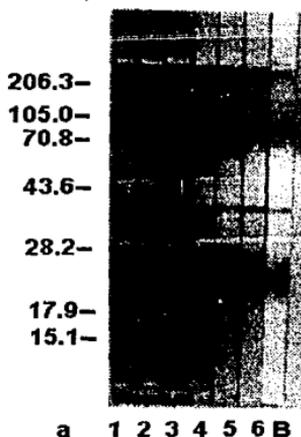


Figura 44. IET Suero humano normal en condicion reductora vs AcMo E7. Las tiras de la 1 a la 6 muestran la reacción llevada a cabo entre un suero normal humano en condiciones reductoras y el anticuerpo monoclonal E7 a diferentes diluciones. "B" es la tira blanco (testigo sin anticuerpo monoclonal); "a" es el estandar de pesos moleculares.

8.0.- DISCUSION

Al tomar en cuenta que los métodos serológicos descritos para el diagnóstico de la cisticercosis no ponen de manifiesto la presencia estricta del parásito (parasitosis activa), o detectan fenómenos de reacción cruzada con otros parásitos afectando con esto la especificidad de la prueba, ha sido preocupación de diversos grupos de investigadores el describir técnicas que promuevan una mejora en el diagnóstico de esta enfermedad. Es por esto que la producción de anticuerpos monoclonales anti-antígenos de cisticercos de T. solium se planteó como una alternativa para mejorar el diagnóstico teniendo como objetivo disminuir el fenómeno de reacción cruzada y por ende aumentar así la especificidad de la prueba.

El empleo de los anticuerpos monoclonales ha sido muy amplio desde que su producción fue descrita (Kohler-Milstein 1975), a partir de entonces los anticuerpos monoclonales han tenido un gran impacto en las áreas biológicas y biotecnológicas. El empleo de los anticuerpos monoclonales ha mejorado el inmunodiagnóstico y para apreciar el impacto real de los anticuerpos monoclonales es necesario comprender los problemas y limitaciones que presentan los métodos serológicos convencionales en donde se emplean antisueros policlonales. La principal limitante de los antisueros policlonales es que la obtención de una alta especificidad resulta muy difícil e incierta, ya que esto requiere de un antígeno altamente puro. Con el desarrollo de los anticuerpos monoclonales ahora es posible obtener cantidades ilimitadas de anticuerpos altamente específicos contra casi cualquier molécula o porción de molécula, aún partiendo de antígenos que no posean una alta pureza. La disminución de reacciones cruzadas, la alta afinidad y la homogeneidad de las propiedades físicas son algunas de las características presentes en los anticuerpos monoclonales (Goding, 1983).

El presente trabajo tuvo como propósito principal la caracterización de uno de los anticuerpos monoclonales anti-exoantígenos del cisticercos de T. solium con miras hacia el mejoramiento de la prueba de captura de antígenos (sensibilidad 1 µg/ml; especificidad del 75%) realizada en el Departamento de Inmunoparasitología del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicas. Se decidió emplear a los exoantígenos del cisticercos en la producción de estos anticuerpos monoclonales, ya que son estas las moléculas que libera el parásito y finalmente las que se pueden encontrar en circulación. La producción de los exo-antígenos se realizó en medio RPMI sin complementar, esto para inducir la producción de metabolitos del metacéstodo a partir de compuestos más sencillos, ya que en cultivo el metacéstodo libera estos metabolitos al medio. La producción de exoantígenos ha sido descrita por otros autores en otras parasitosis (Allan, 1992). Las líneas 1C6 y 3D2 (productoras de anticuerpos anti-exoantígenos del metacéstodo de T. solium), fueron elegidas para su caracterización inmunquímica en el desarrollo de este proyecto.

Como se muestra en la determinación de clases y subclases de anticuerpos (Figuras 14 y 18), el obtener líneas celulares que produjeran anticuerpos de la clase IgG subclase IgG1 resultó congruente con los protocolos de inmunización y fusión empleados en la producción de nuestros anticuerpos monoclonales. Apoyándonos en las observaciones realizadas por Goding donde se reportó que la inmunización de ratones con algún parásito empleando adyuvante de Freund provoca principalmente una respuesta de tipo IgG1 y por consiguiente muchos hibridomas productores de anticuerpos IgG1. De igual forma el emplear células provenientes de bazo trae consigo una distribución de hibridomas similar a la encontrada en el suero (Johnson y col, 1991). Al combinar ambas metodologías la producción de anticuerpos del tipo IgG1 resultó ampliamente favorecida.

Los valores bajos de absorbancia promovidos por las líneas antes de ser clonadas (Figura 15), es un punto importante, nosotros sugerimos que probablemente dichas líneas se mantuvieron demasiado tiempo en cultivo y a lo largo de éste, la proporción de células productoras de anticuerpos anti-E-S con respecto a las no productoras disminuye considerablemente, dando como resultado una baja en la concentración de los anticuerpos específicos y por consecuencia una disminución en el valor de absorbancia. El reducido número de pozos positivos a la producción de anticuerpos posteriores a la clonación era de esperarse con base en los valores tan bajos promovidos por las líneas. Lo contrario sucedió al realizar la subclonación de los pozos positivos obtenidos de la primera clonación. En este caso los pozos previamente enriquecidos por el proceso de clonación contaban con una elevada proporción de células productoras siendo lógico esperar un gran número de pozos positivos a la ELISA de captura de anticuerpos.

Al enfrentar a los anticuerpos monoclonales y a los sobrenadantes de las líneas celulares con los extractos antigénicos (extracto crudo E+P; y exoantígenos) en inmunoelectrotransferencia se pudo evidenciar que se trataba del mismo anticuerpo aún desde las líneas celulares (Figuras 19, 20, 21 y 22). Al realizarse dicho ensayo tanto los monoclonales (D11, E2 y E7), como las clonas (A1 y F1) desarrollaban el mismo patrón de bandedo, esto podría justificarse con el concepto de inmunodominancia que presentan algunas moléculas como es el caso del antígeno B. Con estos resultados y los obtenidos en el ensayo de determinación de subclases se concluyó que desde las clonas se estaba tratando con el mismo anticuerpo. Por esto se decidió tratarlos como a uno solo denominándosele anticuerpo monoclonal E7 (AbMo E7).

