

33
24



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**Caracterización de los Antígenos de la
Larva de *Taenia solium* Presentes en
el Suero y en el Líquido Cefalorraquideo
en Pacientes Cisticercosos**

T E S I S
Para Obtener el Título de:
Química Farmacéutica Bióloga
P r e s e n t a
OLGA MATA RUIZ

Directores de Tesis:

M. en I.B.B. María Dolores Correa Beltrán

Q. F. I. Antonio Meza Lucas

Asesor: M.V.Z. Pablo Martínez Labat

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

Septiembre de 1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

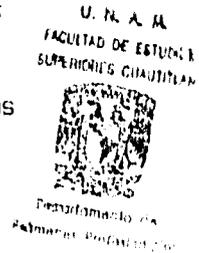
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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



REPUBLICA NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



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 la TESIS TITULADA: Caracterización de los antígenos de la larva de Taenia solium presentes en el suero y en el líquido cefalorraquídeo de pacientes cisticercosos.

que presenta la pasante: Olga Mata Ruiz
con número de cuenta: 8601595-4 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida 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"
Cuautitlan Izcalli, Edo. de Mex., a 15 de Agosto de 196

PRESIDENTE M.V.Z. Pablo Martínez Labat

VOCAL O.F.B. Gloria Ortiz Gasca

SECRETARIO O.B.P. Antonio Sánchez Ortega

PRIMER SUPLENTE O.F.B. Victor Zendejas Buitrón

SEGUNDO SUPLENTE M. en C. Susana E. Mendoza Elvira

A mis padres:

**Por su enorme sacrificio, su cariño y su interés
en la superación de sus hijos, aquí esta
la respuesta a su enorme esfuerzo.**

Los quiero mucho.

A mis hermanos:

**Irene, José Luis, Juan y Guadalupe
Por su ayuda, apoyo moral y su cariño.
Muchas gracias, los quiero.**

A mi esposo:

**Joel se que este trabajo significo gran parte de
nuestro esfuerzo y que fue pensado desde que
compartimos uno de tantos anhelos juntos en
la facultad. Gracias por tu apoyo incondicional
y tu gran amor correspondido.**

Te amo.

A mi abuelita, tíos, primos y amigos:

**Soledad, Tello, Beto ,Lupe, Martha, Margarita, Gustavo,
familia Rodríguez O. y Rodríguez M. que de alguna
manera me dieron su apoyo
Muchas gracias**

A mis compañeros de laboratorio:

**América, Yolanda, Zoila, Isabel, Raquel,
Paty, Cristina, Edith, Tere, la señora Hilda,
Fernando, Constantino, Jorge Luis y Gilberto,
que de una u otra forma participaron en una
etapa de mi formación.
Gracias por su apoyo.**

A Toño:

Por brindarme parte de su tiempo, apoyo y por hacerme ver que no se debe perder la fe.

Especialmente

A Lola:

Por brindarme su apoyo, tiempo y dedicación en la realización de este trabajo. Mil gracias por hacerme ver que las cosas no son tan fáciles, pero que se puede obtener lo mejor de ellas.

A la UNAM:

Por permitirme formar como profesionista y albergarme en sus instalaciones durante una parte de mi vida.

A mis profesores y a mis compañeros de la facultad de quienes obtuve buenas experiencias.

Al INDRE:

Por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis y la posibilidad de adquirir experiencia como profesionista.

Al Dr. Jefferson Proaño:

Por facilitarnos las muestras de suero y LCR de pacientes con cisticercosis y proveernos de los datos de historia clínica de los mismos, así como de su colaboración y experiencia en el área neurológica para realizar esta tesis.

Al Q.B.P. Fernando González, jefe del departamento de cómputo del INDRE y a Alberto C. a cargo del área de Macintosh, por su colaboración en este trabajo.

Al laboratorio de parasitología la facultad de Medicina de la UNAM y al departamento de parasitología del INDRE, por facilitarnos muestras de suero de pacientes con otras parasitosis.

Dedicada a todas las personas que piensan que la educación es parte de la superación.

RESUMEN

La cisticercosis es una enfermedad causada por el metacéstodo de *Taenia solium*, es de amplia distribución mundial, afectando principalmente a países del tercer mundo, en donde las condiciones higiénicas deficientes, favorecen la transmisión.

La neurocisticercosis humana ha sido ampliamente estudiada, uno de sus aspectos importantes es el diagnóstico, el cual se basa principalmente en la determinación de anticuerpos en muestras de suero y de LCR, con el uso de técnicas de tipo inmunoenzimático, como el ELISA y la IET; sin embargo la presencia de anticuerpos solamente nos indica que el individuo ha estado en contacto con el parásito y no siempre, que ha ocurrido una infección, es por eso que en este trabajo se pretende conocer con más certeza que es lo que ocurre con los antígenos que pudieran estar presentes en las muestras de suero y de LCR de pacientes con neurocisticercosis y la relación de dichos antígenos con el estado clínico del paciente, en cuanto a tipo y número de cisticercos (quistes o calcificaciones) y la localización de los mismos en el cerebro.

Por IET se encontró que existen 7 diferentes proteínas reconocidas como antígenos por los anticuerpos policlonales anti- EC del cisticerco de *T. solium* y que, estas son más frecuentes en muestras de LCR (37%) que de suero (6.9%) y en muestras de pacientes con quistes múltiples que en aquellos con un sólo quiste o calcificaciones, además que la presencia de los antígenos en muestras de suero y LCR de los pacientes se encontraba asociada a una localización de los cisticercos en el cerebro de tipo mixta o subaracnoidea preferentemente.

ÍNDICE

| | pág. |
|---|------|
| I. INTRODUCCIÓN. | 1 |
| 1. Antecedentes Históricos. | 1 |
| 2. Biología del parásito. | 2 |
| 2.1. Ciclo de vida. | 3 |
| 3. Definición de la Enfermedad. | 5 |
| 3.1. Sintomatología. | 5 |
| 3.2. Tratamiento | 5 |
| 3.2.1. Farmacológico | 6 |
| 3.2.2. Quirúrgico | 8 |
| 4. Epidemiología. | 8 |
| 5. Inmunología. | 12 |
| 5.1 Respuesta inmunitaria humoral | 12 |
| 5.2. Respuesta inmunitaria celular | 14 |
| 5.3. Mecanismos de evasión inmune | 14 |
| 6. Diagnóstico. | 16 |
| 6.1 Clínico | 16 |
| 6.2 De imagen | 16 |
| 6.3 Inmunológico | 18 |
| 6.3.1. Búsqueda de anticuerpos en seres humanos | 19 |
| 6.3.2. Búsqueda de antígenos en seres humanos | 22 |
| II. JUSTIFICACIÓN. | 25 |
| III. OBJETIVOS. | 26 |
| IV. HIPÓTESIS. | 26 |
| V. MATERIAL Y MÉTODOS. | 27 |
| 1.) Selección de muestras. | 28 |
| 2.) Preparación del extracto antigénico del cisticerco de <i>Taenia solium</i> . | 29 |
| 3.) Cuantificación de proteínas por el método de Bradford de <i>Taenia solium</i> | 30 |
| 4.) Producción de suero hiperinmune de conejo: anti-cisticerco | 31 |
| 5.) ELISA para anticuerpos | 33 |
| 6.) Inmunoelctrotransferencia (IET) para antígenos | 35 |
| 7.) IET descrita por Estrada y Kunh | 41 |
| VI. RESULTADOS. | 43 |
| VII. DISCUSIÓN. | 62 |
| VIII. CONCLUSIONES. | 67 |
| IX. BIBLIOGRAFÍA. | 68 |
| X. APÉNDICE DE SOLUCIONES. | 76 |
| XI. GLOSARIO DE TÉRMINOS. | 80 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|-------|---|----|
| I. | Signos y síntomas más frecuentes en la cisticercosis humana. | 6 |
| II. | Número de casos con NCC por año, notificados a la DGE, SSA. | 10 |
| III. | Determinación de anticuerpos anti-cisticerco de <i>Taenia solium</i> en seres humanos. | 20 |
| IV. | Determinación de antígenos del cisticerco de <i>Taenia solium</i> en seres humanos. | 23 |
| V. | Cuantificación de proteínas. | 31 |
| VI. | Soluciones para preparar gel separador a diferentes concentraciones de acrilamida. | 36 |
| VII. | Soluciones para preparar gel concentrador. | 36 |
| VIII. | Grupo de pacientes con quistes múltiples. | 45 |
| IX. | Grupo de pacientes con quiste único. | 45 |
| X. | Grupo de pacientes con calcificaciones. | 46 |
| XI. | Grupo de pacientes con quistes y calcificaciones. | 46 |
| XII. | Antígenos de pacientes con varias parasitosis. | 53 |
| XIII. | Antígenos del cisticerco de <i>Taenia solium</i> identificados por IET. | 56 |
| XIV. | Número de casos positivos por IET-Ag, ELISA-Ag y ELISA-Ac, de muestras de suero y LCR de pacientes con cisticercosis. | 58 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | pág |
|---|-----|
| 1. Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i> . | 3 |
| 2. Mecanismos de evasión inmune propuestos para el caso del metacéstodo de <i>Taenia solium</i> . | 15 |
| 3. Diseño experimental. | 27 |
| 4. Titulación de anticuerpos anti-EC de conejo por ELISA. | 32 |
| 5. Esquematación del orden de colocación del material para realizar la electrotransferencia. | 37 |
| 6. Técnica de inmunoelectrotransferencia. | 38 |
| 7. Determinación de Peso molecular. | 40 |
| 8. Electroforesis en geles de poli-acrilamida-SDS del EC del cisticerco en condiciones reductoras , teñido con Azul de Coomassie. | 43 |
| 9. Inmunoelectrotransferencia de EC del cisticerco de <i>T. solium</i> , revelado con suero hiperinmune de conejo, anti-cisticerco. | 44 |
| 10. Determinación de la concentración de acrilamida (11% o 9%) a usar por Inmunoelectrotransferencia en muestras de sueros corridas en condiciones reductoras y no reductoras. | 47 |
| 11. Titulación del anticuerpo policlonal, anti-EC del cisticerco por Inmunoelectrotransferencia | 48 |
| 12. Titulación del conjugado anti-conejo peroxidasa por Inmunoelectrotransferencia | 48 |
| 13. Determinación de la cantidades de proteína a usar por Inmunoelectrotransferencia, en muestras de sueros corridas en condiciones reductoras. | 49 |
| 14. Determinación de la cantidades de proteína a usar por Inmunoelectrotransferencia, en muestras de sueros corridas en condiciones no reductoras. | 49 |
| 15. Inmunoelectrotransferencia de muestras de suero de pacientes con cisticercosis, tratadas en condiciones reductoras | 50 |
| 16. Inmunoelectrotransferencia de muestras de suero de pacientes con cisticercosis tratadas en condiciones no reductoras. | 51 |
| 17. Inmunoelectrotransferencia de sueros de pacientes con deferentes parasitosis tratados en condiciones reductoras. | 52 |
| 18. Inmunoelectrotransferencia de sueros de pacientes con deferentes parasitosis tratados en condiciones no reductoras. | 52 |
| 19. Determinación de la concentración de acrilamida (11% o 9%) para realizar la Inmunoelectrotransferencia de muestras de LCR tratadas en condiciones reductoras y no reductoras. | 54 |
| 20. Inmunoelectrotransferencia de muestras de LCR de pacientes con cisticercosis tratadas en condiciones reductoras. | 54 |
| 21. Inmunoelectrotransferencia de muestras de LCR de pacientes con cisticercosis tratadas en condiciones no reductoras. | 55 |

| | |
|--|----|
| 22. Gráfica de porcentaje de muestras de suero de paciente con cisticercosis positivas a las bandas de 183, 105, 97 y 80 kDa en relación al tipo y número de cisticercos. | 56 |
| 23. Gráfica de porcentaje de muestras de suero de paciente con cisticercosis positivas a las bandas de 183, 105, 97 y 80 kDa en relación a la localización de los cisticercos en el cerebro. | 57 |
| 24. Gráfica de porcentaje de muestras de LCR de paciente con cisticercosis positivas a las bandas de 200, 190 y 50 kDa en relación al tipo y número de cisticercos. | 57 |
| 25. Gráfica de porcentaje de muestras de LCR de paciente con cisticercosis positivas a las bandas de 200, 190 y 50 kDa en relación a la localización de los cisticercos en el cerebro. | 58 |
| 26. Gráfica de porcentaje de muestras de suero de paciente con cisticercosis positivas por las técnicas de ELISA-Ac, ELISA-Ag e IET-Ag en relación al tipo y número de cisticercos. | 60 |
| 27. Gráfica de porcentaje de muestras de suero de paciente con cisticercosis positivas por las técnicas de ELISA-Ac, ELISA-Ag e IET-Ag en relación a la localización de los cisticercos en el cerebro. | 60 |
| 28. Gráfica de porcentaje de muestras de LCR de paciente con cisticercosis positivas por las técnicas de ELISA-Ac, ELISA-Ag e IET-Ag en relación al tipo y número de cisticercos. | 61 |
| 29. Gráfica de porcentaje de muestras de LCR de paciente con cisticercosis positivas por las técnicas de ELISA-Ac, ELISA-Ag e IET-Ag en relación a la localización de los cisticercos en el cerebro. | 61 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------------|--|
| APS | Persulfato de Amonio |
| ASB | Albúmina Sérica Bovina |
| Dot-ELISA | ELISA de punto o en papel |
| EC: | Extracto Crudo del cisticerco de <i>Taenia solium</i> |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| ENSE | Encuesta Seroepidemiológica Nacional |
| gp | Glicoproteína |
| HI | Hemaglutinación Indirecta |
| HPLC | High Performance Chromatography Liquid |
| IEF | Inmunolectroforesis |
| IET | Inmunolectrotransferencia |
| IDD | Inmunodifusión Doble |
| Ig G, M, A, E | Inmunoglobulinas de clase G, M, A o E |
| INDRE | Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos |
| IMSS | Instituto Mexicano del Seguro Social |
| kDa | Kilodaltones |
| LCR | Líquido Cefalorraquídeo |
| NC | Nitrocelulosa |
| NCC | Neurocisticercosis |
| PBS | Solución Buffer de Fosfatos |
| PPD | Derivado Proteico Purificado de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| PHMB | Sal sódica de p-hidroximercuribenzoato |
| PMSF | Fenil-metil-sulfonil-fluoruro |
| PZQ | Prazicuantel |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| SDS-PAGE | Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| RMN o RM | Resonancia Magnética Nuclear o Resonancia Magnética |
| TAC o TC | Tomografía Axial Computada o Tomografía Computada |
| TEMED | N, N, N, N-tetra metil etilendiamina |
| Tris-Base | Tris-hidroximetil aminometano |
| Tris-HCl | Cloruro de tris-hidroximetil aminometano |
| TLCK | N-a-p-tosil-L-lisina clorometil cetona |
| TPCK | N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona |

I. INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La cisticercosis fue descrita primero por los antiguos griegos. Fue en los tiempos de Aristóteles en los años 384-332 A. C.; en su "historia de los animales" en donde se describe por primera vez la enfermedad en cerdos; sin embargo ellos no entendieron la naturaleza de esta parasitosis. (1)

Aristófanos de Atenas sugirió que el ser humano podría ser examinado de igual forma que los cerdos, es decir forzarlo con un objeto a mantener la boca abierta y entonces sacarle la lengua para observar ampliamente y ver si se encontraba algún cisticerco en ella. Esta forma de diagnóstico para el caso de la cisticercosis porcina es utilizada hasta nuestros días. (1)

La cisticercosis en cerdos fue asociada a la teniosis humana por Van Beneden en 1853, cuando le dió huevos de *Taenia solium* a un cerdo y tiempo después encontró numerosos cisticercos en todo su cuerpo. Kuchenmeister en 1855 también asoció el desarrollo de la solitaria al del cisticerco, cuando observó en reos con cisticercosis la presencia de la forma adulta en el intestino después de la autopsia. Yoshino, en 1933, describió con gran detalle histórico el primer desarrollo de la cisticercosis en cerdos y también definió que de 1 a 5 proglótidos grávidos eran expulsados por día después de que él mismo ingirió cisticercos y siguió su propia infección durante dos años. (1)

La neurocisticercosis (NCC) humana fue reportada primero por Rumler, en 1558, el cual la describe como un tumor en la duramadre del cerebro de una persona epiléptica, seguido por Panarolus, el cual observó cisticercos similares en el cuerpo caloso del cerebro de un sacerdote y por Wharton, quién encontró gran número de cisticercos a los cuales confundió con glándulas en el tejido adiposo y muscular de soldados. La enfermedad no fue identificada como debida a una parasitosis hasta que en 1697 Malpighi descubrió la naturaleza de la cisticercosis y describió el escólex, y Goeze ignorante de estos reportes reexaminó cerdos cisticercosos y reconoció su naturaleza helmíntica. (1)

La clasificación genérica de "*Cysticercus cellulosae*" fue dada por Zeder y por Rudolphi, pero fue abolida cuando se conoció que el cisticerco era el metacéstodo de *Taenia solium*; sin embargo el término de cisticerco tipo celuloso continua siendo usado para describir al organismo de este tipo encontrado en

cerdos y en seres humanos, aunque no puede ser usado como un nombre científico. (1)

La cisticercosis en seres humanos se reconoció con menos frecuencia que la teniosis, probablemente porque la cisticercosis está asociada con una gran cantidad de síndromes que la confunde con otras enfermedades. La cisticercosis humana generó gran interés cuando un gran número de soldados británicos se estacionaron en la India durante la segunda guerra mundial y adquirieron esta enfermedad. A partir de entonces surgió un gran número de estudios que nos han permitido hasta nuestros días conocer todo lo relacionado a la infección por el cisticerco de *T. solium*. (1)

2. BIOLOGÍA DEL PARÁSITO.

El cisticerco es el metacéstodo de *Taenia solium*. Este parásito pertenece a la familia *Taenidae*, Orden *Cyclophyllidea*, Clase *Cestoda*. Se le conoce comúnmente como "solitaria" en su forma de gusano adulto y en la forma de metacéstodo en el cerdo como "cisticerco", "tomate", "grano", "granizo" o "zahuate". (2-4)

2.1. CICLO DE VIDA

Durante el desarrollo de vida, *Taenia solium* cursa 3 estados, los cuales se esquematizan en la figura 1. (2)

El ciclo se inicia con la forma adulta, a la cual se le denomina "solitaria". Este es un céstodo hermafrodita que vive por periodos prolongados (hasta 25 años) en el intestino delgado del ser humano (hospedero definitivo) y se adquiere al consumir carne de cerdo cruda o insuficientemente cocida infectada con cisticercos viables. En el estómago del hospedero, las enzimas y sales biliares del aparato digestivo inducen la activación del parásito que evagina y se ancla en la pared intestinal por medio del órgano de fijación llamado escólex, que a su vez cuenta con un ganglio nervioso y dos tipos de estructuras para fijarse al intestino que son: 4 ventosas y una doble corona de ganchos llamada rostelo. Después del escólex continúa una parte delgada denominada cuello, a partir del cual se desarrolla el estróbilo que es una región constituida por cientos de segmentos llamados proglótidos y que pueden llegar a medir hasta 9 metros para conformar

a un gusano adulto en aproximadamente 4 meses. Los proglótidos pueden ser de tres tipos: inmaduros, maduros y grávidos. Los que se encuentran más cercanos al cuello son los más jóvenes o inmaduros, continúan los maduros en donde cada segmento tiene órganos de reproducción independientes y en donde ocurre la fecundación y la producción de embriones. Los proglótidos más lejanos son los grávidos y contienen miles de huevos que son expulsados del intestino con las heces fecales, en ocasiones aun dentro de los mismos proglótidos.