La presencia de una banda de aproximadamente 30 kDa en ambos extractos antigénicos en condiciones no reductoras, y con la evidencia de que en condiciones reductoras se desarrollaban dos bandas, una de 20 kDa y otra de 10 kDa, se puede sugerir a título de tentativa que la banda de 30 kDa es un dímero compuesto por dos polipéptidos de 10 y 20 kDa (Figuras 20, 21, 22 y 23).

Otro aspecto importante mostrado en la técnica de inmunoelectrotransferencia fue que el anticuerpo desarrollaba más de una banda con ambos extractos antigénicos, no importando si se encontraban en condiciones reductoras o no. Esto puede atribuirse a dos causas principalmente:

1) Que el epitopo reconocido por el anticuerpo monoclonal fuese muy pequeño (tan solo cuatro o cinco aminoácidos), existiendo grandes posibilidades de que esta secuencia se repitiera en diferentes componentes de los extractos antigénicos (Harlow-Lane, 1988). Esta hipótesis se mantuvo más congruente con los resultados obtenidos, aunque solo se empañaba por el ensayo de reacciones cruzadas realizado para los antígenos de extracto total de Taenia solium y para el extracto crudo de Trichinella spiralis, en el cual no se evidenciaba reacciones cruzadas, luego entonces, esta secuencia solo se encontraba en los antígenos del metacéstodo. Según Harlow las reacciones de este tipo pueden ser detectadas ocasionalmente entre antígenos relacionados (Harlow-Lane, 1988), como es el caso del extracto crudo y los exo-antígenos del metacéstodo de Taenia solium.

2) Una segunda posibilidad era la planteada por una reacción del anticuerpo monoclonal con glicoproteínas. Esto se explica mediante el principio de que los carbohidratos presentes en este tipo de moléculas son materialmente las mismas en todas. Algunos autores han reportado el fenómeno de reacciones cruzadas no esperadas con glicoproteínas (Mohamed, 1994; Zodda DM, 1982; Omer Ali P, 1985). Esta hipótesis se propone menos viable con base en el resultado negativo al enfrentar el anticuerpo monoclonal en inmunoelectrotransferencia contra una fracción enriquecida de glicoproteínas obtenidas a partir del extracto crudo del propio metacéstodo.

Al implementar el primer sistema de captura, adsorbiendo el sobrenadante de cultivo de los hibridomas productores del anticuerpo monoclonal E7 para que actuase como anticuerpo de captura, y emplear al anticuerpo policlonal anti E+P (AcPo) como anticuerpo superior o de revelado; los resultados pusieron de manifiesto la reacción entre el AcPo y el AcMo E7, es decir, que la reacción se llevaba a cabo hasta en aquellos pozos que no contenían antígeno (el cero de la curva) y no mostraba ninguna relación en función de la cantidad de antígeno. Se propuso una reacción entre el anticuerpo policlonal y/o el sistema amplificador con el anticuerpo monoclonal y/o el sistema de bloqueo. Al emplearse los testigos necesarios (los que evaluaban la posible reacción del bloqueo y del sistema amplificador con cualquiera de los demás componentes del sistema) y dar negativos la reacción solo podía atribuirse al resultado de una interacción entre el anticuerpo policlonal anti E+P y el anticuerpo monoclonal E7. Con base en que se llevaba a cabo la reacción entre el anticuerpo policlonal y alguno de los componentes del sobrenadante de cultivo, o incluso con el propio anticuerpo monoclonal se postuló la purificación del anticuerpo para eliminar dichas reacciones.

Ya que las técnicas de purificación de anticuerpos monoclonales sugieren que estas sean realizadas a partir de líquido de ascitis nosotros tratamos de inducirlos en

ratones de la cepa BALB/C (Goding, 1983; Harlow-Lane, 1988). El resultado negativo en la inducción de líquido de ascitis se puede atribuir a dos posibles causas:

1) Que los híbridos secretores de el Anticuerpo Monoclonal hubieran sido producidos con una cepa de ratones diferente a BALB/C, esto es posible ya que los ratones empleados en el proceso de fusión no son ensayados para determinar la cepa a la que pertenecen, esto provocaría el reconocimiento de los hibridomas como alotransplantes en el ratón y por consiguiente su eliminación por el sistema inmunitario.

2) Otra posibilidad es que los hibridomas productores del anticuerpo presentaran un crecimiento lento.

En la actualidad ninguna de los dos anteriores posibilidades representan un gran problema, ya que ahora se cuentan con dispositivos que realizan la función de ratones *in vitro* y producen cantidades de anticuerpos equivalentes a la de aproximadamente 60 ratones productores de líquido de ascitis.

El primer intento para purificar al anticuerpo monoclonal se hizo empleando para ello una columna de afinidad, concretamente Affi-Gel proteína A. La técnica se realizó como indicaba el instructivo del reactivo, y la determinación espectrofotométrica se realizó a 280 nm en celdas de 1 ml. Los resultados fueron desalentadores ya que las curvas obtenidas no mostraban el segundo pico que corresponde a la fracción rica en IgG (Figura 26). En un principio se pensó que esto se debía a un problema en el desarrollo de la propia técnica, fue por esto que se propuso realizar la determinación por un método serológico, es decir, realizar un ensayo de captura de anticuerpos evaluado los purificados eluidos de la columna (Figura 27), los títulos mostraron una gran similitud entre los purificados y los sobrenadantes, dicho de otra manera, la cantidad de anticuerpo no se veía afectada por el proceso de purificación, si no que la cantidad proveniente del cultivo era tan pequeña que prácticamente no se detectaba espectrofotométricamente a 280 nm. En vista de que la determinación inmunológica de las IgG nos proporcionaba un parámetro "cuantitativo" de estas, se decidió continuarlo en las posteriores purificaciones.

Los purificados obtenidos de la columna de Affi-Gel proteína A fueron sometidos al sistema de captura, estos al igual que en el primer sistema de captura descrito fueron empleados como anticuerpos de captura. Los resultados fueron desafortunados, ya que al igual que en el sistema que empleaba el sobrenadante de los híbridos, los testigos negativos presentaban una gran reacción. La calidad de los purificados fue evaluada por electroforesis en geles de poliacrilamida con tinción de Coomasie, dicho ensayo mostró una banda de 69 kDa en condiciones reductoras. En condiciones no reductoras se presentó también una sola banda de aproximadamente 65 kDa. En función de que ninguna de estas bandas correspondía a un patrón de bandas esperado, y con base en el peso molecular que presentaba, se postuló la posibilidad de que fuese una contaminación por albúmina propia del eluido de la columna, proveniente del suero fetal del cultivo.

Como los resultados obtenidos por el método de purificación por Affi-Gel Proteína A no fueron los esperados, se optó por cambiar al método muy similar denominado

MAPS II el cual se encuentra descrito en la purificación de anticuerpos monoclonales de subclase IgG1.

Desafortunadamente la determinación espectrofotométrica de las IgG mostró las mismas complicaciones resultado de la ínfima cantidad de anticuerpo monoclonal obtenido del cultivo (Figura 28a). La determinación inmunológica de las IgG mostró que los valores resultantes no eran mejores que los obtenidos por la columna de Affi-Gel proteína A (Figura 28b). De igual forma los purificados que se obtuvieron de la columna de MAPS II fueron empleados como anticuerpos de captura en el sistema de captura de antígenos y los resultados mostraron las mismas características que los dos anteriores sistemas, es decir, los testigos negativos evidenciaban una reacción importante similar o incluso igual que la desarrollada por los pozos que contenían antígeno. La calidad de los purificados evaluados por la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida con tinción de Coomassie revelaron las mismas bandas que las desarrolladas por los purificados obtenidos por el método de Affi-Gel Proteína A. Tomando en cuenta los resultados no más alentadores que los obtenidos con el uso del sistema de Affi-Gel proteína A y sumado a esto el alto costo del procedimiento se decidió continuar la purificación con el método convencional de AFFI-GEL Proteína A.

Los resultados obtenidos de los ensayos de captura de antígenos sugerían un posible alto grado de inespecificidad por parte de alguno de los dos tipos de anticuerpos, aunado a esto la posible presencia de albúmina en los semipurificados del anticuerpo monoclonal, podría sugerir alguna interacción entre los anticuerpos y este contaminante de los eluidos. Con base en esto se planteó un ensayo en el que se enfrentaron los anticuerpos contra algunas proteínas puras, los resultados mostrados en la Figura 33 evidenciaron la alta inespecificidad del anticuerpo policlonal que desarrolló reacción con albúmina sérica bovina, albúmina sérica humana, fibrinógeno, ovoalbúmina, lizosima, y una muy escasa con B-lactoglobulina. La alta inespecificidad del antisuero se puede atribuir a la obtención de un antígeno contaminado con tejido del hospedero intermediario (el cerdo), del cual se obtienen los cisticercos. El anticuerpo monoclonal solo desarrolló una muy ligera reacción con el fibrinógeno debido básicamente a que esta proteína a que esta proteína por sus características fisicoquímicas provoca un pegado inespecífico. Analizando este ensayo que evidenció la alta inespecificidad del anticuerpo policlonal y suponiendo que la banda presente en los geles donde se corrió el anticuerpo monoclonal fuera albúmina, se podría dar una explicación de por que los ensayos no mostraban una diferencia con base en la cantidad de antígeno presente, y por qué los pozos negativos desarrollaban una intensidad de color similar a la producida por los pozos que si presentaban el antígeno. La justificación de este fenómeno se atribuye a que al fijarse el anticuerpo monoclonal a la placa básicamente se fijaba albúmina (ya que esta se encontraba presente en los purificados y sobrenadantes del anticuerpo monoclonal), y planteándose el reconocimiento del anticuerpo policlonal hacia esta proteína, se explica el desarrollo de color por que aunque no hubiese antígenos de excreción-secreción la reacción se lleva a cabo entre el policlonal y la albúmina. Para el caso de los pozos donde si había antígeno la diferencia no es significativa

entre ellos aún cuando la concentración del antígeno aumentase, esto sugiere que el fijado del propio anticuerpo monoclonal se ve inhibido y posiblemente es despreciable, provocando que la concentración del antígeno no influyera significativamente en los ensayos.

Para corroborar lo anteriormente postulado y planteando una aparente especificidad del anticuerpo monoclonal, se decidió invertir el sistema de captura, es decir, emplear al anticuerpo policlonal como anticuerpo de captura y al monoclonal como anticuerpo de revelado y como sistema amplificador el conjugado antirritón-peroxidasa (Figura 34). El experimento realizado confirmó las sospechas de que la reacción detectada se llevaba a cabo con la albúmina y no existía ninguna interacción entre los dos tipos de anticuerpos.

El ensayo antes descrito se planteó como alternativa para emplearse como sistema de captura aunque promovía una muy baja sensibilidad (sensibilidad mínima de 1 µg/ml). Los ensayos efectuados con este sistema pusieron de manifiesto que el anticuerpo monoclonal y el policlonal no influyó en la sensibilidad del sistema (Figuras 35 y 36). La baja sensibilidad de la prueba se puede atribuir básicamente a:

a) Que el número de epítomos que reconoce el anticuerpo monoclonal sea limitado, y siempre menor al número de epítomos reconocido por el anticuerpo policlonal, luego entonces, al emplearse como anticuerpo de revelado el desarrollo de color se ve disminuido, afectando directamente la sensibilidad del ensayo.

b) La posibilidad de que el anticuerpo policlonal interactúe con los epítomos reconocidos por el anticuerpo monoclonal. Esto traería como consecuencia que al poner en contacto primeramente al anticuerpo policlonal con el antígeno se bloquearan parcialmente los epítomos a los cuales se une el anticuerpo monoclonal, provocando por ende una disminución en la sensibilidad del sistema.