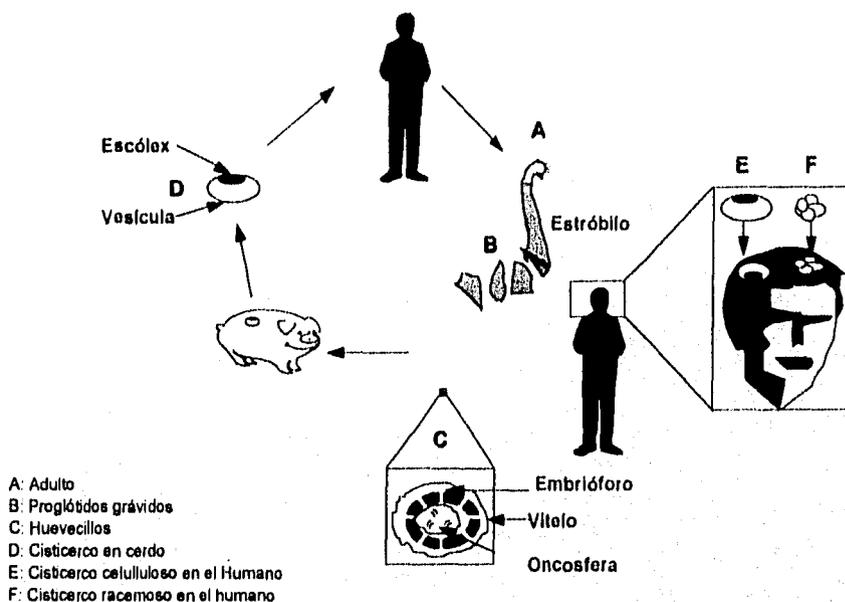


FIGURA 1 CICLO DE VIDA DE *Taenia solium*

El adulto se alimenta a través del tegumento que envuelve a los proglótidos, ya que carece de sistema digestivo desarrollado.

El ciclo continúa cuando las heces que contienen los huevos son consumidas por el cerdo, hospedero intermediario natural. Los huevos son microscópicos, miden aproximadamente 30 μm de diámetro; cuando el huevo es inmaduro está rodeado de una capa celular llamada vitelo, el cual rodea a su vez

a una estructura denominada embrióforo, que consiste en una serie de tabiques (bloques embrióforicos) que se encuentran unidos entre sí por una proteína de unión. Más adentro se encuentra la membrana oncosferal que cubre a la oncosfera o embrión hexacanto llamado así porque tiene tres pares de ganchos. Cuando los huevos entran al estómago del cerdo son activados por acción de las enzimas gástricas e intestinales, es decir por la acción enzimática se liberan los bloques embrióforicos debido a que se rompe la proteína cementante y la membrana oncosferal; de esta manera los embriones, con la ayuda de sus ganchos y de la actividad enzimática que poseen, pueden adherirse a la pared intestinal y atravesarla hasta llegar al torrente circulatorio. Aunque el mecanismo se desconoce, los embriones llegan a músculo, sistema nervioso central (SNC), tejido subcutáneo u ojo. Ya establecidos, aumentan de tamaño y se diferencian convirtiéndose en cisticercos. El cisticerco es una estructura de milímetros fácilmente visible; está compuesto de una bolsa llamada vesícula que contiene fluido vesicular y al escólex invaginado, la superficie de la pared vesicular está cubierta de unas estructuras denominadas micrótricos y es a través de esta superficie donde ocurre el intercambio metabólico e incluso inmunológico entre el hospedero y el parásito. A este cisticerco se le llama tipo celoso. En el cerdo no produce daño aparente. El ciclo se completa por el consumo de la carne de cerdo contaminada con cisticercos viables por el ser humano y se desarrolla una nueva tenia. (1-4).

El ser humano adquiere la cisticercosis cuando accidentalmente consume alimentos o agua contaminada con huevos de *Taenia solium*, dado el fecalismo al aire libre en muchas zonas, sobre todo rurales; otra posibilidad es que el individuo con teniosis se autoinfecte y así de ser hospedero definitivo también puede ser hospedero intermediario. (1-4)

Existe una variedad morfológica especial de cisticerco que sólo se ha encontrado en el encéfalo de los seres humanos y se denomina cisticerco tipo racemoso, este es un conjunto de vesículas unidas entre sí de tal forma que constituyen un quiste que semeja un racimo de uvas. (5) Analizándolo al microscopio, se descubre que no existe escólex y sólo se trata de vesículas cuyas paredes están muy desarrolladas. El cisticerco tipo racemoso parece ser una transformación del celoso, las causas de este fenómeno se desconocen, pero sólo ocurre en los que se localizan en las cavidades o el espacio subaracnoideo y se asocia a una patología y a una reacción inflamatoria más marcadas. (2-4)

Existen otras dos variedades en los seres humanos y estos son los cisticercos hialinos y los calcificados. Las causas que inducen estos procesos se desconocen; en el segundo caso se sabe que el mecanismo es similar al de la formación de los dientes. (2-4).

3. LA ENFERMEDAD

La cisticercosis humana es una enfermedad causada por el metacéstodo de *Taenia solium*, se adquiere al ingerir huevos de la forma adulta o solitaria. El metacéstodo o cisticerco se aloja principalmente en el cerebro en el ser humano causando la llamada NCC y en menor proporción, se presenta en ojo, músculo y en tejido subcutáneo, en el cual el daño depende de la zona afectada. (1-4)

3.1. SINTOMATOLOGÍA.

La cisticercosis es una enfermedad polimórfica pudiendo ser desde asintomática hasta producir cuadros neurológicos severos que pueden causar la muerte. (1-4)

La cisticercosis produce manifestaciones clínicas por diversos mecanismos de acción, los cuales dependen del número de parásitos, su localización, variedad, tamaño, viabilidad, y la relación que se establece entre el hospedero y el parásito. Estos factores y sus combinaciones son los responsables de una gran variedad de cuadros clínicos. (2-4), (6-7)

Existen diversos estudios realizados en poblaciones importantes de enfermos en los cuales se analiza la frecuencia de diversos signos y síntomas que se producen como consecuencia de esta parasitosis. La mayoría de los autores concuerdan en señalar con más frecuencia a los signos y síntomas que se resumen en la tabla I.

3.2. TRATAMIENTO

Desde hace varios años se han empleado diversos procedimientos terapéuticos en un intento de curar la cisticercosis cerebral. Se han utilizado fármacos antiparasitarios con objeto de destruir a los cisticercos; corticoesteroides para disminuir la reacción inflamatoria que se presenta en tejido cerebral o en sus

envolturas y también se ha practicado la extirpación quirúrgica de los quistes cuando están situados en una localización que lo permita y se usan técnicas de derivación del líquido cefalorraquídeo (LCR) intraventricular hacia diversas cavidades con el objeto de resolver la hidrocefalia que es frecuente en este padecimiento.

TABLA I Signos y síntomas más frecuentes en la cisticercosis humana

| SÍNTOMAS | SIGNOS |
|--------------------------|------------------------|
| Cefalea | Papiledema |
| Vómito | Atrofia óptica |
| Vértigo | Hemianopsias |
| Temblores | Diplopía |
| Convulsiones | Hemiparesia |
| Alteraciones visuales | Hemianestesia |
| Trastornos sensoriales | Ataxia |
| Trastornos motores | Dismetria |
| Trastornos cerebrales | Apraxia de la marcha |
| Debilidad muscular | Trastornos de lenguaje |
| Alucinaciones visuales | Deterioro mental |
| Pérdida súbita de fuerza | Coma |
| Rigidez de nuca | |

3.2.1. Farmacológico

Dentro del grupo de medicamentos antiparasitarios más utilizados y estudiados que se han usado para destruir al metacéstodo están la dietilcarbamazina, el metrifonato, el mebendazol, el fluobendazol y recientemente con mayor eficiencia el prazicuantel y el albendazol. Hay informes de que la dietilcarbamazina no es efectiva en el tratamiento de esta parasitosis por lo que ya no se usa. (8-9)

El metrifonato se ha empleado como antiparasitario y se han hecho estudios sobre su utilidad *in vitro* en cerdos infectados con esta larva y en pacientes con cisticercosis cerebral. En un estudio en el cual se trataron 30 casos de NCC los resultados obtenidos fueron un tanto confusos ya que en algunos casos hubo

mejoría, pero no queda claro si se debe al tratamiento o si participaron en dicho efecto algunos anticonvulsivos o analgésicos que se administraron a los pacientes en forma simultánea.(10)

El mebendazol y el fluobendazol se han empleado en el tratamiento de diversas parasitosis viscerales del humano con resultados satisfactorios y algunos estudios en cerdos han mostrado su eficacia; sin embargo en el servicio de Neurología del Hospital General del Centro Médico Nacional se usó el fluobendazol en casos de cisticercosis cerebral administrado por vía oral a dosis terapéuticas durante periodos prolongados, sin obtener resultados satisfactorios, por lo que se concluyó que en estas condiciones de trabajo no fue de utilidad el tratamiento.(11)

Desde 1980 aparecieron varias publicaciones sobre la utilidad del prazicuantel en el tratamiento de la cisticercosis subcutánea y cerebral. El prazicuantel (PZQ) es un fármaco derivado del sistema heterocíclico de la pirazinoisoquinolina que ha demostrado ser útil en el tratamiento de diversas variedades de parasitosis producidas por esquistosomas y céstodos.(3, 12-14)

Administrada por vía oral se absorbe y se metaboliza rápidamente, se excreta en forma de metabolitos, a través del riñón. Las determinaciones en el LCR indican que alcanza concentraciones equivalentes a la octava parte del nivel sérico. Las pruebas realizadas en animales de experimentación indican que es poco tóxico, que no tiene efectos teratogénicos ni produce alteraciones genéticas. En estudios con voluntarios sometidos a tratamiento con este medicamento se observó que lo toleraban adecuadamente y que sus diversas constantes biológicas permanecían estables a dosis terapéuticas.(15-16)

Algunos estudios *in vitro* revelaron que el efecto del prazicuantel sobre el metacéstodo de *Taenia solium* no interfiere de manera significativa en el consumo de oxígeno y que sí induce una evidente parálisis espástica del gusano e inhibe su capacidad de evaginación y a concentraciones altas también produce alteraciones de la membrana del tegumento (17). Dicho efecto es reversible, lo cual sugiere que este medicamento no mata al cisticerco *per se* y por lo tanto el efecto destructivo *in vivo* debe estar mediado por la respuesta inmune del hospedero; esta conclusión la apoyan estudios en donde se midió el efecto del prazicuantel sobre la cisticercosis porcina adquirida naturalmente y se encontró que se produce un aumento de los niveles de anticuerpos séricos y de la cantidad de eosinófilos y macrófagos infiltrando el tejido que rodea a los parásitos.(18-19)

Dentro de los fármacos que se utilizan para controlar la sintomatología o como paliativos se encuentran: los esteroides que se emplean para disminuir los procesos inflamatorios; los anticonvulsivantes usados para reducir las crisis en los casos con ataques de tipo epilépticos, los medicamentos comúnmente utilizados para aliviar trastornos psiquiátricos y además los analgésicos para el dolor de cabeza. El uso de este tipo de medicamentos en la NCC es continuo debido a que las lesiones que provoca un cisticerco son irreversibles. (3)

3.2.2. Quirúrgico

En la mayoría de los casos se usa cuando el paciente cursa por una hipertensión intracraneal.

Se han realizado fundamentalmente 3 tipos de intervenciones quirúrgicas: a) procedimientos derivativos de LCR que consisten en la instalación de un catéter que conecta a la circulación con una cavidad del cuerpo, que únicamente permite la salida del exceso de LCR del cráneo hacia el corazón o el peritoneo por medio de válvulas; b) craneotomía de acuerdo con la localización de los cisticercos con objeto de extraerlos y liberar el bloqueo a la circulación de LCR así como las cirugías de descompresión encefálica limitadas a extraer una porción del hueso craneal; c) craneotomía y derivación cuando se considera que la primera no es suficiente. Estos tratamientos únicamente alivian la sintomatología del cuadro de cráneo-hipertensivo y en un momento dado representan también un riesgo para el paciente, debido a que con frecuencia las válvulas se obstruyen y en poco tiempo el sujeto vuelve a requerir la instalación de una nueva.(2, 4)

A pesar de los avances terapéuticos que existen, no hay método único que permita curar en forma integral esta enfermedad. Habrá casos en que el tratamiento con prazicuantel o albendazol tenga efecto, pero habrá otros en los que será necesario usar otros procedimientos paliativos y algunos pacientes podrán mejorar individualizando su problema con el procedimiento terapéutico más conveniente.(1, 3)

4. EPIDEMIOLOGÍA

La NCC es una enfermedad propia de los países subdesarrollados y está comúnmente asociada con pobreza e ignorancia.(20) Afecta a países como la

India en donde es endémica, así como a países de Europa Oriental y de América Latina. Sin embargo, no deja de afectar a países desarrollados como Estados Unidos de Norteamérica y Europa Occidental, en donde su ocurrencia es esporádica o local, debido principalmente a inmigrantes. (3)

En México existen diferentes regiones donde las condiciones socioeconómicas, biológicas y culturales propician la transmisión de la enfermedad y en ellas se han estudiado frecuentemente factores de riesgo como son: edad, sexo, zona geográfica, extensión de la porcicultura, consumo de carne de cerdo, ausencia de baños o letrinas, fecalismo al aire libre en medio rural y urbano, hacinamiento en vivienda, insuficiente inspección sanitaria e insalubridad ambiental y conductual.

La cisticercosis es una zoonosis que representa un problema de salud pública, debido a que ocasiona grandes daños a la salud humana y sobre todo porque afecta a individuos en edad económicamente activa, lo que trae consigo su incapacidad para trabajar y desarrollar actividades normales y productivas, lo que a su vez tiene consecuencias económicas para la familia y la sociedad, ya que representa importantes pérdidas en horas/hombre (21). Además en el caso de la cisticercosis porcina ocurren pérdidas cuantiosas en la porcicultura (22-23), ya que la inspección en cerdos se hace post-mortem, y si se encuentra un cisticercosoma la carne se pierde porque se decomisa e incinera. (24)

El inicio de los estudios epidemiológicos en México se realiza con base en el análisis de necropsias en diferentes hospitales de la ciudad de México como son el Hospital General (25-27), el Hospital de Nutrición de la Secretaría de Salud (28), y en Centro Médico Nacional del IMSS (29-31). Los estudios fueron realizados en pacientes que fallecieron por cualquier causa y sin ninguna selección, en la mayoría de los casos la frecuencia de cisticercosis cerebral en material de autopsias oscila alrededor de un 3%. (25-31) Cuando se analiza la frecuencia de este padecimiento como causa de muerte en material de autopsia se encuentra una frecuencia del 1%. (3, 31-32)

A partir de 1979 la cisticercosis se convirtió en una enfermedad de notificación obligatoria (33), lo cual ha permitido que se determine con mayor frecuencia y que el número de casos de pacientes cisticercosos sea más real. Los casos de cisticercosis son reportados a la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud (DGE, SSa) y se tienen registrados desde 1975 como se ilustra en la tabla II. (tomado de Sarti E., 1989)

En lo que se refiere a estudios seroepidemiológicos de cisticercosis realizados en México, el primero de ellos se realizó con muestras de suero del Estado de Oaxaca, utilizando para ello la prueba de hemaglutinación pasiva (HP) y se encontró que el 3.2% de los individuos presentaba anticuerpos anti-cisticercos. (34)

TABLA II
No. de casos con NCC por año notificados a la DGE, SSA.

| Año | No. de casos |
|------|--------------|
| 1975 | 8 |
| 1976 | 7 |
| 1977 | 4 |
| 1978 | 9 |
| 1979 | 33 |
| 1980 | 15 |
| 1981 | 3 |
| 1982 | 13 |
| 1983 | 22 |
| 1984 | 96 |
| 1985 | 189 |
| 1986 | 236 |
| 1987 | 356 |
| 1988 | 447 |