El cambiar el tipo de anticuerpo policlonal no logró mejorar el sistema, ya que aunque se trate de un distinto antisuero (anti-exoantígenos), los problemas que trae consigo el uso en general de los anticuerpos policlonales es aplicable de manera general (Goding, 1983; Harlow, 1988).

Al no contarse con un mejor método de purificación y con los reportes de algunos autores describiendo a las columnas de inmunoafinidad como un excelente método de purificación (Harlow, 1988), se planteó un proceso de inmunoadsorción del anticuerpo monoclonal frente al anticuerpo policlonal, y usar dicho purificado inmunoadsorbido como agente promotor de la captura, los resultados mostraron una gran mejoría en la sensibilidad del ensayo aunque todavía se mantenía por debajo de lo requerido. Los ensayos realizados con este sistema mostraron que el anticuerpo monoclonal no era limitante en el sistema (Figura 39).

Harlow ha descrito el uso del sistema avidina-peroxidasa como un excelente agente amplificador (1988), con base en esto se realizó la adaptación al sistema inmunoadsorbido empleando anti-E+P biotinilado para implementar el uso de un conjugado avidina-peroxidasa. Los resultados pusieron de manifiesto que el proceso

de purificación fue incapaz de remover el 100% de biotina presente en el medio de cultivo, ya que la reacción se llevo a cabo con los restos de la biotina presente en los purificados inmunoadsorbidos (Figura 40).

La validación del Sistema de Captura se realizo con muestras referidas de la prueba de captura de anticuerpos realizada en el Departamento de Inmunoparasitología del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE). El ensayo revelo el reconocimiento del anticuerpo monoclonal con algún componente del suero (Figura 41).

La inmunoelectrotransferencia puso de manifiesto que la reacción en condiciones reductoras se lleva a cabo con diferentes bandas con pesos moleculares que van entre los 70 y los 100 kDa (Figura 44). La reacción del conjugado puede atribuirse a un fenómeno de reacción cruzada, al menos con las bandas de 24.0 y 46.3 kDa que presumiblemente son las cadenas ligeras y pesadas respectivamente de las IgG. La banda de 160 kDa puede asumirse como una banda inesperada, ya que en condiciones reductoras no es de esperarse una banda de este peso molecular ya que los enlaces disulfuro son destruidos y no permiten mostrar a los anticuerpos en una sola banda de alto peso molecular, esto se puede explicar anteponiendo que la reducción de los enlaces disulfuro no fueron eliminados en su totalidad.

9.0.- CONCLUSIONES

El Anticuerpo Monoclonal E7 puso de manifiesto que los extractos antigénicos E+P y E-S comparten una proteína de aproximadamente 30 kDa, que es un dímero conformado por dos polipéptidos uno de 20 kDa y otro de 10 kDa.

El uso de un sistema heterólogo (anticuerpo monoclonal y anticuerpo policlonal), provee un método más sensible de captura de antígenos.

El número limitante de epítomos reconocidos por el anticuerpo monoclonal E7, afecta directamente la sensibilidad del Sistema Heterólogo de captura Inmunoadsorbido.

Por su inespecificidad el anticuerpo monoclonal E7 no es candidato a usarse en la mejora del Inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana causada por el metacástodo de T.solium.

10.0.- BIBLIOGRAFIA

Akiguchi Y., Fujiwara T., Matsuyama H., Muranaka H., Kameyama M (1979) Intramedullary spinal cysticercosis. *Neurology*. 29: 1531

Allan J.C., Avila G., Garcia-Naval J., Fliesser A., Craig P.S (1990) Inmunodiagnosis of teniasis by coproantigen detection. *Parasitology*. 101:473-477

Allan J.C., Mencos F., Garcia-Naval J., Sarti E., Flisser A. Wang Y., Liu D., Craig P.S (1992) Dipsticks dot ELISA for the detection of *Taenia* coproantigens in humans. *Parasitology*. 107:79-85

Aguilera -García J, Galvan-Cervantes AD (1989). Prevalencia del *Cisticercus cellulosae* en la población porcina de la comunidad de Angahuan, municipio de Uruapan, Michoacán y anteproyecto de control. Tesis de Facultad de Veterinaria y Zootecnia. UNAM

Asada J, Otaga KH, Kaji F, Oakage K, Ochi G (1956) On the longevity and development of the pork and beef tapeworms in human host. *Tokio Iji Shinshi*. 73:153-156

Asociación Guatemalteca de Parasitología y Medicina Tropical (1989). II Simposio Internacional de Cisticercosis. I curso de Inmunodiagnostico. Veninsa. 141pp

Baranski MC., (1981) Treatment of dermal cysticercosis with praziquantel. Paper read at the workshop "Praziquantel in Human Cysticercosis," Mexico City

Berman JD., Beaver PC., Cheever AW., Quindden EA (1981) *Cysticercus* of the 60 milliliters volumen in human brain. *Am J. Med. Hyg*: 30:616-619

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Nature*. 329:21

Brandt J.R., Geerts S., De Deken R., Kumar V., Ceulemans F., Brijs L., Falla N (1992). A monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. *Int J Parasitol*. 22(4):471-477

Brooks D.A., Bradford T.M., Hopwood J.J (1992) An improved method for the purification of IgG monoclonal antibodies from culture supernatants. *Journal of Immunological Methods*. 155:129-132

Bursey C.C., Mckenzie J.A., Burt M.D.B. (1980) Polyacrilamida gel electrophoresis in differentiation of *Taenia* (Cestoda) by total protein. *International Journal for Parasitology*. 10:167-174

Cárdenas F, Cisticercosis intraocular (1989) En: Flisser A, Malagón F (eds.). *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México*. Limusa-Noriega.69-76

Cañedo L., Laclette JP., Morales E (1982) Evagination of the metacestode of *Taenia solium*. En: Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds.). *Cysticercosis: Present states Knowledge and Perspectives*. Academic Press. New York. 261-280.