En 1976 el Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste, en San Cristóbal de las Casas, Chiapas, encontró que la prevalencia de serología positiva era más alta en los asentamientos más pequeños (8%) que en los más populosos (2 %), lo cual explica el ciclo rural de transmisión que mantiene a la endemia, datos que coinciden con los hallazgos de Flisser A. (35), quien encontró en el mismo estado una seropositividad entre 0.4 y 7.6%. Con el uso de la Inmunoelectroforesis (IEF) (36) analizando 3000 sueros provenientes de Chiapas observó que en poblaciones mas pequeñas había mayor frecuencia de individuos con anticuerpos que en localidades grandes. Posteriormente Flisser y col. utilizando la IEF realizaron el análisis de una encuesta seroepidemiológica nacional elaborada por el IMSS en 1974 y empleando para ello 20,000 sueros

encontraron una seropositividad del 1%; siendo la zona del bajo con un 5%, la de mayor prevalencia de anticuerpos anti-cisticerco (37). Entre 1987 y 1988 se llevo a cabo la Encuesta Nacional Seroepidemiológica (ENSE) con 66,754 sueros, muestra representativa de todas las entidades federativas del país de todos los estratos socioeconómicos y de asentamientos rurales y urbanos. La seroprevalencia global usando la técnica de Hemaglutinación Indirecta (HI) fue del 1.2%, con grandes y significativas diferencias entre estados que varían de 0.06 % a 2.97 %. (38)

Además de la seroprevalencia también se han estudiado aspectos de orden biológico, geográfico, social, económico, cultural y educativo que se asocian como factores de riesgo para adquirir la cisticercosis o para ser seropositivos a anticuerpos anti-cisticerco. En 1984 en El Sótano, Hidalgo se hizo una encuesta para investigar antecedentes de teniosis y padecimientos neurológicos compatibles con NCC. Además se realizó determinación de anticuerpos anti-cisticerco por ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), análisis coproparasitológicos y palpación de lengua en cerdos para la búsqueda de cisticercos. Los resultados mostraron una seropositividad del 3.4% y se observó que en las familias donde había una persona seropositiva había un portador de tenia ó alguien con sintomatología sugerente de NCC.(39). En El Salado, Sinaloa se determinó la presencia de huevos de *Taenia* spp por el método coproparasitológico de Faust y la presencia de anticuerpos por ELISA; se encontraron huevos en el 3.3% de las muestras procesadas y la seropositividad del ELISA para anticuerpos fue del 11% y en este caso también se encontró que el vivir con un individuo con tenia es riesgo para tener anticuerpos anti-cisticerco.(40) En La Curva, Navolato, Sinaloa también se determinó la presencia de huevos de *Taenia* spp y la presencia de anticuerpos por ELISA, y a los positivos se les dió tratamiento con prazicuantel. Los resultados muestran que en el 1.2% se encontraron huevos de *Taenia* spp. y en el 11% anticuerpos anti-cisticerco para la población en general y cuando se analiza únicamente a los convivientes de los portadores se observa una seropositividad del 28%; así mismo la seropositividad aumenta con la edad. (41-42). En otro estudio que se hizo en Angahuan, Michoacán reveló a través de un cuestionario de encuesta y la determinación de anticuerpos por Inmunoelctrotransferencia (IET) una seropositividad del 4.9% y que dicha seropositividad se incrementaba con la edad y que el grupo de entre 46 y 55 años fué el de mayor seropositividad. Otro estudio realizado en Los Sauces, Guerrero reportó un 2.7% de individuos seropositivos

por ELISA. De estos dos últimos estudios se concluyó que existen varios factores ambientales y del comportamiento humano que favorecen la transmisión del complejo teniosis/cisticercosis (36). En otro estudio epidemiológico realizado en Xoxocolla, Morelos se encontró el 11% de seroprevalencia por IET (43) y menos del 1% tuvieron huevos de *Taenia sp* en sus heces y el 1% habían reportado historia clínica de convulsiones. Además se determinó cisticercosis en el 5.2% de 534 cerdos revisados por palpación de lengua, también se demostraron factores de riesgo para cisticercosis en casos confirmados por tomografía axial computada (TAC), los cuales fueron el consumo de agua no hervida y tener malos hábitos de higiene. (44). Por último el estudio realizado en la localidad de Cerritos, San Luis Potosí se determinaron antígenos del cisticerco de *Taenia solium* y anticuerpos por medio de ELISA y su asociación con factores de riesgo. La seroprevalencia obtenida en este caso fue del 4.8% para anticuerpos, los factores asociados son principalmente el analfabetismo, el padecer alteraciones nerviosas, la práctica de fecalismo al aire libre, el vivir en condiciones precarias, el vivir en comunidades rurales y la crianza de cerdos en el hogar. (45). La prevalencia para antígenos fue del 1% y el factor de riesgo asociado fue la presencia de crisis convulsivas. (46) En este estudio se confirma una vez más que los factores conductuales y de subdesarrollo favorecen la transmisión en población abierta y además que la cisticercosis es una enfermedad subestimada, ya que el porcentaje de personas con anticuerpos es mayor de lo esperado y existe la presencia de antígenos circulantes en la población citada. (45-46)

Por otra parte en lo que se refiere a la cisticercosis porcina las cifras oficiales indican que en México entre 1980-1981 la frecuencia era de un promedio de 1.5 %, con un rango de 0 a 10 %. (47)

5. INMUNOLOGÍA

El desarrollo de métodos inmunológicos nos ha permitido conocer los componentes del parásito y del hospedero que participan en la respuesta inmune tanto celular como humoral, siendo ésta última de la que más se conoce por la facilidad que tienen las técnicas para detectar anticuerpos en muestras de suero y LCR de pacientes con cisticercosis.

5.1. RESPUESTA INMUNITARIA HUMORAL

La respuesta inmune humoral se ha estudiado en población diagnosticada clínicamente con cisticercosis, usando para ello en algunos casos muestras de suero, en otros casos LCR o ambos tipos de muestras. Se sabe que en suero y en LCR existen anticuerpos específicos de casi todas las clases de inmunoglobulinas (48). Los anticuerpos que con mayor frecuencia se han detectado en la cisticercosis humana son de tipo IgG tanto en muestras de suero como de LCR y en algunas ocasiones se ha visto que hay más niveles de anticuerpos IgG en el suero que en el LCR del mismo paciente (49-50); sin embargo existen casos contrarios (43, 48, 50), pero la presencia de IgG sugiere que la respuesta inmune es secundaria y apoya la observación de que la enfermedad es crónica. (1, 51) Los anticuerpos de tipo IgM se han identificado en pocos estudios y se sabe que es menos frecuente encontrarlos en LCR que en suero y en caso contrario su presencia en LCR se asocia a daño en la barrera hematoencefálica. Algunos estudios sugieren que los anticuerpos específicos de tipo IgE aunque existen en enfermedades helmínticas no son producidos en forma importante en la cisticercosis. (48) Los anticuerpos IgA se han reportado en pocos casos en suero y en LCR. (48, 52)

El hecho de que las inmunoglobulinas de tipo IgG sean detectadas con más frecuencia en muestras de LCR (90%) que en suero (85%), sugiere que existe una respuesta inmune en el SNC y que el sistema inmunológico del cerebro reacciona con antígenos del cisticerco, ya que se ha demostrado que en la NCC hay síntesis local de anticuerpos específicos de tipo IgG. Pero los epítomos antigénicos que este tipo de inmunoglobulinas reconoce y su relativa concentración en suero y LCR no se conocen. (51, 53-55) Miller y col. proveen datos de la síntesis de anticuerpos específicos IgG, intra-barrera hematoencefálica en cinco de seis pacientes con NCC (53) y Estañol y col. apoyan esta idea, debido a que encuentran un aumento en el nivel de anticuerpos en LCR pero no en suero después de aplicar tratamiento con praziquantel a pacientes con cisticercosis cerebral parenquimatosa. (51)

La presencia de anticuerpos IgG en el LCR muestra una correlación significativa con las características del parásito: sólo el 28% de los casos con lesión única fueron positivos mientras que el 94% de los pacientes con dos o más cisticercos morfológicamente viables, tenían anticuerpos IgG. (56) y que la

ausencia de anticuerpos de clase IgG, en varios de los pacientes con cisticercos calcificados se explica porque el parásito muerto no es antigénico. (48) En aquellos pacientes que tienen cisticercos calcificados con una respuesta inmune persistente, la presencia de anticuerpos se debe a una respuesta de memoria o a que además de cisticercos calcificados probablemente también tiene quistes viables localizados en zonas no detectables. En contraste, los pacientes con cisticercos viables generalmente tienen anticuerpos IgG anti-cisticercos detectables, indicando que el parásito está vivo y hay estímulo de la respuesta inmune del hospedero. (51)

También se han encontrado diversas clases de inmunoglobulinas y C3b, el tercer componente del complemento, en la superficie de cisticercos, sin que exista una correlación con el grado de daño al tegumento. (57)

5.2. RESPUESTA INMUNITARIA CELULAR

Realmente se cuenta con pocos conocimientos acerca de la respuesta inmunitaria celular en la NCC humana. En un estudio de unos cuantos pacientes con NCC se midió la respuesta celular *in vivo*, mediante la respuesta cutánea al derivado proteico purificado de *Mycobacterium tuberculosis* (PPD). Se encontró que los pacientes cisticercosos presentaron una baja respuesta celular (5%) en comparación al grupo de los sujetos sanos (50%), de quienes se conoce que la respuesta es más o menos similar a la reportada en este caso para una población sana de mexicanos. También a los mismos pacientes se les realizó el análisis de transformación blastoide de linfocitos en respuesta a tres mitógenos: fitohemaglutinina, concanavalina A y fitolaca americana, encontrándose una respuesta muy pobre en los pacientes enfermos en relación con los sanos. Estos estudios han llevado a pensar que los parásitos pueden inmunosuprimir a su hospedero para establecerse y permanecer viables. (2, 58)

En cuanto al procesamiento y la presentación de antígenos, se han realizado estudios con macrófagos *in vitro*. Los resultados que se obtuvieron señalan que hay 13 antígenos que son escogidos de un mosaico de 40 y que de estas 13 bandas proteicas observadas por IET, 12 corresponden a moléculas que son procesadas en unos cuantos minutos por las células, mientras que un antígeno de aproximadamente 70 kDa no es procesado. (2, 59)

5.3. MECANISMOS DE EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA

En la cisticercosis como en otras parasitosis, los cisticercos sobreviven a pesar de que el hospedero se encuentra en condiciones inmunológicas adecuadas para eliminar su presencia. Esto se explica porque existen mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria en el parásito que permiten su supervivencia en el hospedero, como se ilustra en la figura 2.

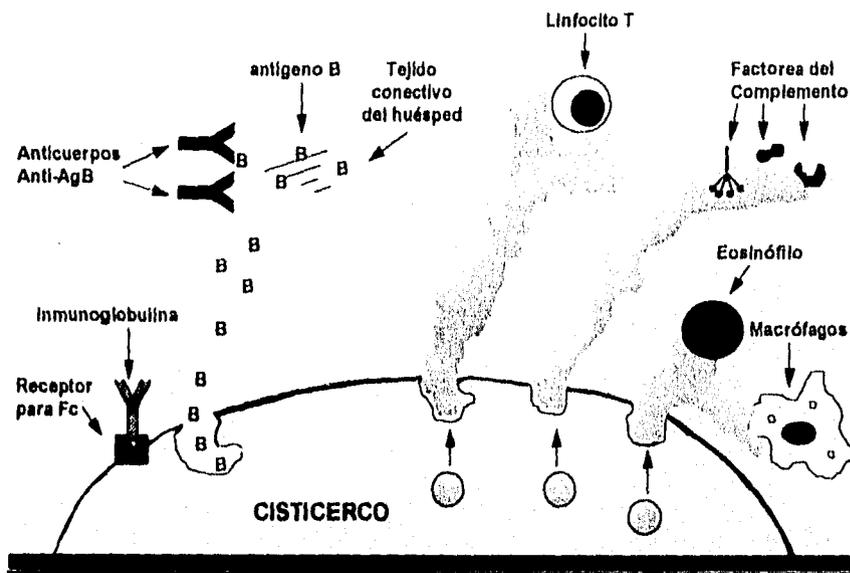


Figura 2. Mecanismos de evasión inmune propuestos para el caso del metacéstodo de *Taenia solium*. Tomado de la referencia (2)

Dentro de los mecanismos de evasión inmune en la cisticercosis están: 1) La denominada "cortina de humo" que consiste en el hecho de que el antígeno "B" el cual es una molécula compuesta de dos subunidades proteicas inmunológicamente idénticas con peso molecular de 105 y 95 kDa con un punto isoeléctrico entre 5.0 y 5.3, es el único antígeno caracterizado y del cual se sabe que se producen anticuerpos en el 85% de pacientes con NCC. (60) tiene algunas propiedades de las fibronectinas, entre las cuales se encuentra la afinidad por

colágena, es una proteína de secreción y un muy buen inmunógeno, por lo cual los anticuerpos específicos contra él no tienen efecto sobre el parásito, pues reaccionan con un producto externo que probablemente está unido al tejido conectivo del hospedero; (61) 2) La presencia de un receptor para Fc de inmunoglobulinas, presentes en la superficie de los cisticercos tanto en seres humanos como en cerdos; (62) 3) La producción de sustancias que inactiven el complemento. Existe evidencia que sugiere que los cisticercos de *T. solium* son susceptibles al ataque del complemento *in vitro* (63); por ello se ha investigado la presencia de componentes anti-complemento en el parásito; por un lado, se sabe que el antígeno B se une a la parte colagénica del C1q y así inhibe la vía clásica del complemento (59); por otro lado, también se ha observado que el extracto del parásito exento de antígeno B (por eliminación específica) inhibe la fijación de complemento *in vitro*, por lo que se sugiere que existen por lo menos 2 sustancias involucradas en este fenómeno; y 4) La presencia de algún producto del parásito que dañe a macrófagos y a eosinófilos puesto que éstos son los componentes del hospedero que participan en la destrucción del parásito cuando por tiempo o por tratamiento, se rompe el equilibrio hospedero parásito.(64-65) (2).

6. DIAGNÓSTICO

Debido a que la cisticercosis es una enfermedad con múltiples manifestaciones y que en muchas ocasiones se confunde con signos y síntomas de otras enfermedades y que es de efecto irreversible una vez que se ha dañado al SNC; la labor de diagnóstico resulta de gran interés en el sentido de que un diagnóstico certero ayuda al médico tratante para manejar su enfermedad lo más convenientemente posible y disminuyendo las complicaciones.

Los métodos que se utilizan para establecer el diagnóstico de la cisticercosis cerebral son:

6.1. CLÍNICO

El diagnóstico clínico lo realiza el médico, éste consiste en una entrevista con el paciente en la cual a base de signos y síntomas se obtiene información valiosa sugerente del cuadro neurológico probable de NCC.

Este diagnóstico va acompañado de varios estudios de gabinete para corroborar dicho padecimiento.

6.2. DE IMAGEN

En un principio los métodos imagenológicos que se utilizaban eran las radiografías simples es decir los rayos X o con medios de contraste, que son las llamadas neumoencefalografías y ventriculografías, las cuales únicamente ayudan a definir una hidrocefalia, desplazamiento del sistema ventricular, pero no permiten observar quistes intraventriculares o subaracnoideos. Actualmente han caído en desuso y se han sustituido por otros procedimientos más ágiles, menos agresivos y que brindan más información como son la tomografía computada (TC) y la resonancia magnética (RM).

La tomografía computada es un método diagnóstico que tiene la capacidad de diferenciar lesiones de diversas densidades y cuantificar el coeficiente de absorción de diversos tejidos de tal forma que en la cisticercosis cerebral el procedimiento sea extremadamente útil para establecer el diagnóstico. Las modificaciones que se pueden observar en el cerebro son:

- a) Quistes parasitarios y localización en algunos casos.
- b) Granulomas en varios estados de evolución.
- c) Calcificaciones con diversas características.
- d) Cambios en el tamaño y morfología de las cavidades ventriculares.
- e) Edema alrededor de los quistes.
- f) Infarto cerebral.
- g) Combinación de las lesiones anteriores.
- h) Evolución de las lesiones en estudios secuenciales.

La TC tiene la ventaja de ocasionar pocas molestias sin agresión y de hacer estudios repetitivos sin que represente un riesgo para el paciente.(2,3), Además tiene una sensibilidad muy alta en la localización de quistes subaracnoideos y parenquimatosos. Para el caso de la cisticercosis quística intraventricular el diagnóstico se puede hacer por este medio añadiendo además, medios de contraste inoculados en el LCR y su eficiencia es tan alta que en ocasiones se alcanza a observar la imagen del escólex del parásito. (2)

En la actualidad este es el procedimiento imagenológico de elección en los hospitales, sin embargo tiene la desventaja de que sólo se hace en hospitales de

tercer nivel, ya que el aparato para realizarlo, el material utilizado, el entrenamiento del personal especializado, y la experiencia necesaria para su interpretación lo convierten en una técnica sumamente costosa y fuera del alcance de muchos hospitales. (2)

Otra de las técnicas de diagnóstico para estos casos y que recientemente se ha empezado a utilizar es la Resonancia Magnética Nuclear (RMN). La RMN presenta una resolución mucho mayor que cualquier otra técnica, ya que proporciona una imagen compatible a un corte anatomopatológico, con lo que con mucha precisión se puede localizar una lesión y determinar su etiología; sin embargo este método diagnóstico es todavía más costoso que la TC y por consiguiente menos accesible para la mayoría de la población. (2)

Tanto al RMN como la TC son métodos que presentan sensibilidad y especificidad por arriba del 95%. (2)

6.3. INMUNOLÓGICO.

El diagnóstico inmunológico para la cisticercosis se hace por medio de diferentes técnicas, entre las que se incluyen: la fijación de complemento (probada desde 1956), las pruebas de precipitación en capilar, la hemaglutinación indirecta, la floculación, la inmunoelectroforesis, la inmunodifusión doble, la inmunofluorescencia indirecta y el radioinmunoensayo, y más recientemente los ensayos inmunoenzimáticos como; el ELISA, el ELISA de punto (Dot-ELISA) y la IET. Con estas pruebas se puede demostrar la presencia de antígenos o anticuerpos presentes en suero o LCR.