Cárdenas-Ramirez L.C., Zaragoza A.M., González-Del pliego M (1982). Neural and Excretory Structures of *Cysticercus cellulosae*. En: Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds.). *Cysticercosis: Present states Knowledge and Perspectives*. Academic Press. New York.281-305

Cervantes Vázquez Mario (1985) Tesis de Diplomado. Facultad de Medicina UNAM.1-9

Chavarría CM., Díaz Gonzales D (1978) Droncit en el tratamiento de la cisticercosis porcina. *Especialidades Veterinarias*. 1:159-178

Cho SY, Kong Y, Kim SI, Kang SY (1992) Measurement of 150 kDa protein of *Taenia solium* metacestode by antibody-sandwich ELISA in cerebrospinal fluid of neurocysticercosis patients. *Kisaengchunghack Chapchi*. 30(4):299-307

Correa D (1989) Cisticercosis humana: relación inmunológica huesped-parásito. En: Flisser A, Malagón F (eds.). *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México*. Limusa-Noriega. 31-44

Correa D, Dalma D, Espinoza B, Plancarte A, Rabiela MT, Madrazo Y, Gorodesky C, Flisser A (1985) Heterogeneity of humoral immune components in human cysticercosis. *J. Parasitol*. 71:535-541

Correa D, Gorodezky C, Castro L, Rabiela MT, Flisser A (1986) Detection of MHC products on the surface of *Taenia solium*. *Rev. Lat. amer. Microbiol*. 28:363-368

Correa D, Morales Z., Medina Y., García C., Medina M.E., Mandujano A., Ortíz D., Meza A (1991). Teniasis y Cisticercosis por *Taenia solium*. Una revisión de nuevos y viejos descubrimientos. Publicación técnica del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.1-56

Correa D., Sandoval M.A., Harrison L.J.S., Parkhouse R.M.E., Plancarte A., Meza-Lucas A., Flisser A (1989). Human neurocysticercosis: comparison of enzyme

ESTA TESIS NO PUEDE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

immunoassay Techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid. Society of Tropical Medicine and Hygiene. 83:814-816

Coyle P.V., Wyatt D., McCaughey C., O'Neill H (1992). A simple standardised protocol for the production of monoclonal antibodies against viral and bacterial antigens. Journal of Immunological Methods. 153:81-84

Deplazes P., Eckert J., Pawlowsky Z.S., Machowska L., Gottstein B (1991) An enzyme linked immunosorbent assay for diagnostic detection of Taenia saginata copro-antigens in humans. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 85:391-396

De St Groth F, Sheidegger D (1980) Production of Monoclonal Antibodies: Strategy and Tactics. J Immunol. Methods. 35:1-21

Díaz-Camacho SP, Candil-Ruiz A, Uribe Beltrán M, Willms-Manning (1989) Epidemiología de taeniasis/cisticercosis en una comunidad de Sinaloa. En: A Flisser, F Malagón (eds). Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Limusa-Noriega, México DF. 243-250

Díaz J.F., Verastegui M., Gilman R.H., Tsang V.C., Pilcher J.B., Gallo C., García H.H., Torres P., Montenegro T., Miranda E (1992). Immunodiagnosis of human cysticercosis (Taenia solium): a field comparison of an antibody-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) an antigen-ELISA, and an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay in Peru. Am. J. Trop. Med. 46(5):610-615

Dixon H BF, Lipscomb FM (1961). Cysticercosis: An analysis and follow up of 450 cases. Privy Council Med. Res. Special Rep. Ser. 299:58

Dorfsman J (1963) The radiologic aspects of cerebral cysticercosis. Acta Radiol. 1:836-842

Ehlers U (1985) Das phylogenetics system der Platyhelminthes. Gustav Fisher. Verlag, Stuttgart. New York

Ehlers U (1986) Comments on a phylogenetics system of Platyhelminthes. Hidrobiologia. 132:1-12

Escobedo F (1989) Tratamiento de cisticercosis/teniasis humana En: Flisser A, Malagón F (eds.). Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Limusa-Noriega. 199-204

Escobar A., Valdespino JL., Sepúlveda (1992) Vacunas ciencia y salud. 1ra. Edición. De Secretaría de Salud. pp29-53.

Espinoza B., Ruiz-Palacios G., Tovar A., Sandoval M.A., Plancarte A., Flisser A (1986). Characterization by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of the Humoral Immune Responce in Patients with Neurocysticercosis and Application in immunodiagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 536-541

Ey P.L., Prowse S.J., Jenkin C.R (1978). Isolation of pure IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein a-sepharose. 15:429-436

Feldman M, Plancarte A, Sandoval M, Wilson M, Flisser A (1990) Comparison of Two assays (EIA and EITB) and two samples (saliva and serum) for diagnosis of neurocysticercosis. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 84:559-562

Flisser A (1988) Neurocysticercosis in Mexico. *Parasitology Today*. 4:131-137

Flisser A, (1989) Tratamiento de cisticercosis porcina con praziquantel. Flisser A, Malagon F (eds.). *Cisticercosis Humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México*. Limusa-Noriega.227-230

Flisser A (1994) Taeniasis and Cysticercosis due to Taenia solium. En: *Process of clinical Parasitology*. Tsich Sun, MD. (de.). CRC Press, Inc New York. Vol 4:77-116

Flisser A, Larralde C (1986) Cysticercosis. En: Flisser A, Willms K, Lacleite JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds.). *Cysticercosis: Present states knowledge and perspectives*. Academic Press. New York. 109-161

Flisser A, Madrazo Y, Gonzalez D, Sandoval M, Rodriguez Carbajal J, De Dios J (1988) Comparative analysis of human and porcine neurocysticercosis by computed tomography. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82:739-742

Flisser A, Perez-Monfort R, Larralde C (1979). The Immunology of human and animal cysticercosis: A review. *Bull WHO*. 57:839-856

Flisser A., Plancarte A., Correa D. (1988) Diagnóstico, Tratamiento y mecanismos de evasión inmune de la cisticercosis por larvas de Taenia solium en seres humanos y cerdos. 501-509

Flisser A, Plancarte A, Correa D, Rodriguez del Rosal E, Feeldman M, Sandoval M, Torres A, Meza A, Parkhouse RME, Harrison LJS, Wilson M, Avila G, Allan J, Craig PS, Vallejo V, Ortiz D, Garcia E, Mcmanus DP (1990) New approaches in the dianosis of Taenia solium cysticercosis and Teniasis. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 65(1):65-98

Flisser A., Reid A., Garcia Zepeda E., Mcmanus D.P. (1988) Specific detection of Taenia saginata eggs by DNA hibridization. *Lancet* ii. 1429-1430

Flisser A, Terrab B, Willms K, Larralde C (1975) Inmunoelctroforesis y diagnóstico de la cisticercosis cerebral humana. Arch. Invest. Med. México. 6:1-12

Flisser A, Willms K, Lacleite JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F (1982) Cysticercosis. Present State of Knowledge and Perspectives. Academic Press. 235-389

García H.H, Gilman R., Martínez M., Tsang V.C., Pilcher J.B., Herrera G., Díaz F., Alvarado M., Miranda E (1993). Cysticercosis as a major cause of epilepsy in Peru. The Cysticercosis Working Group in Peru (CWG), see coments. Lancet 341(8839):197-200

Gavilondo CJ (1987) Aspectos básicos y avances recientes en la tecnología de producción de anticuerpos monoclonales. Interferon y Biotecnología. 4:1.1-16

Goding J.W (1983). Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology. Academic Press. INC. 28-69

González AE, Gilman R, García HH, McDonald J, Kacena K, Tsang VCW, Pilcher JB, Suarez F, Gavidia C, Miranda E (1994) Use of sentinel pigs to monitor environmental Taenia solium contamination. Am. J. Trop. Med. Hyg. 5(16):847-850

Gonzalez AE, Cama V, Gilman RH, Tsang VCW, Pilcher JB, Chavera A, Castro M, Montenegro T, Verastegui M, Miranda E, Bazalar H (1990) Prevalence and Comparison of serologic assays, necropsy and tongue examination for the diagnosis of porcine cysticercosis in Peru. Am J. Trp. Med. Hyg. 43(2):194-199

Gorodezky C (1982) Distribución de antígenos HLA en la cisticercosis cerebral. Resúmenes del segundo congreso de la Sociedad Latinoamericana de Histocompatibilidad. Caracas, Venezuela. 21

Gorodezky C, Diaz ML, Escobar Gutierrez A, Flisser A (1987) Concentraciones de IgE en el suero sanguíneo de enfermos con neurocisticercosis. Arch Invest. Med. 18:225-229

Guerra G, Flisser A, Cañedo L, Lacleite JP (1982) Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of Taenia solium. En: Flisser A, Willms K, Lacleite JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds.). Cysticercosis: Present states Knowledge and Perspectives. Academic Press. New York. 437-452

Hammenberg B, Dnnagler C, Williams JF (1980) Taenia taeniformis: chemica composition of parasite factors affecting coagulation and complement cascades. J. Parasit. 66:569-574

Hanham AC, Shaw JJ, Lainson R, McMahon-Pratt D (1990) Production of a specific monoclonal antibodies for the identification of Leishmania (*Leishmania*) venezuelensis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 42(5):453-459

Harlow E., Lane D (1988). *Antibodies a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor. 726

Harrison L.J.S., Delgado J., Parkhouse R.M.E (1990) Differential diagnosis of Taenia saginata and Taenia solium with DNA probes. *Parasitology*. 100:459-461

Hawkes R., Nyday E., Gordon J (1982). A dot immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal Biochem*. 119:142-147

Hayunga EG, Sumner MP, Duncan JF Jr, Chakrabarti EK, Weibert DW (1992) Production of anti-idiotypic antibodies as potencial immunoreagents for the serological diagnosis of bovine cysticercosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 16:653:178-183

Hayunga EG, Sumner MP, Letonja T (1989) Evidence of selective incorporation of host immunoglobulin by strobilocerci of Taenia taeniformis. *J. Parasit.* 28:638-642

Hernandez LA., Aguilar SJ., Arredondo SA (1987) *Cisticercosis en Guatemala*. MERCK

Jung RC., Rodriguez MA., Beaver PC., Scheenthal JE., Levy RW (1981) Racemose cysticercus in human brain. A case report. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30:620-624

Kohler G., Milstein C (1975). Continuous culture of fused cells secreting antibodies of predefined specificities. *Nature* 256,495

Laclette JP (1985) *Componentes de superficie en el metacéstodo de la Taenia solium*. Tesis Doctoral. Unidad Academica de los ciclos Profesionales y de Posgrado del CCH.- UNAM. Institutot de Investigaciones Biomedicas. 126 pp

Laclette JP., Landa A., Arcos L., Willms K., Davis AE., Shoemaker CB (1991) Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (trematoda) hologue of antigen B from *Taenia solium* (cestoda). *Mol. Biochem. Parasit.* 44:287-296

Laclette JP, Merchant MT, Willms K (1987) Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of Taenia solium. *J. Parasit.* 73:121-125

Laclette JP, Ornelas Y, Merchant MT, Willms K (1982) Ultrastructure of the surrounding envelopes of Taenia solium eggs En: Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds.). *Cysticercosis: Present states Knowledge and Perspectives*. Academic Press. New York. 375-388

Laclette JP, Landa A, Arcos L, Willms K, Davis AE, Shomaker CB (1991) Paramiosyn is the Schistosoma mansoni (trematode) homologue of antigen B from Taenia solium (cestoda). Mol Biochem Parasit. 44:287-296

Laemli UK (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 22(15):680

Le Riche P.D., Sewell M.M.H (1978) Differentiation of taeniid cestodes by enzyme electrophoresis. International Journal for Parasitology. 8:479-483

Lenninger LA (1978) Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. Omega. 739-755

Li YL, Song WJ, Han JJ, Ruppel A, (1994) Detection of Schistosoma japonicum antigen (SJ 31/32) in sera of chinese patients using a sandwich ELISA based on monoclonal antibodies

Liu D., Lightowlers M.W., Rickard M.D (1992). Evaluation of a monoclonal antibody-based competition ELISA for the diagnosis of human hidatidosis. Parasitology 104(2):357-361