Sin embargo no existe un método inmunológico infalible ya que no todas las pruebas tienen una sensibilidad y especificidad del 100 %. Se reporta entre un 70 y un 100 %. El resultado depende de varios factores como son: el grado de pureza del antígeno, el estado clínico del paciente, la presencia de calcificaciones del cisticerco, el número de quistes y la localización de los mismos. Es por eso que en la clínica las técnicas inmunológicas son usadas junto con las imagenológicas para obtener un diagnóstico más certero. (1-3, 5)

Las técnicas que en la actualidad se emplean para diagnóstico de cisticercosis con mayor frecuencia, porque cuentan con una sensibilidad mayor a la reportada con los métodos de las décadas pasadas, son el ELISA y la IET principalmente, y no sólo son aplicables para usarse como pruebas de

diagnóstico sino también como herramientas para estudios a nivel de investigación epidemiológica. (66)

En el ELISA el antígeno ó el anticuerpo se adsorben a una fase sólida (microplacas de poliestireno o membranas de nitrocelulosa) y posteriormente con la adición de la muestra de algún fluido orgánico ocurre la reacción antígeno-anticuerpo que posteriormente es evidenciada con el uso de un anticuerpo conjugado a una enzima, la cual es capaz de reaccionar con su correspondiente sustrato para formar un producto colorido que es visible y puede ser cuantificado en un espectrofotómetro especialmente diseñado para esto (lector de ELISA).

Existen diversas variantes del ELISA como son los métodos directos, los indirectos, los de captura y los competitivos. Ambos permiten la determinación de antígenos en fluidos orgánicos, a excepción del método indirecto con el que se detectan anticuerpos. (66)

La IET combina el poder resolutivo de la electroforesis con la alta sensibilidad y especificidad del ELISA. La IET es una unión sinérgica de tres técnicas independientes de alto poder, en donde mezclas complejas de moléculas biológicas son separadas primero por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), posteriormente son electroforéticamente transferidas a una fase o matriz sólida (la más usada es la nitrocelulosa) y finalmente las moléculas son visualizadas directa o indirectamente con anticuerpos marcados con enzimas por una inmunodetección enzimática ó con anticuerpos marcados con isótopos radioactivos y autoradiografía. Las variaciones con las tres técnicas básicas son numerosas; sin embargo los resultados finales generalmente son buenos en términos de resolución, sensibilidad y especificidad. (67)

Con el objetivo de establecer métodos inmunológicos de gran eficiencia que faciliten el diagnóstico de la NCC se ha realizado una gran variedad de estudios. Por un lado tenemos aquellos que determinan anticuerpos y por otro lado los que detectan antígenos en muestras de suero y/o LCR (tablas III y IV, respectivamente).

6.3.1. Búsqueda de anticuerpos en seres humanos.

La determinación de anticuerpos ha sido la estrategia más usada para el apoyo al diagnóstico de la cisticercosis; una de sus limitantes, sin embargo, es que la identificación de anticuerpos contra el cisticerco de *Taenia solium* en

sangre o en LCR no indica necesariamente la presencia del parásito y en la mayoría de los casos los niveles de anticuerpos no correlacionan con la carga parasitaria o la localización anatómica de los mismos; sin embargo, las técnicas son fáciles, no muy caras y buenas en términos de sensibilidad. (2)

Analizando la tabla III en términos de sensibilidad y especificidad podemos ver que la técnica de Dot-ELISA que utiliza como antígeno a la gP24 alcanza un 100% de sensibilidad y especificidad en muestras de suero y LCR, sin embargo hay que hacer la aclaración de que esta técnica generalmente no alcanza estos grados de especificidad y sensibilidad, pero en este caso se obtiene porque en el estudio se trabajaron muestras de casos confirmados que previamente habían sido positivas a la gP24, una glicoproteína inmunodominante descrita por Tsang en la técnica de IET (43,68) y además de que el tamaño de muestra fue muy pequeño (N= 13) y cuando se aumenta el tamaño de muestra en cualquier estudio los resultados de especificidad y sensibilidad varían, alejándose del 100%.

El ELISA es el método más usado para estos fines, la sensibilidad varía dependiendo del antígeno que se utilice. Cuando se usa EC la sensibilidad es del 65 al 87% y la especificidad es del 68% al 100% en muestras de suero, en LCR la sensibilidad es de 62 a 90% y la especificidad del 100% (48, 69). Si el antígeno es el Fluido vesicular del cisticerco la sensibilidad es del 86% en ambas muestras y la especificidad del 94% en suero (70), si se trata del SPA se reporta el 91% de sensibilidad y el 100% de especificidad en suero. (71) Utilizando antígenos más puros como el AgB con el cual la sensibilidad es del 80% y la especificidad del 96% en suero, y en LCR de 90% y 98% respectivamente (48), los resultados son mejores. Otro de ellos es un antígeno purificado con anticuerpos monoclonales contra el escólex del cisticerco de *Taenia solium* (SPA 80, SPA 10a y APS 10b) con resultados la sensibilidad y la especificidad del 100% en suero (71), y si el antígeno es la gP24 mencionado con anterioridad la sensibilidad y especificidad son del 100% en muestras de suero y LCR (68).

La IET en la que se utiliza como antígeno una fracción purificada del EC del cisticerco de *T. solium* que corresponde a 7 glicoproteínas de peso molecular de 50, 42, 24, 21, 18, 14 y 13 kDa es la que ha logrado resultados más favorables alcanzando una sensibilidad de 94-97% y una especificidad del 100% en suero mientras que en LCR la sensibilidad es de 86-100% y la especificidad es del 100%. (43) En todos los casos la especificidad fue determinada en muestras de personas sanas o con otras enfermedades neurológicas.

TABLA-III Determinación de anticuerpos anti-cisticerco de *Taenia solium* en seres humanos

| Autor y Fecha | Técnica | Antígeno | Porcentaje de sensibilidad (N) | | Porcentaje de especificidad (N) | |
|------------------------------|---------|---------------------------------|--------------------------------|-----------|---------------------------------|------------|
| | | | Suero | LCR | Suero | LCR |
| Espinoza y col., 1986 (72) | ELISA | EC | 85% (61) | 90% (82) | 100% (76) | 100% (70) |
| | | AgB | 80% (61) | 90% (82) | 96% (76) | 98% (70) |
| Corona y col. 1986 (69) | ELISA | EC | 87% (51) | 87% (51) | 90% (111) | 100% (20) |
| Nascimento y col., 1987 (71) | ELISA | SPA | 91% (22) | | 100% (24) | |
| | | SPA-Mono.** | 100% (22) | | 100% (24) | |
| Tsang y col., 1989(43) | IET | gp's purificadas *** | 97% (111) | 100% (37) | 100% (45) | 100% (9) |
| Zini y col., 1990 (70) | ELISA | Fluido Vesicular del Cisticerco | 86% (100) | 88% (100) | 94% (200) | NO REPORTA |
| Plancarte y col., 1994 (68) | ELISA* | gP24 | 100% (13) | 100% (13) | 100% (3) | 100% (3) |
| | Dot- | gP24 | 100% (13) | 100% (13) | 100% (3) | 100% (3) |
| | ELISA* | | | | | |

* Casos confirmados.

SPA: Antígeno de escólex del cisticerco de *Taenia solium*.

** Ag purificado por monoclonales SPA 80, SPA 10a o SPA 10b.

AgB: Antígeno B.

EC: Extracto crudo del cisticerco de *Taenia solium*.

*** Glicoproteínas purificadas de un extracto del cisticerco de *T. solium* que en el diagnóstico por IET identifican anticuerpos que reconocen a la gp50, gp42, gp24, gp21, gp18, gp14 y gp13.

De los resultados que se obtuvieron en dichos estudios se puede señalar que la cisticercosis es una enfermedad heterogénea y compleja en la que no existe ninguna relación entre los niveles de anticuerpos y el número de cisticercos, así como tampoco se observó una relación entre los niveles de anticuerpos y la observación de imagen del cerebro (quistes o calcificaciones), pero si el hecho de que los pacientes con una sola lesión o calcificaciones presentaron menos anticuerpos detectables. (69-71)

Es importante considerar que en cualquier estudio en el que se evalúan muestras de pacientes con alguna parasitosis, se analice también el efecto de las reacciones cruzadas entre antígenos de parásitos ya que se puede conducir a conclusiones erróneas respecto a la especificidad de algún antígeno del parásito en estudio, cuando se analizan datos de pruebas inmunológicas realizadas en poblaciones potencialmente multiparasitadas como la nuestra. Se sabe que existen reacciones cruzadas principalmente entre extractos de parásitos cercanos en la escala filogenética. (72-73) Por ejemplo en uno de los estudios por inmunodifusión doble (IDD) e IEF utilizando como antígenos extractos de diferentes parásitos, y como anticuerpos sueros hiperinmunes de éstos antígenos y sueros de enfermos con NCC. Se enfrentaron antígenos de diferentes parásitos con anlisueros homólogos y heterólogos, los resultados muestran mayor número de reacción cruzada entre organismos con relaciones filogenéticas más cercanas. En el suero de pacientes con cisticercosis hubo reacción contra extractos antigénicos de *T. saginata* (86%), *Ascaris lumbricoides* (31%) y *Faciola hepática* (21%). La explicación posible a esto es que para *A. lumbricoides* el porcentaje encontrado coincide con la frecuencia de dicha parasitosis en México, por lo que los pacientes también sufrieron de ascariosis. Para *F. hepática* que, puede deberse a que existen moléculas similares desde el punto de vista antigénico, ya que está más cerca en la escala filogenética a *T. solium* que a *Ascañs*, y a que ambos son parásitos tisulares extracelulares del ser humano, y para *T. saginata* la explicación es que hay reacción cruzada entre *T. solium* en alto porcentaje debido a que ambos son cestodos. (72-73)

Evaluando por IET antígenos del fluido vesicular del cisticerco de *Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* y *Taenia crassiceps* se ha observado la reactividad de estos con sueros de pacientes con cisticercosis, hidatidosis y personas asintomáticas. Los resultados indican que hay reacción con los sueros de pacientes con cisticercosis e hidatidosis en los tres antígenos usados. (74) Por otro lado también se observó reacción cruzada en sueros de pacientes con *Echinococcus multilocularis* y *Echinococcus granulosus* por ELISA y por IET Además ya se sabía que el antígeno B del cisticerco de *T. solium* reacciona en forma cruzada con *E. granulosus*. (75)

6.3.2. Búsqueda de antígenos de cisticercos en seres humanos.

Este tipo de estudios se inició con la prueba de aglutinación de partículas de látex . La técnica básicamente consistió en la sensibilización de partículas de

látex con suero hiperinmune, anti-extracto crudo del metacéstodo de *Taenia solium* para la detección de antígenos en muestras de LCR. Los resultados reportaron una especificidad del 97% y una sensibilidad del 77%, la cual aumento al 88% en la segunda muestra después de haber aplicado tratamiento antiparasitario con prazicuantel a los pacientes, esto debido posiblemente a la liberación de antígenos ocurrida por la muerte y posterior lisis del parásito (tabla IV). (76)

TABLA-IV Determinación de antígenos del cisticerco de *Taenia solium* en seres humanos

| Autor / Fecha | Técnica | Sistema de Ac | Porcentaje de sensibilidad (N) | Porcentaje de especificidad (N) |
|--|--------------|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| | | | LCR | LCR |
| Velasco y col., 1983 (78) | Aglutinación | anti-EC | 77% (215) 100%(31)* | 97% (31) |
| Estrada y Kuhn, 1985 (78) | ELISA | anti-EC | 89% (16) | 100% (15) |
| Téllez G. y col., 1987 (77) | DOT-ELISA | anti-EC | 59% (17) | 100% (48) |
| | ELISA | anti-EC | 77% (17) | 100% (48) |
| Correa y col., 1989a y 1989b (79 y 80) | ELISA | monoclonal y poli. ** | 14-93%(32) | 100% (24) |
| Estrada y col., 1989 (82) | IET | anti-EC | 78% (18) | 100% (18) |
| Chromaski y col., 1990 (83) | HPLC-ELISA | anti-EC | 56% (79) | 100% (5) |

* casos confirmados.

** Monoespecíficos: El Mabs HP10 (IgM) reactivo a glicoproteínas de superficie y de secreción del cisticerco de *T. saginata* y el HP12 (IgM) reactivo con componentes del fluido vesicular del cisticerco de *T. solium*. Y poliespecíficos: anti-AgB y anti-EC de tipo IgG obtenidos por inmunización en cerdos del correspondiente antígeno.

anti-EC: anticuerpos de conejo, dirigidos contra el EC del metacéstodo de *T. solium*.

Posteriormente surgió el ELISA y sus variantes como el Dot-ELISA que se utilizaron en estudios para detectar antígenos en muestras de LCR de pacientes con NCC; la sensibilidad en este caso, es muy variada dependiendo del autor; para el Dot-ELISA es del 59% (77) y para el ELISA, si se usan anticuerpos policlonales en el sistema de captura reporta de 14% a 77% dependiendo de la fuente de los anticuerpos (conejo o cerdos) y de la especificidad de los mismos (contra EC o antígenos individuales) (77-80); cuando se usaron dos anticuerpos monoclonales distintos la sensibilidad fue de 48% y 72%. (80,81) Además cuando se hicieron combinatorias de diferentes anticuerpos la sensibilidad aumentó a 93%. (80) La especificidad fue cercana al 100%, ya que cuando se evaluaron muestras de personas con otras enfermedades neurológicas (meningitis tuberculosa o bacteriana, trauma endocráneo, encefalitis viral, mieloma múltiple, etc.) los resultados fueron negativos (tabla IV). El diagnóstico de esta forma puede ayudar también a diferenciar entre cisticercosis activa e inactiva, ya que la positividad en la mayoría de los casos se asocia a la presencia de cisticercos vivos.

El único estudio en el que se detectaron antígenos en suero por ELISA es de tipo epidemiológico y se basa en el mismo sistema de captura usado para muestras de LCR (79), pero modificado para usarse en suero, en la comunidad de Cerritos, San Luis Potosí, México. La prevalencia de antígenos encontrada fue del 1% (1/900); la sensibilidad calculada fue del 23%. (46, 81), Aunque este valor es bajo, es de esperarse, ya que se trata de muestras de suero y de población abierta, y no de LCR en grupos de casos clínicos.

Más recientemente surgieron la IET y la Cromatografía de alta resolución (High Performance Chromatography Liquid, HPLC), que además de darnos información de la existencia de antígenos en LCR de pacientes con NCC nos indica cuantos son y su peso molecular. Solo dos trabajos existen al respecto, en el primero de ellos por medio de la IET se identificaron 2 antígenos uno de 190 y otro de 230 kDa de la larva de *Taenia solium* en muestras de LCR en 14 de 18 pacientes con NCC (78%) (82), y en el segundo usando HPLC se separaron y eluyeron muestras de LCR de pacientes con diagnóstico de NCC en 6 fracciones que posteriormente fueron probadas por ELISA para antígenos; en la fracción 2 se identificaron antígenos cuyo peso molecular se encontraba en un rango de 33 a 240 kDa, en el 56% de las muestras. (83)

II. JUSTIFICACIÓN

El inmunodiagnóstico de la cisticercosis se ha basado en la determinación de anticuerpos en diferentes fluidos orgánicos, tales como suero, LCR y saliva de seres humanos y de cerdos; sin embargo, en los métodos que detectan anticuerpos anti-cisticerco sólo se fortalece el diagnóstico de NCC en pacientes con sintomatología neurológica sugerente y nos indica un contacto del paciente con antígenos de la *T. solium*. Los trabajos enfocados en la búsqueda de antígenos del cisticerco de *Taenia solium* se iniciaron como una alternativa para el inmunodiagnóstico, ya que la presencia de antígenos en muestras de suero o LCR nos podría indicar la presencia del parásito vivo, es decir, de una cisticercosis activa. Sin embargo, aunque se sabe que hay antígenos en muestras de LCR y suero de seres humanos con NCC, no se conoce cuantos son, ni su peso molecular. Existen solamente dos trabajos en los que se ha logrado la caracterización de antígenos únicamente en muestras de LCR, en uno de ellos se menciona que los antígenos del cisticerco de *T. solium* se encontraron en un rango de peso molecular de entre 30 y 240 kDa, y en el otro que existen dos antígenos con un peso molecular de 190 y 230 kDa. Sin embargo, en estos trabajos no se analizó la presencia de antígenos en grupos de pacientes clasificados según el número, el tipo y la localización de los cisticercos en el cerebro, ni tampoco se analizaron muestras de suero. Por ello se decidió realizar la presente tesis.

III. OBJETIVOS

1. Identificar el número y el peso molecular de los antígenos presentes en el suero y en el LCR de pacientes con neurocisticercosis.
2. Comparar los patrones antigénicos encontrados entre diferentes casos clínicos y entre las diferentes muestras de suero y en líquido cefalorraquídeo de seres humanos con cisticercosis.
3. Buscar la presencia de reactividad cruzada con otros parásitos.

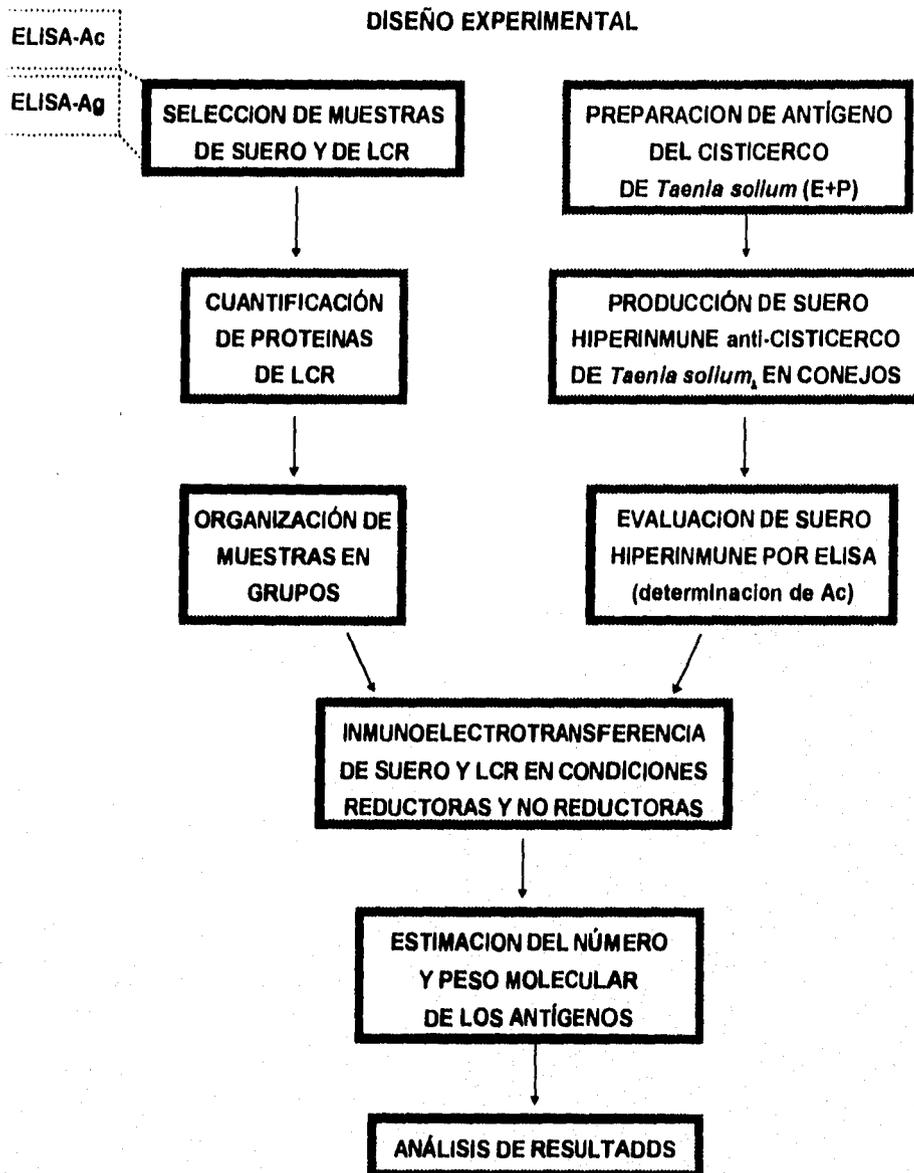
IV. HIPÓTESIS

En el suero y en el LCR de seres humanos con cisticercosis es posible encontrar antígenos comunes de la larva de *Taenia solium*; pero no en todos se identificará el mismo patrón antigénico. Esto es, se encontrará un patrón antigénico heterogéneo entre muestras y entre casos.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

El procedimiento general del trabajo experimental se muestra a continuación:

FIGURA 3
DISEÑO EXPERIMENTAL



1) MUESTRAS

A) CASOS CLÍNICOS

1.- Se selecciona un grupo de muestras de suero y líquido cefalorraquídeo de pacientes provenientes del Centro Médico Siglo XXI, de casos clínicos confirmados por su historia clínica y por su evaluación en Resonancia Magnética (RM) o Tomografía Computada(TC).

2.- Posteriormente se eligen aquellas muestras de pacientes de los que se tenía tanto suero como LCR.

3.- Se realiza la determinación de proteínas a los LCR por el método de Bradford (BIO-RAD)(84), usando albúmina sérica bovina como estándar.

4.- Se hace una última selección de muestras en donde se consideran aquellas que cumplen con el paso 2 y que además después de haber realizado el paso 3 el LCR tienen una concentración de proteínas de 0.40 mg/ml debido a que el volumen máximo que se cola por pozo es de 100 µl.

5.- Las muestras elegidas se acomodan en cuatro grupos, considerando un mínimo de 5 muestras en cada uno, de acuerdo con los datos de clínica y de imagen obtenidos:

- I.- Suero y LCR de pacientes que presentaban 1 sólo quiste.
- II.- Suero y LCR de pacientes que presentaban quistes múltiples.
- III.- Suero y LCR de pacientes que presentaban calcificaciones.
- IV.- Suero y LCR de pacientes que presentaban quistes y calcificaciones.

B) MUESTRAS DE TESTIGOS NEGATIVOS DE SUERO

Se seleccionan 8 muestras de sueros de personas sanas las cuales tenían resultado negativo para anticuerpos contra el cisticerco de *T. solium* por ELISA, y que además no presentaban sintomatología sugerente de neurocisticercosis, ni habían padecido teniosis.

C) MUESTRAS DE TESTIGOS NEGATIVOS DE LCR

Se seleccionan 8 muestras de LCR de personas que presentaban patologías diferentes a la cisticercosis: aneurisma cerebral(2), tuberculosis (1), aracnoiditis (1), meningitis aguda (2), aneurisma múltiple (1), hemorragia subaracnoidea (1), las cuales fueron negativas por ELISA para anticuerpos y para antígenos del cisticerco de *T solium*.

D) MUESTRAS DE SUERO DE PACIENTES CON OTRAS PARASITOSIS.

Se usan 3 muestras de suero de pacientes con teniosis, los cuales fueron positivos por ELISA para coproantígenos de *T. solium* y negativos por ELISA para anticuerpos y para antígenos del cisticerco de *T. solium*, 3 muestras de suero de pacientes con resultado de anticuerpos positivos por ELISA para triquinelosis (proporcionados por el Depto. de Inmunoparasitología del INDRE). También se analizan, 1 muestra de suero de un individuo con himenolepiosis, 1 muestra de suero de una persona con hidatidosis y 1 muestra de suero de un pacientes con toxocariosis (proporcionadas por el Depto. de Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM), 3 muestras de suero de pacientes con toxocariosis y 1 con toxoplasmosis (proporcionadas por el Depto. de Parasitología del INDRE).

2) PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ANTIGÉNICO DEL CISTICERCO DE *Taenia solium*.

Se prepara un extracto crudo (EC) del metacástodo de *T. solium* de acuerdo al método de Espinoza y col. (48):

1.- Se obtienen cisticercos de carne de cerdo parasitada, evitando tomar carne del animal, se aíslan y se puncionan eliminando el fluido vesicular. Se colocan en un recipiente que contiene solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) (Sol. II), se hacen varios lavados para quitar componentes del hospedero (restos de carne y de grasa), se eliminan el exceso de solución salina , se pesan y colocan sobre papel aluminio que se encuentra sobre hielo seco y de esta manera se congelan rápidamente y se guardan a -70 °C hasta su uso.

2.- Los cisticercos se descongelan y se les agrega una solución de inhibidores enzimáticos p-hidroximercuribenzoato (PHMB) y p-metilsulfonilfluoruro (PMSF) a una concentración final de 0.04% (Sol. III) y 0.006% respectivamente (Sol IV) y 50 µg de (TPCK, Sol. V) y (TLCK, Sol. VI) por g de cisticercos.

3.- Se macera rápidamente en un mortero y el macerado se sometió a ciclos de congelación y descongelación (5 veces).

4.- Se sonica a 7 Hz. durante 1 min. en baño de hielo y se repite este procedimiento hasta la completa destrucción del tejido, dejando intervalos de descanso de 5 min entre cada sonicado.

5.- Se agrega 1 volumen de PBS 10X (Sol. I) a 9 volúmenes de la muestra y 9 g. de NaCl por litro de solución final.

6.- Se centrifuga a 30,000 rpm durante 1 h a 4°C.

7.- Se elimina la capa de lípidos que se encuentra en la superficie, se recupera el sobrenadante (S₁) y se guarda momentáneamente a 4 °C

8.- Se vuelve a procesar el precipitado agregando una pequeña cantidad de PB 10X y se sonica nuevamente como se indica en el paso 4.

9.- Se centrifuga como en el pasos 5 y se obtiene el sobrenadante (S₂) de igual forma que en el paso 7.

10.- Se mezclan ambos sobrenadantes (S₁ + S₂).

11.- Se cuantifica la concentración de proteínas, se fracciona y se congela a -20°C y posteriormente a -70 °C hasta su uso.

Nota: Se corrobora la adecuada preparación del extracto proteico sometiéndolo a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 11% bajo condiciones reductoras junto con un extracto antigénico de un lote anterior ya conocido. Este extracto deberá de presentar más de 40 bandas proteicas cuando el gel es teñido con azul de Coomassie y mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia se revelan alrededor de 30 bandas antigénicas (ver más adelante).

3 | CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD

1.- Se construyen curvas patrón con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (ASB) a 1 mg/ml. (Sol. VII) y se hacen las diluciones pertinentes de las muestras problema como se indica en la siguiente tabla III.

NOTA: Se recomienda agregar el reactivo de BRADFORD cuando ya se prepararon todos los tubos y justo 5 minutos antes de medir las absorbancia en el espectrofotómetro, debido a que el color producido en la reacción es estable solo durante 30 min.

2.- Se lee cada muestra en un espectrofotómetro a 595 nm.

3.- Se lavan perfectamente las celdas con alcohol y H₂O destilada después de cada lectura y se secan perfectamente.

TABLA-V CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

| TUBO | PROT. STD. ASB (1 mg/ml) Vol. (µl) | MUESTRA PROBLEMA Vol. (µl) | Vol. H ₂ O (µl.) | REACTIVO DE BRADFORD (µl.) | ABSOR- BANCIA* | CONC. FINAL (µg/ml) |
|------|--|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------|---------------------------|
| 1. | 0 | 0 | 800 | 200 | 0.456 | 0 |
| 2 | 5 | 0 | 795 | 200 | 0.640 | 5 |
| 3 | 10 | 0 | 790 | 200 | 0.821 | 10 |
| 4 | 15 | 0 | 785 | 200 | 1.070 | 15 |
| 5 | 20 | 0 | 780 | 200 | 1.230 | 20 |
| 6 | 0 | 5 | 795 | 200 | 0.720 | 6 |
| 7 | 0 | 10 | 790 | 200 | 1.101 | 17 |

*Ejemplo real.

4.- Se construye una curva estándar colocando las concentraciones de ASB en el eje de la X y las absorbancias en el eje de la Y, y se obtiene la regresión lineal de la recta.

5.- Se interpolan los valores de absorbancia de la muestra problema en la curva estándar y entonces se conoce la concentración de proteínas de cada sistema considerando el factor de dilución en cada una de ellas.

4) PRODUCCIÓN DE SUERO HIPERINMUNE DE CONEJO anti-CISTICERCO DE *Taenia solium*.

Se preparan anticuerpos policlonales de tipo IgG, contra el EC, para lo cual se sigue un método de inmunización ya estandarizado que consiste en:

1.- Se selecciona un conejo raza Nueva Zelanda de aproximadamente 2 Kg de peso y de 3-5 meses de edad.

2.- Se obtienen de 3-5 ml. de sangre de la vena caudal de la oreja que corresponde al día cero de la inmunización.

3.- Se da la primera inmunización con un mezcla de un volumen del extracto del cisticerco de *Taenia solium* que contenga 1 mg de proteína, más un volumen similar de adyuvante completo de Freund, por vía subcutánea.

4.- Una semana después (7 días) se hace un segundo sangrado de la misma forma que en el paso 2 y se da un segundo estímulo con la misma dosis y vía pero en adyuvante incompleto de Freund.

5.- A los 14 días se vuelve a sangrar como en el paso 2 y se inmuniza ahora con el antígeno solo, por vía intramuscular.

6.- Se hacen subsiguientes retos por vía intramuscular con la mitad de la dosis inicial y sin adyuvante cada semana (21, 28 y 35 días). Antes de cada inmunización se hacen sangrados por oreja como en el paso 2.

7.- Se lleva a cabo un monitoreo de la producción de anticuerpos empleando el suero obtenido en los sangrados, por ELISA (Ver figura-4).

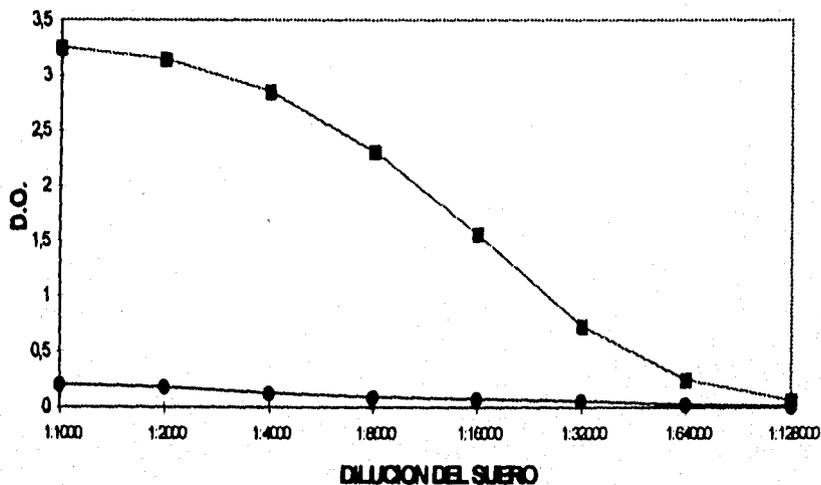


FIGURA-4 TITILACIÓN DE ANTICUERPOS anti-EC DE CONEJO, DETERMINADO POR LA TÉCNICA DE ELISA

8.- Cuando se alcance el título máximo de anticuerpos, aproximadamente en el título 1:64000 se sangra a los conejos "a blanco", es decir, se sacrifican al sangrarlos por punción cardíaca. La sangre obtenida se incuba a 37 °C por 30 min., se separa el coágulo y se centrifuga a 2500 rpm. Se separa el suero del paquete celular.

9.- El suero obtenido se fracciona y se congela a -20°C y posteriormente a -70°C hasta su uso.

10.- Se corrobora el reconocimiento adecuado del lote de anticuerpos por IET usando como antígeno el extracto crudo del cisticerco.

5) ELISA PARA ANTICUERPOS.

La determinación de anticuerpos en conejos se hace por ELISA, pero modificada de la descrita por Espinoza y col. (89) y consta de las siguientes partes:

A) SENSIBILIZACIÓN

1.- Se utilizan placas de ELISA (Inmulón 1, Dynatech), que se sensibilizan con 100µl/pozo de extracto crudo (EC) diluido en solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato 0.01M, pH 9.6 (Sol. VIII) a una concentración de 5µg/ml.

2.- Se incuban las placas durante toda la noche a 4°C.

B) BLOQUEO

3.- Se elimina la solución de antígeno decantando el contenido de los pozos y el exceso de líquido se seca sobre una gasa.

4.- Se hacen 3 lavados con 200 µl/pozo de PBS-Tween 20 (Sol. IX), durante 5 min cada vez.

5.- Entre cada lavado se sigue como se indica en 3.

6.- Se colocan 200 µl/pozo de ASB o ASH. al 1% en PBS-Tween 20 (Sol. X).

7.- Se incuba la placa a 37°C durante 30 min.

C) COLOCACIÓN DE MUESTRAS

8.- Se continúa como en los pasos 3 y 4.

9.- Se hacen diluciones dobles de suero partiendo de 1:1,000 en PBS-Tween 20 (Sol. IX) y se colocan 100 µl/pozo de la muestra diluida en los pozos correspondientes. Es importante recordar que cada muestra se prueba por

duplicado. El vaciado de las muestras a los pozos se realiza de acuerdo a la hoja de instrucciones de llenado establecido con anterioridad.

10.- Se incuba a 37°C durante 2 h.

D) CONJUGADO (anti-Inmunoglobulinas de conejo-peroxidasa)

11.- Se continua como en los pasos 3 y 4.

12.- Se colocan 100 µl/pozo del conjugado anti-IgG de conejo-peroxidasa diluido 1:1000 en PBS-Tween 20 (sol. IX). El lote de conjugado se titula con anterioridad para conocer la dilución óptima con la que se debe trabajar.

13.- Se incuba a 37°C durante 2 h.

E) SUSTRATO

14.- Se procede como en los pasos 3 y 4

15.- Se colocan 100 µl/pozo de la solución de sustrato (o-fenilendiamina) y se incuba la placa a 37°C durante 30 min.

Las cantidades de los componentes del sustrato que se indican son suficientes para una placa de 96 pozos:

Se mezclan 5 ml de ácido cítrico 0.1M (Sol. XI) con 5 ml de citrato de sodio 0.1M (Sol. XII), a esta mezcla agregar 4 mg. de o-fenilendiamina (se saca 1 hora antes de su uso), se agregan 4 µl de H₂O₂ al 30%, se mezcla y se agita vigorosamente. La solución de sustrato se prepara justo en el momento de finalizar el último lavado y se vacía rápidamente a los pozos.

F) LECTURA

16.- La reacción enzimática se detiene añadiendo 100 µl/pozo de H₂SO₄ 2N (sol. XIII). La lectura se hace en un lector de ELISA a 405 nm.

Observaciones:

1.- Las muestras se colocan por duplicado siguiendo la hoja de instrucciones de llenado, en que no deben omitirse los siguientes testigos:

a. Testigo positivo de la prueba: se utiliza el suero proveniente de un conejo inmunizado con anterioridad y previamente probado por esta técnica con lecturas mayores de 2.5 unidades de absorbancia.

b. Testigo negativo del anticuerpo (blanco): la muestra biológica problema se sustituye por la solución de PBS-Tween 20.

c. Testigo negativo del ensayo: muestra de suero proveniente de él o los conejos sin inmunizar.

d. Se recomienda usar 2 testigos positivos (suero) del ensayo, estos pueden ser uno de lectura alta (aproximadamente de 2.0) y uno bajo (cercano al punto de corte).

2.- La sol. de ASB se puede reutilizar 3 veces.

3.- El sustrato se mantiene en el congelador.

6) INMUNOELECTROTRANSFERENCIA PARA ANTÍGENOS

El análisis de los antígenos presentes en las muestras por IET se hace utilizando las metodologías descritas por Laemmli (85) para la electroforesis de proteínas, y de Towbin (67), para la electrotransferencia, la técnica se describe a continuación y posteriormente se esquematiza.

A) ELECTROFORESIS

1.- Los cristales de la cámara de electroforesis se colocan en los empaques y se montan en el soporte para preparación de geles.

2.- Se agrega agua entre los cristales montados para verificar que no haya fugas de agua y se nivelan.

3.- Se secan los cristales con papel filtro .

4.- Se hace la mezcla para preparar 40 ml del gel inferior o separador al 9% para muestras de suero y al 11% para muestras de LCR en base a la tabla IV.

5.- Se hace la mezcla para 10 ml de solución del gel superior o concentrado al 3.5% en base a la tabla V:

Observaciones: El persulfato de amonio (APS) y el (TEMED) se agregan al último, se agita toda la mezcla y se vierte rápidamente entre los dos cristales. Se deja polimerizar el tiempo que sea necesario.