Lumsden RD, Voge M, Sagandares-Bernal F (1982) The metacystode tegument: fine structure, development, topochemistry, and interactions with the host. En: Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds.). Cysticercosis: Present states Knowledge and Perspectives. Academic Press. New York. 307-362

Maas M., Delgado E., Knobloch J (1991) Detection of Taenia solium antigens in merthiolate-formalin preserved stool samples. Tropical Medicine and Parasitology. 42:112-114

Manawadu B.R., Voller A (1978). Standardization of the indirect fluorescent antibody test for malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg. 72:456-462

Mason P., Houston S., Gwanzura L (1992). Neurocysticercosis: experience with diagnosis by ELISA serology and computerised tomography in Zimbabwe. Centr Afr J Med.38(4):149-154

Mac Cormick F., Zee S., Heiden J (1982) Cysticercosis cerebri: A review of 127 cases. Arch. Neurol. 39-534

Medina M.E (1992). Tesis de Licenciatura. Efectos de los productos de excreción-secreción del cisticerco de Taenia solium. México D.F. pp. 53

Medina Y., Correa B., Morales Z., Mandujano A., Medina M.E., Romero V.J (1991). Manual de Técnicas de Producción de Anticuerpos Monoclonales. Publicación técnica del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE). 45pp

Miller BL, Staugaitis SM, Tourtellote WW, Shapshak P, Goldberg M, Heiner D, Weil M (1985) Intra-blood-brain IgG synthesis in cerebral cysticercosis. Arch. Neurol. 42:782-784

Miller M.A., Leavell L.C (1979). Manual de Anatomía y Fisiología. Fournier. 261-273

Mondragón A., Plancarte A., Flisser A (1994). Diagnosis of human cysticercosis with ELISA. Salud Publica Mex. 36(4): 393-398

Monteiro L., Almeida-Pinto J., Stocker A., Sampaio-Silva M (1993). Active neurocysticercosis, parenchymal and extraparenchymal: a study of 38 patients. J Neurol. 241 (1):15-21

Morakote N., Nawacharoen W., Sukonthasun K., Thammasonthi W., Khamboonruang C (1992). Comparison of cisticercus extract, cyst fluid and Taenia saginata extract for use in ELISA for serodiagnosis of neurocysticercosis. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 23(1):77-81

Musoke AJ, Williams JF, Leid RW, Williams CS (1975) The immunological response of the rat to infection with Taenia teniformis. Immunology. 29:855-866

Nieto D (1956) Cysticercosis of the Central Nervous System: Diagnosis by means of the spinal fluid complement fixation test. Neurology. 6:725-738

Olivo A, Plancarte A, Flisser A (1988) Presence of antigen B from Taenia solium cysticercus in other platyhelminthes. Int. J. Parasit. 18:543-545

Omer Ali P, Mansour M, Woody JN, Smithers SR, Simpson AJ (1989) Antibody to carbohydrate and polipeptide epitopes on the surface of schistosomula of Schistosoma mansoni in Egyptian patients with acute and chronic schistosomiasis. Parasitology. 98:417-424

Pathak K.M., Allan J.C., Ersfeld K., Craig P.S (1994). A western blot and ELISA assay for the diagnosis of Taenia solium infection in pigs. Vet Parasitol. 53(3-4):209-217

Proaño J., Proaño J.V., Molina H., Alvarez J., Lasso J (1993) Normas técnicas, Métodos y Procedimientos para el Programa de Control y Vigilancia Epidemiológica del complejo Teniasis-Cisticercosis. Ministerio de Salud Pública. Dirección Nacional de Control

Plancarte A, Fexas M, Flisser A (1994) Reactivity in ELISA and dot blot of purified GP24, an immunodominant antigen of Taenia solium, for the diagnosis of human neurocysticercosis. *International Journal for Parasitology*. 22(3):1-6

Plancarte A, Flisser A, Larralde C (1983) Fibronectin-like-properties in antigen B from the cysticercus of Taenia solium. *Cytobios*. 36:83-93

Rabiela-Cervantes MT (1989) Patología de la neurocisticercosis benigna y grave En: Flisser A, Malagon F (eds.). *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México*. Limusa-Noriega.107-124

Rabiela MT, Rivas A, Rodriguez J, Castillo S, Cancino F (1982) Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis En: Flisser A, Willms K, Lacleite JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds.). *Cysticercosis: Present states Knowledge and Perspectives*. Academic Press. New York.179-200

Rabiela MT, Rivas A, Castillo S, Gonzalez-Angulo A (1985) Pruebas morfológicas de que Cisticercus cellulosae y Cisticercus racemosus son larvas de T.solium. *Arch. Invest. Med. (Mex)*. 16:83-86

Rabiela MT, Rivas A, Flisser A (1989) Morphological types of Taenia solium cysticercos. *Parasitology Today*. 5:357-359

Ramirez-Bon E., Merchant M.T., Gonzalez-DeI pliego M., Castañedo L (1982). Ultrastructure of the bladder wall of the metacestode of Taenia solium. En: Flisser A, Willms K, Lacleite JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds.). *Cysticercosis: Present states Knowledge and Perspectives*. Academic Press. New York. 261-280

Ramos-Kuri M., Montoya R.M., Padilla A., Govezensky T., Diaz M.L., Sciutto E., Sotelo J., Larralde C (1992). Immunodiagnosis of neurocysticercosis. Disappointing performance of serology (enzyme-linked immunosorbent assay) in an unbiased sample of neurological patients. *Arch Neurol*. 49:633-636

Rim HJ., Won RR., Chu JW (1980) Studies on the human cysticercosis and its therapeutic trial with praziquantel. *Korea University Medical Journal*. 17:459

Ritchie LS (1948) An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bulletin of the United States Army Medical Department* . 8:326

Rodriguez-Carbajal J, Boleaga-Duran B (1982) Nueroradiology of human cysticercosis En: Flisser A, Willms K, Lacleite JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds.). *Cysticercosis: Present states Knowledge and Perspectives*. Academic Press. New York. 139-162

Rodriguez C, Palacios E (1977) Radiology of cysticercosis of the Central Nervous System including computed tomography. *Radiology*. 125:127-131