Cuando ha polimerizado el gel inferior se debe agregar el gel superior colocando previamente un peine de 10 carriles que permita la formación de los pozos. En este caso también el TEMED y el APS se agregan al último , se agita la mezcla y se vierte entre los dos cristales y se deja polimerizar el tiempo que sea necesario.

6.- Se coloca el volumen equivalente 40 µg de proteínas de cada una de las muestras de suero o líquido cefalorraquídeo por carril así como los estándares de peso molecular, preparados previamente (Sol. XIX) o comerciales (SIGMA), en una solución para muestra (Sol XX) en proporción 1:1 vol/vol. Cada muestra se

prepara en condiciones reductoras agregando 2-mercaptoetanol y en condiciones no reductoras sin el agente reductor. Las muestras se hierven durante 5 min.

TABLA-VI SOLUCIONES PARA PREPARAR GEL SEPARADOR A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACRILAMIDA

| SOLUCIONES | Gel al 11% Vol. (ml) | Gel al 9% Vol. (ml) |
|--|-------------------------|------------------------|
| Acrilamida-Bisacrilamida al 30% (Sol. XIV) | 14.7 | 12.0 |
| H ₂ O dd. | 15.0 | 17.6 |
| Tris-base 2M pH= 8.8 (Sol. XV) | 10.0 | 10.0 |
| SDS al 10% (Sol. XVI) | 0.4 | 0.4 |
| APS al 10% (Sol. XVII) | 0.4 | 0.4 |
| TEMED | 0.02 | 0.02 |

TABLA-VII SOLUCIONES PARA PREPARAR EL GEL CONCENTRADOR

| SOLUCIONES | Vol. (ml) |
|--|-----------|
| Acrilamida-Bisacrilamida al 30% (Sol. XIV) | 1.7 |
| H ₂ O dd. | 6.8 |
| Tris-HCl 2M pH= 6.8 (Sol. XVIII) | 1.3 |
| SDS al 10% (Sol. XVI) | 0.1 |
| APS al 10% (Sol. XVII) | 0.1 |
| TEMED | 0.010 |

7.- Se colocan las muestras cada una en un carril. La electroforesis de los sueros se hace en geles al 9% y la de los LCR se hace en geles al 11%. Es importante incluir en cada gel un carril que contenga los marcadores de peso molecular preteñidos o sin teñir.

8.- Se agrega la solución de corrida (Sol. XXI) en la cámara.

9.- La electroforesis de las proteínas en el gel, se hace mediante la formación de un campo eléctrico, en donde se deja que las muestras corran del cátodo (polo negativo) al ánodo (polo positivo) a 160 volts el tiempo necesario

hasta que el frente colorido de las muestras se encuentre a + 0.5 cm. del final de los geles.

B) ELECTROTRANSFERENCIA

1.- Mientras se lleva a cabo la electroforesis, se ponen a remojar el papel filtro, las fibras (Scotch) y el papel de nitrocelulosa (NC) en la solución amortiguadora de transferencia (Sol. XXIII).

2.- Terminado el tiempo de la electroforesis, se desmonta la cámara y de los geles se elimina el gel superior y el gel inferior se sumergen en una charola que contiene solución de transferencia.

3.- Se monta cada gel en los empaques de plástico de la cámara de transferencia de acuerdo al esquema de la figura 6.

Nota: Se debe trabajar con guantes nuevos y eliminar las burbujas que se puedan formar al colocar cada uno de los componentes anteriores, ya que éstas interferirán en el análisis después del revelado.

4.- Los geles empaquetados se colocan en la cámara de transferencia la cual ya contiene la solución respectiva fría.

5.- Se transfieren las muestras del cátodo (polo negativo) al ánodo (polo positivo) a 100 volts durante 1 hr. Esto se hace a 4°C de preferencia.

6.- Para verificar que la transferencia fue adecuada se tiñe con rojo de Ponceau S (SIGMA) al 0.2% (Sol. XXIV) y se lava con agua destilada para quitar el exceso de colorante. En caso de que se utilicen marcadores de peso molecular preteñidos, se cortan antes de teñir la NC con el rojo de Ponceau S, en caso contrario se tiñen y se cortan.

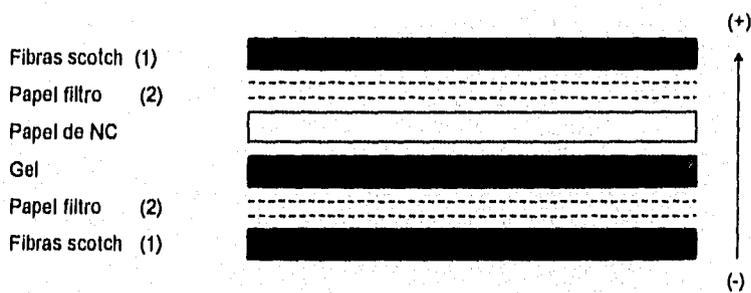
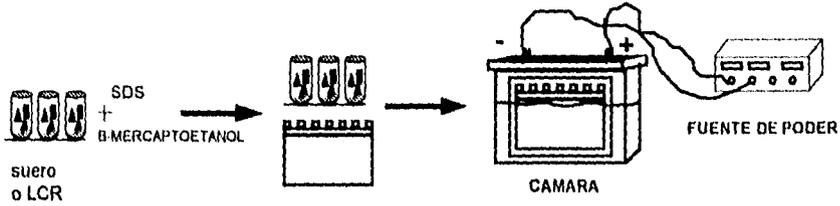
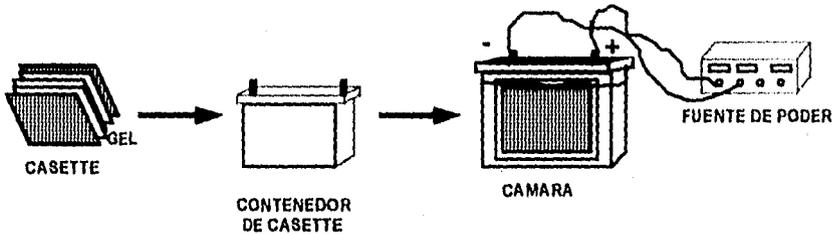


Figura 5. Se esquematiza el orden de colocación de las fibras, papel filtro, NC y gel en los empaques de plástico para la transferencia.

ELECTROFORESIS



ELECTROTRANSFERENCIA



ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO

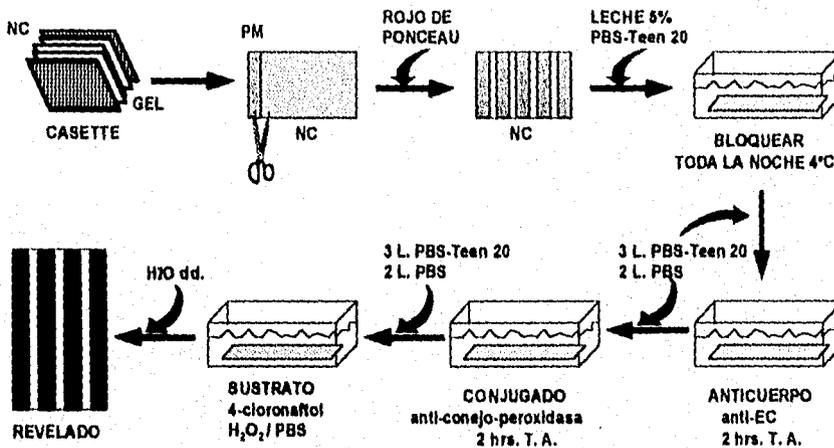


FIGURA-5 TÉCNICA DE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

C) REACCIÓN INMUNOENZIMÁTICA

1.- La NC se bloquea con leche Sveltes al 5% en PBS-Tween 20 (Sol. XXV) durante toda la noche a 4°C y se sigue al día siguiente 30 min en agitación constante a temperatura ambiente.

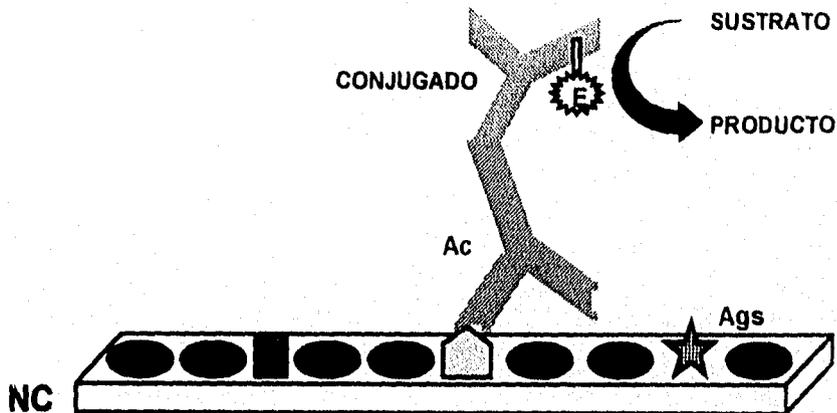
2.- Se hacen 3 lavados con PBS-Tween de 5 min cada uno, después 2 lavados con PBS pH 7.2 de 5 min cada uno, en agitación continua a temperatura ambiente.

3.- Se incuba la NC con los anticuerpos anti-EC, diluidos 1:50 en PBS-Tween 20 (Sol. IX), en agitación constante durante 2 h a temperatura ambiente.

4.- Se lava como se indica en el paso 2 y se añade el conjugado anti-conejo acoplado a peroxidasa (SIGMA) a una dilución 1:500 en PBS-Tween 20 (Sol. IX), se incuba durante 2 h a temperatura ambiente en agitación constante.

6.- Se repiten los lavados como en el paso 2 y se revela con la solución de sustrato (Sol. XXVI). Esta se prepara en el momento justo del revelado, y una vez que aparecen las bandas, la reacción se detiene lavando con agua destilada.

BASES DE LA REACCIÓN INMUNOENZIMÁTICA



D) ESTIMACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LOS ANTÍGENOS

1.- Para determinar los pesos moleculares de las distintas proteínas se calcula el Rf de cada uno de los marcadores de peso molecular con la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{Distancia de la parte superior del gel separador a la banda}}{\text{Distancia de la parte superior del gel separador al frente de corrida}}$$

2.- Se gráfica el Rf contra el logaritmo del peso molecular para cada proteína conocida y se obtiene una relación lineal.

3.- Se calcula el Rf de cada proteína problema y se interpola en la gráfica para determinar su peso molecular como se ilustra a continuación:

DETERMINACION DE PESO MOLECULAR

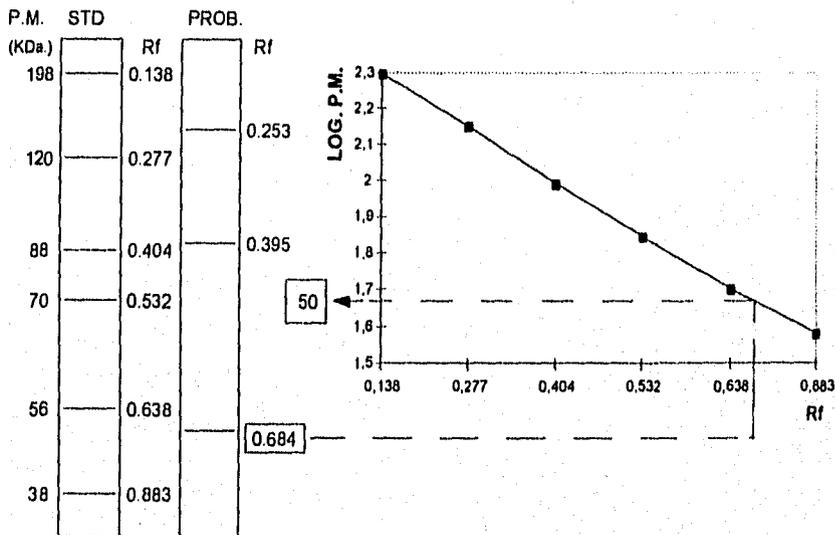


FIGURA-7 CÁLCULO PARA LA ESTIMACIÓN DEL PESO MOLECULAR

7) IET DESCRITA POR ESTRADA Y KUHN

La electroforesis se hace como se describe arriba, en geles al 7.5% de acrilamida en condiciones reductoras, la diferencia radica en que después de realizar la electroforesis de las muestras se hacen 3 lavados secuenciales de, 20 minutos cada uno a temperatura ambiente, a los geles con la solución de transferencia que contenía primero Tritón X-100 (Sigma) al 0.5%, después al 0.1% y finalmente solo con solución de transferencia. Además después de llevar a cabo la transferencia se procedió a incubar en el bloqueo y el anticuerpo anti-EC del cisticerco y el conjugado anti-conejo peroxidasa diluidos 1:25 y 1:500 respectivamente, en una solución de PBS y leche descremada al 3%. Los pasos siguientes del revelado se llevan a cabo como para la IET en general, agregando el sustrato correspondiente y parando la reacción con H₂O.

MATERIAL Y EQUIPO

I). MATERIAL

Micropipetas de 0.1-10 μ l.
Micropipetas de 0.1-20 μ l.
Micropipetas de 5-50 μ l.
Micropipetas de 0.1-200 μ l.
Micropipetas de 10-1000 μ l.
Puntas para micropipetas de 200 μ l.
Puntas para micropipetas de 1000 μ l.
Viales de plástico.
Papel filtro.
Papel de Nitrocelulosa.
Gradillas.
Gasa.
Guantes.
Algodón.
Jeringas de 3 y 5 ml.
Navajas para bisturí.
Mortero con mango.
Abatelenguas.
Aplicadores de madera.
Plumones de tinta indeleble.
Tela adhesiva.
Lápiz de color verde (marca Verathin).
Vasos de pp. de 100, 250, 1000 y 2000 ml.
Matraces Erlenmeyer. de 250, 500 y 1000 ml.
Pipetas de 1, 5, 10 y 20 ml.
Probetas de 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 ml.
Tubos de ensaye de 13x100.

Tapones de corcho.
Papel aluminio.
Cubrebocas.
Soportes para pozos.
Pozos de poliestireno IMMULON 1.
Pozos de poliestireno IMMULON 2
Micropipeta multicanal de volumen fijo o variable hasta 200 μ l.
Embudos.
Barra magnética.
Espátulas.
Recipientes de plástico para incubación.

II). EQUIPO

Espectrofotómetro.
Congelador de -70°C.
Refrigerador.
Estufa a 37°C.
Potenciómetro.
Balanza Analítica.
Balanza Granataría.
Ultracentrífuga.
Sonicador.
Vortex.
Lector de ELISA.
Cámara de electroforesis.
Cámara de transferencia.
Fuente de poder.
Agitador magnético con calentamiento.

V. RESULTADOS

1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

A) ANTÍGENO

Se obtuvieron 65 ml de extracto crudo del cisticerco (EC) a una concentración de 18 mg/ml, partiendo de 58.57 g de cisticercos, por lo que el rendimiento fue de 20 mg de proteína/g de tejido húmedo. Cuando se compara el patrón del EC obtenido con el de un lote anterior, por electroforesis se observó que es similar (figura 8).

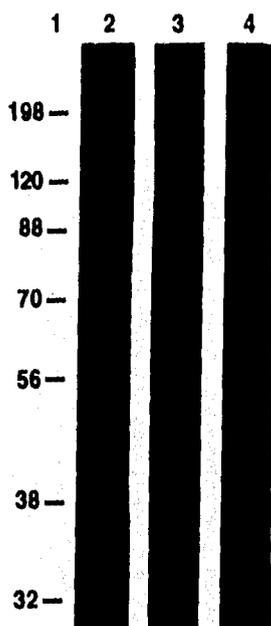


Figura-8 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS del EC del cisticerco de *Taenia solium* en condiciones reductoras teñido con azul de Coomassie (carriles 2-4) y Marcador de peso molecular (carril 1).

B) SUERO HIPERINMUNE DE CONEJO ANTI-EC.

El lote de suero hiperinmune anti-EC que se obtuvo al inmunizar conejos fue de aproximadamente 50 ml y al evaluarlo por IET se reveló el patrón antigénico que se ve en la figura 9.

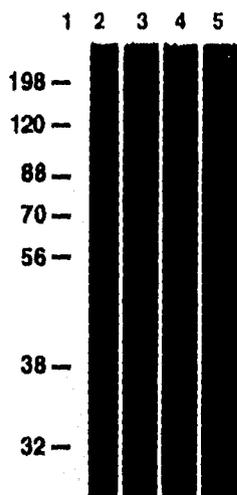


Figura-9 Inmunolectrotransferencia del EC del cisticerco revelado con suero hiperinmune de conejo, anti-EC del cisticerco de *Taenia solium*: 1) Marcador de peso molecular, 2-5) EC del cisticerco.

La respuesta del anticuerpo anti-EC del cisticerco corresponde al patrón esperado.

2. SELECCIÓN DE MUESTRAS

Se eligieron 29 muestras de un total de 131 analizadas, usando como criterio para su selección 3 aspectos: 1) que hubiera suero y LCR del mismo paciente, 2) que en el LCR la concentración de proteínas fuera de un mínimo de 0.40 mg/ml y 3) contar con datos de imagen del cerebro para poder clasificar el caso dentro de los cuatro grupos que se ilustran en las tablasVIII-XI.

TABLA VIII GRUPO DE PACIENTES CON QUISTES MÚLTIPLES

| CLAVE | LOCALIZACIÓN | Concentración de proteínas en LCR (mg/ml) | Vol. (μL) = 40 μg |
|-------|-----------------------------------|---|-------------------|
| 1 | Subaracnoideo e Intraventricular. | 0.541 | 74 |
| 7 | Subaracnoideo e Intraventricular | 2.600 | 16 |
| 9 | Subaracnoideo. | 0.399 | 100 |
| 11 | Subaracnoideo y parenquimatoso. | 0.993 | 40 |
| 14 | Subaracnoideo. | 1.816 | 22 |
| 15 | Subaracnoideo y parenquimatoso. | 0.455 | 88 |
| 17 | Subaracnoideo. | 0.546 | 73 |
| 19 | Subaracnoideo. | 0.736 | 54 |
| 22 | Subaracnoideo | 0.451 | 89 |
| 25 | Subaracnoideo | 0.310 | 130 |
| 31 | Subaracnoideo | 0.789 | 51 |
| 51 | Subaracnoideo | 0.590 | 68 |
| 69 | Parenquimatoso | 0.627 | 64 |
| 80 | Subaracnoideo | 0.639 | 63 |

TABLA IX GRUPO DE PACIENTES CON QUISTE ÚNICO

| CLAVE | LOCALIZACIÓN | Concentración de proteínas en LCR.(mg/ml) | Vol. (μL) = 40 μg |
|-------|---------------|---|-------------------|
| 3 | Subaracnoideo | 0.384 | 104 |
| 10 | Subaracnoideo | 0.399 | 100 |
| 43 | Subaracnoideo | 0.569 | 70 |
| 52 | Subaracnoideo | 0.381 | 105 |
| 101 | Ventricular | 0.457 | 88 |

TABLA X GRUPO DE PACIENTES CON CALCIFICACIONES

| CLAVE | No. DE CALCIF. | LOCALIZACIÓN | Concentración de proteínas en LCR (mg/ml) | Vol. (µL) = 50 µg |
|-------|----------------|-----------------|---|-------------------|
| 29 | 1 Calcif. | Parenquimatosas | 0.569 | 70 |
| 38 | Múltiples | Parenquimatosas | 0.441 | 91 |
| 39 | Múltiples | Parenquimatosas | 2.180 | 18 |
| 41 | Múltiples | Parenquimatosas | 0.549 | 73 |
| 42 | Múltiples | Parenquimatosas | 0.308 | 130 |

TABLA XI GRUPO DE PACIENTES CON QUISTES Y CALCIFICACIONES

| CLAVE | No. DE QUISTES Y CALC. | LOCALIZACIÓN | Concentración de proteínas en LCR.(mg/ml) | Vol. (µL) = 50 µg |
|-------|------------------------|--------------------------------|---|-------------------|
| 2 | 1 Quiste C. Mult. | Subaracnoideo | 0.890 | 45 |
| 20 | Q. Mult. 1 Calcif. | Subaracnoideo | 0.956 | 42 |
| 26 | Q. Mult. C. Mult. | Intraventricular | 0.569 | 70 |
| 32 | Q. Mult. C. Mult. | Subaracnoideo y parenquimatoso | 0.833 | 48 |
| 48 | Q. Mult. C. Mult. | Subaracnoideo y parenquimatoso | 0.527 | 76 |

3. ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE TRABAJO PARA SUEROS

Para la estandarización de las condiciones en las cuales se realizó la IET de las muestras de suero, primero se corrieron geles a dos diferentes concentraciones de acrilamida, 9% y 11%, tanto en condiciones reductoras como no reductoras en pacientes cisticercosos y en personas sanas para definir a que concentración de acrilamida-bisacrilamida se tenía mejor resolución de las proteínas, de tal forma

que en el revelado se pudieran diferenciar sin que estuvieran o bien muy separadas o muy alejadas. En este caso la concentración de acrilamida adecuada fue del 9% en ambos casos (figura 10).

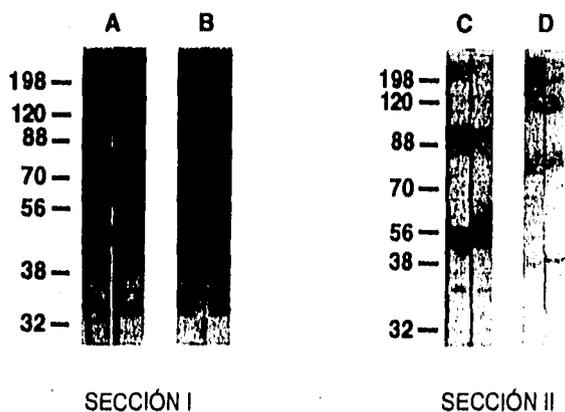


Figura-10. Inmunoelctrotransferencia de sueros corridos en condiciones reductoras (A) y no reductoras (B) al 11% (sección I) y al 9% de acrilamida (sección II).

Como segundo paso se estableció la dilución del anticuerpo anti-EC se probaron diferentes diluciones de éste, encontrando que 1:25 fue la mejor, como se observa en la figura 11, debido a que permitió una mejor definición en el papel.

En lo que corresponde a la titulación de conjugado se probaron 4 diferentes diluciones desde 1:500 hasta 1:2000 y la dilución óptima para usar el conjugado fue de 1:500 como se observa en la figura 12.

Una vez conocida la concentración más adecuada de acrilamida y la dilución tanto de conjugado como de anticuerpo había que establecer la cantidad de muestra con la que se debía trabajar; para ello se sometieron a electroforesis diferentes cantidades de suero desde 10 hasta 80 μ g de proteína por carril, en condiciones reductoras y no reductoras, usando una muestra positiva y una negativa, posteriormente se transfirieron y se revelaron. La cantidad de muestra que se seleccionó fue de 40 μ g. Esto se debió a que como se puede ver en la figura 13 y 14 a partir de 30 μ g de proteína se observan las bandas bien definidas y porque si se excede en cantidad la reacción de fondo se aumenta. Además de que en el LCR el volumen a utilizar es una limitante ya que entre mayor cantidad de proteínas se requiera más volumen habrá que tomar y en cada carril solo cabe

como máximo 150 μ l y si este es más puede haber problemas de contaminación entre carriles.

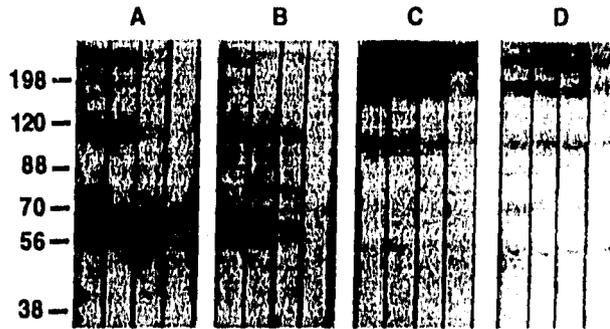


Figura-11 Titulación de anticuerpo. Inmunoelctrotransferencia de un suero normal (A y C) y uno de un paciente con cisticercosis (B y D) tratados en condiciones reductoras (A y B) y en condiciones no reductoras (C y D) revelando con un anticuerpo policlonal anti-EC del cisticerco a diluciones, de 1:25, 1:50, 1:100 y 1:200 por carril de izquierda a derecha..

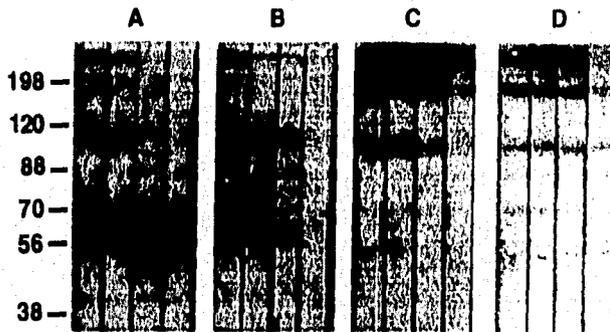


Figura-12 Titulación de conjugado. Inmunoelctrotransferencia de un suero normal (A y C) y uno de un paciente con cisticercosis (B y D) tratados en condiciones reductoras (A y B) y en condiciones no reductoras (C y D) revelando con un anticuerpo policlonal anti-EC del cisticerco y diferentes diluciones del conjugado anti-conejo-peroxidasa: 1:500, 1:750, 1:1000 y 1:2000 por carril de izquierda a derecha.

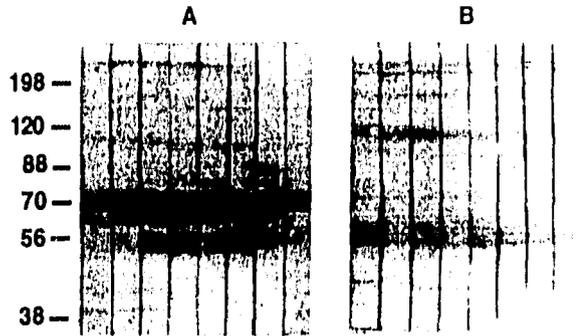


Figura-13 Inmunolectrotransferencia de un suero normal (A) y uno de un paciente con cisticercosis (B), tratados en condiciones reductoras, se colocaron diferentes cantidades de proteínas por carril: 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 y 10 μ g de izquierda a derecha; reveladas con un anticuerpo policlonal anti-EC.

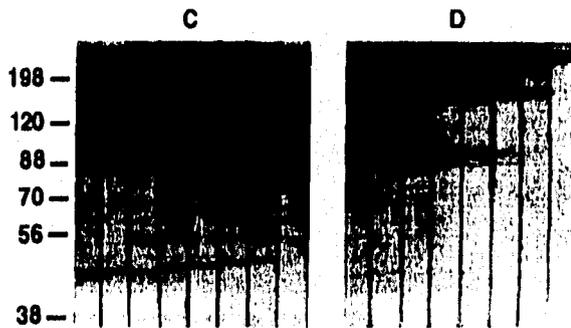


Figura-14 Inmunolectrotransferencia de un suero normal (C) y uno de un paciente con cisticercosis (D), tratados en condiciones no reductoras, se colocaron diferentes cantidades de proteínas por carril: 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 y 10 μ g de izquierda a derecha, reveladas con un anticuerpo policlonal anti-EC.

Cabe señalar que con la finalidad de eliminar la reacción inespecífica en la Inmunolectrotransferencia para muestras de sueros se intentó seguir parte del procedimiento que Estrada y Kunh realizaron en el trabajo en el que caracterizaron 2 antígenos de peso molecular de 190 y 230 kDa (83). (resultados no mostrados). Se vió que con estas condiciones de trabajo se disminuye el efecto de reacción de fondo pero también se disminuye la intensidad de la

reacción en las bandas de los antígenos, por lo que no se realizó este procedimiento.

4. ANÁLISIS DE ANTÍGENOS EN SUERO POR IET.

A) SUEROS DE PACIENTES CON CISTICERCOSIS

Una vez establecidas las condiciones de trabajo para la IET en sueros se procedió a procesar las muestras de los casos seleccionados.

En este caso se observa que en las muestras de suero, tratadas en condiciones reductoras se han identificado 2 antígenos de 183 y de 105 kDa presentes sólo en 1 muestra perteneciente al grupo de pacientes que presentan quistes múltiples (figura 15).

Como se puede observar en las muestras de suero tratadas en condiciones no reductoras, se identificaron 2 antígenos de 97 kDa y de 80 kDa presentes sólo en 2 muestras pertenecientes al grupo de pacientes que presentan quistes múltiples (figura 16).

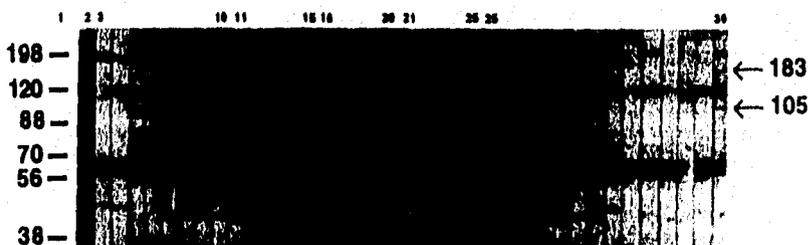


Figura-15. Inmunoelctrotransferencia de muestras de sueros tratadas en condiciones reductoras: 1) Estándar de peso molecular, 2) EC del cisticerco (testigo positivo), 3-10) sueros de personas sanas, 11-15) sueros de pacientes con 1 quiste, 16-20) sueros de pacientes con calcificaciones, 21-25) sueros de pacientes con quistes y calcificaciones, 26-39) sueros de pacientes con quistes múltiples.

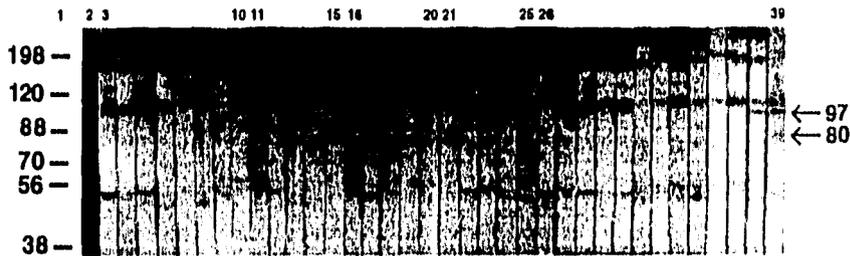


Figura-16. Inmunoelctrotransferencia de muestras de sueros tratadas en condiciones no reductoras: 1) Estándar de peso molecular, 2) EC del cisticerco (testigo positivo), 3-10) sueros de personas sanas, 11-15) sueros de pacientes con 1 quiste, 16-20) sueros de pacientes con calcificaciones, 21-25) sueros de pacientes con quistes y calcificaciones, 26-39) sueros de pacientes con quistes múltiples.

B) SUEROS DE PACIENTES CON OTRAS PARASITOSIS

Se evaluaron por IET muestras de suero de pacientes con otras parasitosis en las mismas condiciones en las que se llevo a cabo para muestras de sueros de pacientes cisticercosos, para analizar la presencia de antígenos de reacción cruzada. En 2 de 3 pacientes con teniosis se identificaron los antígenos de 97 y 105 kDa y la de 183 kDa en 1 de 4 de los pacientes con toxocariosis, presentes también en las muestras de los pacientes con cisticercosis tratadas en condiciones no reductoras. Además de los antígenos ya señalados existe un antígeno de 141 kDa identificado en uno de los pacientes con teniosis, en uno de los que tenía himenolepiosis y en otro con toxocariosis cuando los sueros fueron tratados en condiciones reductoras, dos más de 110 y 120 kDa en 2 de los pacientes con toxocariosis y el de 150 kDa en uno de los pacientes con teniosis, cuando las muestras fueron tratadas en condiciones reductoras (figuras 17 y 18, tabla X).

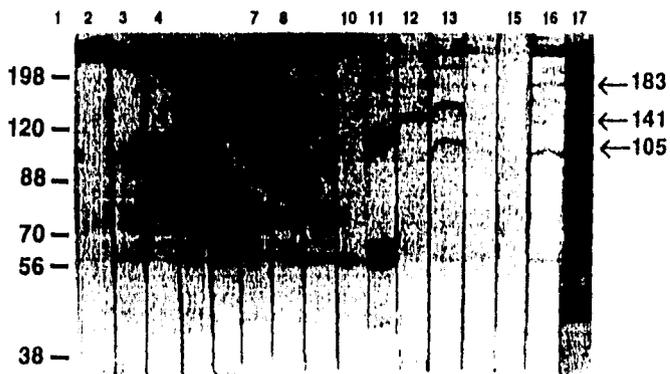


Figura-17 Inmunolectrotransferencia de sueros tratados en condiciones reductoras de pacientes con diferentes parasitosis: en el carril 1) Estándar de peso molecular, 2) toxoplasmosis, 3) hidatidosis, 4-7) toxocariosis, 8-10) triquinaelosis, 11) suero normal, 12) himenolepiosis, 13-15) teniosis, 16) cisticercosis, y 17) EC del cisticerco.

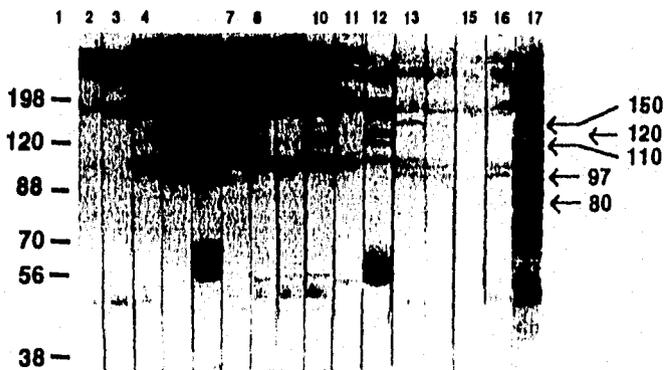


Figura-18 Inmunolectrotransferencia de sueros tratados en condiciones no reductoras de pacientes con diferentes parasitosis: en el carril 1) Estándar de peso molecular, 2) toxoplasmosis, 3) hidatidosis, 4-7) toxocariosis, 8-10) triquinaelosis, 11) suero normal, 12) himenolepiosis, 13-15) teniosis, 16) cisticercosis, y 17) EC del cisticerco.

TABLA-XII ANTÍGENOS PRESENTES EN SUERO DE INDIVIDUOS CON VARIAS PARASITOSIS

| ENFERMEDAD | N | BANDAS EN SUERO EN CONDICIONES: | | | | | | | |
|-----------------|---|---------------------------------|-----|-----|---------------|----|-----|-----|-----|
| | | REDUCTORAS | | | NO REDUCTORAS | | | | |
| | | 105 | 141 | 183 | 80 | 97 | 110 | 120 | 150 |
| CISTICERCOSIS * | 2 | 1 | | 1 | 1 | 2 | | | |
| TENIOSIS | 3 | 2 | 1 | | | 2 | | | 1 |
| HIMENOLEPIOSIS | 1 | | 1 | | | | | | |
| HIDATIDOSIS | 1 | | | | | | | | |
| TOXOCARIOSIS | 4 | | 1 | 1 | | | 2 | 2 | |
| TRIQUINELOSIS | 3 | | | | | | | | |
| TOXOPLASMOSIS | 1 | | | | | | | | |

* Uno de los 2 casos positivo a las cuatro bandas en pacientes con cisticercosis tenía teniosis

5. ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE TRABAJO PARA LCR

Para la estandarización de las condiciones a las cuales se realizó la Inmunoelctrotransferencia en el caso de las muestras de LCR, se corrieron geles a dos concentraciones de acrilamida al 9 y 11 % probando muestras en condiciones reductoras y en condiciones no reductoras, llegando al resultado de que en ambos caso la concentración de acrilamida adecuada fue del 11% (figura 19).