Roitt I., Brostoff J., Male D (1991). *Inmunologia*. 2a Edición. Ed. Salvat. 2-512p

Saad M, Din N, Kornelis D, Van Zeyl R, Deelder AM (1994) Immunological Characterization of two monoclonal antibodies reactive with repetitive carbohydrate epitopes of circulating *Schistosoma mansoni* egg antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50(4):487-498

Sanchez M.R., Ramirez J.A. Larriva-Sahd J., Rodriguez M.H., Mancilla R., Ortiz-Ortiz L (1994) Antigen characterization of *Plasmodium vivax* with monoclonal antibodies. *American Journal of Medicine and Hygiene*. 51(1):60-67

Schantz PM, Sarti-Gutierrez E (1990) Diagnostic methods and epidemiologic surveillance of *Taenia solium* infection. *Acta Leidensia*

Schantz PM, Sarti E, Plancarte A, Wilson M, Criales JL, Roberts J, Flisser A (1994) Community-based epidemiological investigations of cysticercosis due *Taenia solium*: comparison of serological screening test and clinical findings in two populations in Mexico. *Clin. Infect. Dis.* 18(6):879-885

Schyl R, Kremmer E, Ego E, Wasilia M, Thierfelder S (1992) Determination of monoclonal antibodies specificity by immunoadsorption and western blotting. *Journal of immunological methods*. 152:59-67

Sharon J, Morrison SL, Kabat EA (1980) Formation of hibridoma clones in soft agarose. Effect of pH and medium. *Somat. cell genet.* 6:435-441

Slais J (1970). The morphology and Pathogenicity of the Bladder Worms *Cysticercus cellulosae* and *Cysticercus bovis*. *The Hague-Academia Prague*. 144

Slais J (1982). Morphology of the Scolex of *Cysticercus cellulosae* in Brain Cysticercosis. En: Flisser A, Willms K, Lacleite JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds.). *Cysticercosis: Present states Knowledge and Perspectives*. *Academis Press*. New York. 235-239

Srivastava V.K., Singhal K.C., Srivastava A., Agrawal A (1993). Praziquantel therapy in neurocysticercosis. *Indian J Physiol Pharmacol.* 37(3):194-198

Stites PD., Terr CA (1993) *Inmunologia Basica y Clínica*. Ed. Manual Moderno. 7a Edición

Stryer L (1985). *Bioquímica*. Revert'. 469-490

Tay J (1972). Estudio del M.E. del cisticerco celuloso. Rev. Lat. Am. Microbiol. 14:107-116

Tay ZN, Lara AR, Velasco CO, Gutierrez QM (1984) Parasitología Médica. De Mendéz Otero

Tellez-Giron E, Ramos M, Dufour L, Alvarez P, Montante M (1987) Detection of Cysticercus cellulosae antigens in the cerebrospinal fluid by dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) and standard ELISA. Amer. J. Trop. Med: Hyg. 37:169-173

Thomas H., Andrews P., Mehlhorn H (1981) New results on the effect of praziquantel in experimental cysticercosis. Paper read at the workshop "Praziquantel in Human Cysticercosis," Mexico City

Towbin H.T., Stachelin T., Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitricellulose sheets: procedure and applications. Proc Natl Acad Sci USA. 76:4350-4354

Tsang V, Brand J, Boyer A (1989) An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosis human cysticercosis. (Taenia solium). J. Inf. Dis. 159:50-59

Trejo V, Talamas O, Granados G, Castro L, Rabiela MT, Sotelo J, Gorodezky C (1989) What is the significance of the presence of MHC molecules on the surface of parasites in human neurocysticercosis. J. Immunogenetics. 16:427-436

Trujillo-Valdes VM (1989) Tratamiento de la cisticercosis con metronidato. En: Flisser A, Malagón F (eds.). Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Limusa-Noriega. 221-226

Uribarren T, Bucio M, Haro Y (1987) Búsqueda de forma post oncosferales de Taenia solium en carne de cerdo de rastros del Distrito Federal: hallazgos preliminares. Memorias VIII congreso FLAP. 243

Villa A.M., Monteverde D.A., Rodríguez W., Boero A., Sica R.E (1993) Neurocysticercosis in a hospital of the city of "Buenos Aires": study of 11 cases. Arq Neuropsiquiatr. 51(3):333-336

Wang C.Y., Zhang H.H., Ge L.Y (1994). A MAb-based ELISA for detecting circulating antigen in CFS of patients with neurocysticercosis. Hybridoma 1992. 11(6):825-827

Willms K, Arcos L (1977) Taenia solium: host serum proteins on the cysticercus surface identified by an ultrastructural immuno-enzyme technique. *Exp. Parasit.* 43:396-401

Wilson M., Bryan R.T., Fried J.A., Ware D.A., Schantz P.M., Pilcher J.B., Tsang V.C.W (1991). Clinical Evaluation of the cysticercosis Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer Blot in patients with neurocysticercosis. *Journal of Infectious Disease.* 164:1007-10

Wodhouse E, Flisser A, Larralde (1982) Seroepidemiology of human cysticercosis in México. En: Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds.). *Cysticercosis: Present states Knowledge and Perspectives.* Academic Press. New York. 11-24

Yeo I.S., Yong T.S., Im K (1994) Serodiagnosis of human sparganosis by a monoclonal antibody-based competition ELISA. *Yonsei Med.* 35(1):43-48

a Yong T.S., Seo J.H., Yeo I.S (1993). Serodiagnosis of human paragonimiasis by ELISA-inhibition test using monoclonal antibodies. *Korean J Parasitol.* 31(2):141-147

b Yong T.S., Yeo I.S., Seo J.H., Chang J.K., Lee J.S., Kim T.S., Jeong G.H (1993). Serodiagnosis of cysticercosis by ELISA-inhibition test using monoclonal antibodies. *Korean J Parasitol.* 31(2):149-156

Zodda DM, Phillips SM (1982) Monoclonal antibodies-mediated protection agains Schistosoma Mansoni infection in mice. *J. Immunol.* 129:2326-2328