La dilución de anticuerpo y conjugado que se utilizo para realizar la IET de las muestras de LCR es la misma que la que se utilizo en el caso de muestras de sueros. En lo que respecta a la cantidad de muestra de LCR se trabajó también con 40 µg para tratar de tener las mismas condiciones que en suero considerando la concentración de proteínas predeterminada por el método de Bradford y así ajustar la cantidad de proteínas por muestra de LCR.

6. ANÁLISIS DE ANTÍGENOS EN LCR POR IET

Con las condiciones establecidas se procedió a realizar IET a las muestras de LCR observándose el patrón de bandeado que se observa en las figuras 20 y 21.

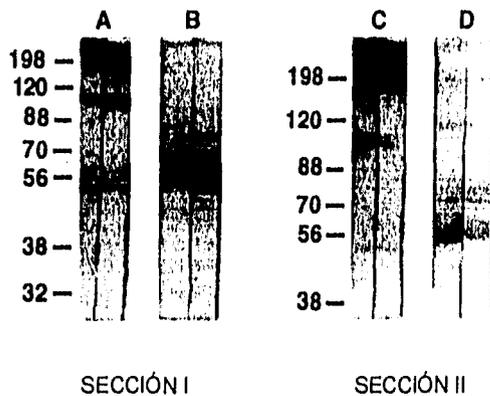


Figura-19 Inmunolectrotransferencia de muestras de LCR tratadas en condiciones reductoras A y no reductoras B al 11% (sección I) y al 9% de acrilamida (sección II).



Figura-20 Inmunolectrotransferencia de los grupos de muestras de LCR de pacientes tratadas en condiciones reductoras: 1) Estándar de peso molecular, 2-11) grupo de LCR de personas con otras patologías en SNC, 12-16) LCR de pacientes con 1 quiste, 17-21) LCR de pacientes con calcificaciones, 22-26) LCR de pacientes con quistes y calcificaciones y 27-41) LCR de pacientes con quistes múltiples.

En las muestras de LCR tratadas en condiciones reductoras se identificaron 3 antígenos cuyos pesos moleculares corresponden a 200, 190 y 50 kDa; solo se observaron muestras de líquidos positivos en el caso de los grupos de pacientes que tienen quistes múltiples y en los que tienen quistes múltiples y calcificaciones. Ver tablas XII, XIII y XIV.

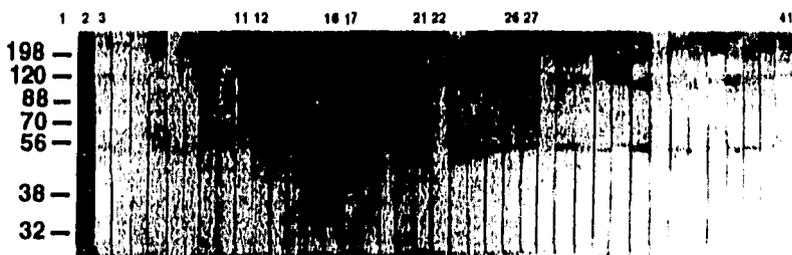


Figura-21 Inmunoelctrotransferencia de los grupos de muestras de LCR de pacientes tratadas en condiciones no reductoras: 1) Estándar de peso molecular, 2-11) grupo de LCR de personas con otras patologías en SNC. 12-16) LCR de pacientes con 1 quiste, 17-21) LCR de pacientes con calcificaciones, 22-26) LCR de pacientes con quistes y calcificaciones y 27-41) LCR de pacientes con quistes múltiples.

Como se puede observar en las muestras de LCR tratadas en condiciones no reductoras no se ha identificado ninguna banda proteica que corresponda a algún antígeno específico en cualquiera de los grupos de pacientes con cisticercosis.

7. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS RESULTADOS POR IET, ELISA-Ac Y

ELISA-Ag

El número total de muestras positivas por IET, a cuando menos un antígeno en los diferentes grupos de pacientes se ilustra en la siguiente tabla XIII.

Un punto importante es que en muestras de LCR hay mas casos positivos (12) que en sueros (2).

En suero las muestras positivas, a cualquiera de las bandas antigénicas que se identificaron con peso molecular de 183, 105, 97 y 80 kDa señaladas en la figura 22, corresponden al grupo de pacientes con quistes múltiples. La localización en este caso es mixta (es decir subaracnoidea e intraventricular o subaracnoidea y parenquimatosa o bien subaracnoidea, intraventricular, y parenquimatosa), a excepción de la banda de 97 que se identifico en pacientes con cisticercos de localización mixta y subaracnoidea, (figura 23). En muestras de LCR son tres las bandas antigénicas cuyo peso molecular es de 200, 190 y 50 kDa, las cuales se identificaron con mayor proporción el grupo de pacientes con quistes múltiples, en menor frecuencia en el de quistes y calcificaciones y nunca en el de quiste único, ni en el de calcificaciones (figura 24). En cuanto a la localización predomina la de pacientes con cisticercos de localización mixta, le

sigue la subaracnoidea y en mucho menos proporción la intraventricular. No hay muestras positivas de LCR de pacientes con cisticercos localizados en el parenquima (figura 25).

TABLA-XIII ANTÍGENOS DEL CISTICERCO DE *T. solium*
IDENTIFICADOS POR IET

| NUMERO Y TIPO DE CISTICERCOS | N | POSITIVOS | POSITIVOS EN | | |
|------------------------------|----|-----------|--------------|-------|-------------|
| | | | LCR | SUERO | SUERO Y LCR |
| QUISTES MÚLTIPLES | 14 | 9 | 9 | 2 | 2 |
| QUISTE UNICO | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CALCIFICACIONES | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| QUISTES Y CALCIF. | 5 | 3 | 3 | 0 | 0 |
| OTROS PROBLEMAS NEUROLOGICOS | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |

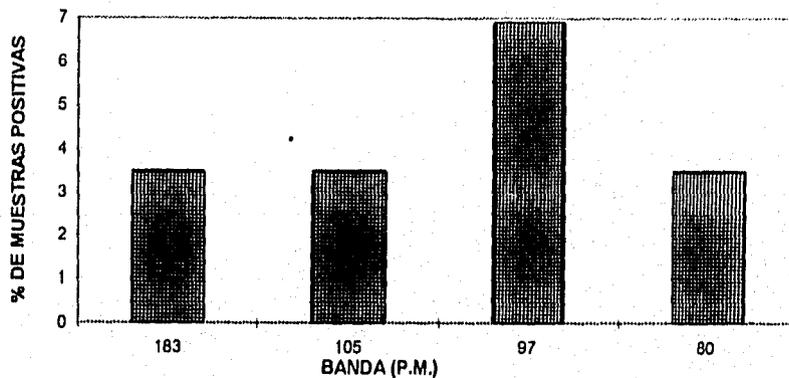


Figura-22. Gráfica del porcentaje de muestras de suero de pacientes con cisticercosis positivas a las bandas de 183, 105, 97 y 80 kDa en relación al tipo y número de cisticercos. Barra con cuadros: quistes múltiples.

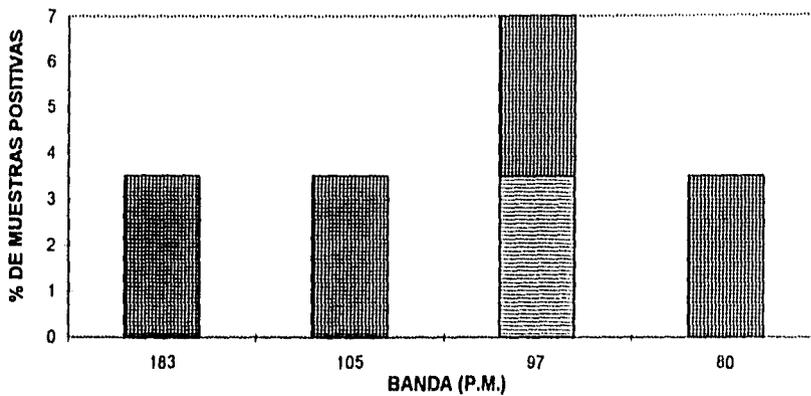


Figura-23. Gráfica del porcentaje de muestras de suero de pacientes con cisticercosis positivas a las diferentes bandas en relación a la localización de los cisticercos en el cerebro. Barra con cuadros: localización mixta, barra con rayas horizontales: subaracnoidea.

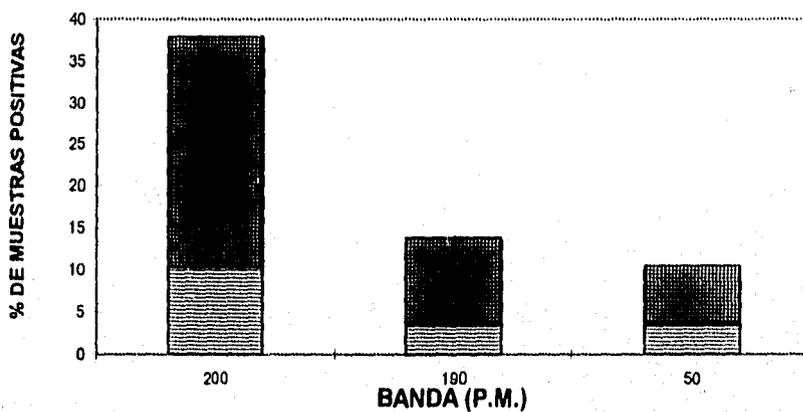


Figura-24. Gráfica del porcentaje de muestras de LCR de pacientes con cisticercosis positivas a las bandas de 200, 190 y 50 kDa en relación al tipo y número de cisticercos. Barra con cuadros: quistes múltiples, barra con rayas horizontales: quistes y calcificaciones.

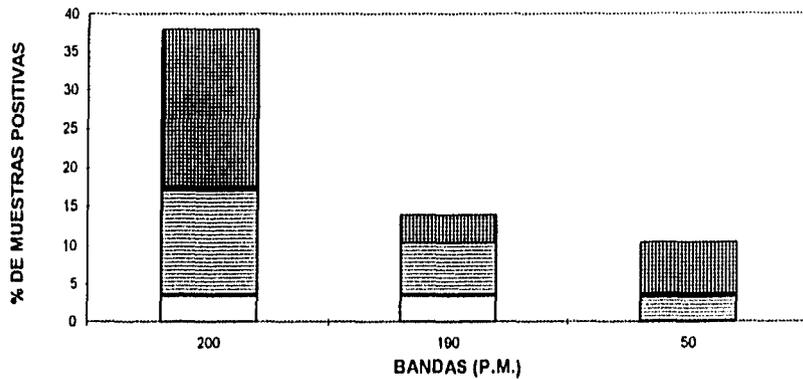


Figura-25. Gráfica del porcentaje de muestras de LCR de pacientes con cisticercosis positivas a las diferentes bandas en relación a la localización de los cisticercos en el cerebro. Barra con cuadros: localización mixta, barra con rayas horizontales: subaracnoidea, barra blanca: intraventricular.

Por otro lado tenemos el número de casos con resultado positivo por IET, ELISA-Ag y ELISA-Ac de los diferentes grupos.

TABLA-XII No. DE CASOS POSITIVOS POR IET-Ag, ELISA-Ag Y ELISA-Ac DE MUESTRAS DE LCR Y SUERO DE PACIENTES CON CISTICERCOSIS.

| GRUPO | MUESTRA | No. | ELISA-Ac | ELISA-Ag | IET-Ag |
|----------------------|---------|-----|----------|----------|--------|
| QUISTES | SUERO | 14 | 6 | 1 | 2 |
| MÚLTIPLES | LCR | 14 | 9 | 3 | 9 |
| QUISTE | SUERO | 5 | 1 | 2 | 0 |
| ÚNICO | LCR | 5 | 3 | 0 | 0 |
| CALCIFICA- CIONES | SUERO | 5 | 0 | 0 | 0 |
| | LCR | 5 | 2 | 0 | 0 |
| QUISTES Y CALCIF. | SUERO | 5 | 2 | 2 | 0 |
| | LCR | 5 | 4 | 1 | 3 |

En la tabla XIV se observa que en el grupo de pacientes con calcificaciones aunque existen anticuerpos en LCR no hay antígenos por ELISA ni por IET en ninguna de las dos muestras. Además de que en el grupo de quistes múltiples y de quistes y calcificaciones el número de muestras positivas a anticuerpos por ELISA es más alta que en los otros dos grupos.

En muestras de suero vemos que por ELISA para anticuerpos se identificaron como positivas al 31.1% (figuras 26 y 27), del cual la mayor parte pertenece al grupo de pacientes con quistes múltiples, le sigue el de quistes y calcificaciones y al final el de un sólo quiste, en cuanto a localización la que predomina es la subaracnoidea y la que le sigue es la parenquimatosa, no hay de localización mixta ni intraventricular. Por ELISA para antígenos es del 17.2 % y de este la mayoría son del grupo de pacientes con un solo quiste y de igual proporción, el de quistes múltiples y el de quistes y calcificaciones, en cuanto a localización se encontraron de tipo subaracnoidea y parenquimatosa, ésta última con una cuarta parte en relación a la primera. Por IET el porcentaje de muestras positivas es del 7 %, únicamente dentro del grupo de pacientes con quistes múltiples y con localización subaracnoidea y mixta en la misma proporción.

En muestras de LCR se puede ver que el 62 % de la población tiene anticuerpos por ELISA (figura 28 y 29), del cual casi la mitad corresponde al grupo de pacientes con quistes múltiples, le sigue el grupo de pacientes con un solo quiste, el de quistes y calcificaciones, y en menor proporción el de calcificaciones; la localización que se tiene en estos es de tipo subaracnoidea, con mayor frecuencia, le sigue la Mixta, la parenquimatosa y con menor proporción la intraventricular. Por ELISA para antígenos existe un 13.8 % de muestras de LCR positivas, estas se encuentran en el grupo de quistes múltiples preferentemente, y de quistes y calcificaciones con menor proporción de muestras positivas, los cisticercos se localizaron en la región subaracnoidea preferentemente y un poco menos en la mixta. Por IET para antígenos se identificó al 41.3% de las muestras de LCR con alguna banda antigénica, la mitad de las muestras positivas corresponde a pacientes con quistes múltiples y el restante a, pacientes con quistes y calcificaciones; la distribución en cuanto a la localización en su mayoría es mixta y subaracnoidea, y en menor proporción intraventricular.

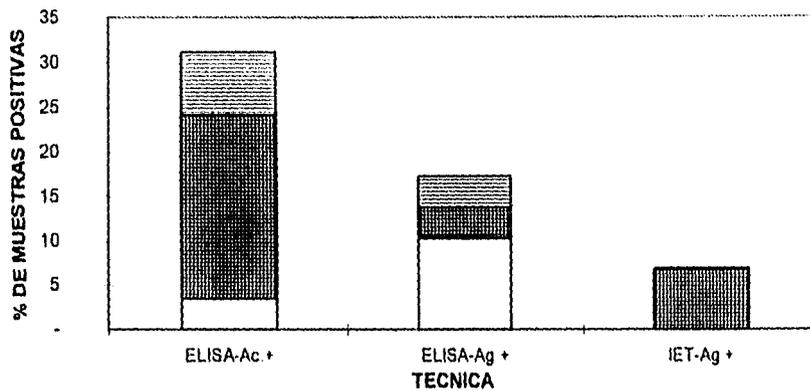


Figura-26. Gráfica del porcentaje de muestras de suero de pacientes con cisticercosis positivas por las técnicas de ELISA-Ac, ELISA-Ag e IET-Ag en relación al tipo y número de cisticercos. Barra con cuadros: quistes múltiples, con rayas horizontales: quistes y calcificaciones, barra blanca: un sólo quiste.

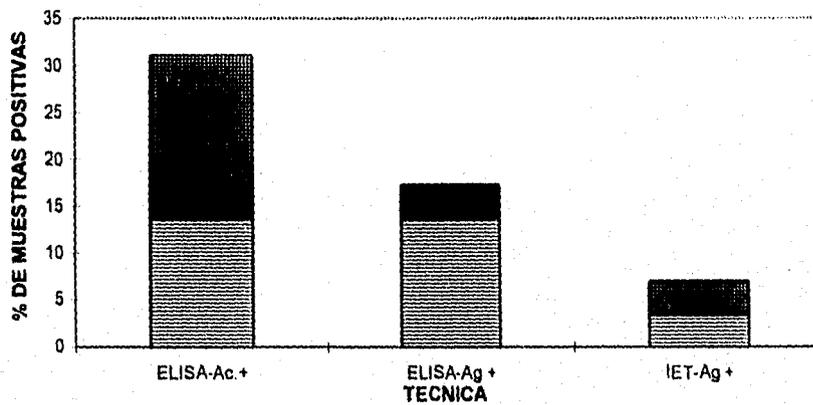


Figura-27. Gráfica del porcentaje de muestras de suero de pacientes con cisticercosis positivas por las técnicas de ELISA-Ac, ELISA-Ag e IET-Ag en relación a la localización de los cisticercos en el cerebro. Barra cuadros: localización Mixta, con rayas horizontales: subaracnoidea y negra: parenquimatosa.

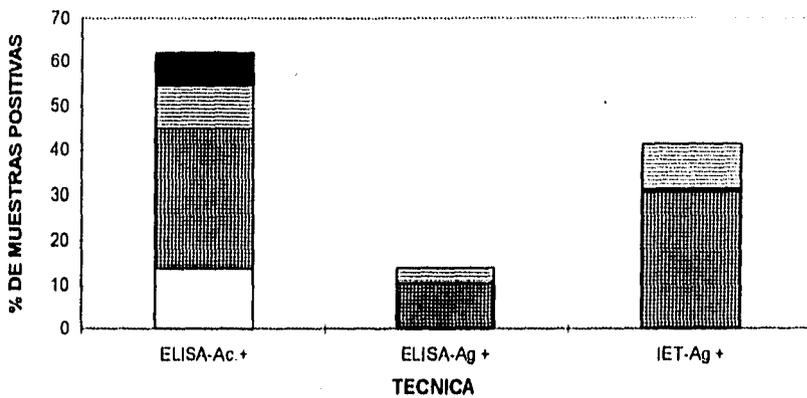


Figura-28. Gráfica del porcentaje de muestras de LCR de pacientes con cisticercosis positivas por las técnicas de ELISA-Ac, ELISA-Ag e IET-Ag en relación al tipo y número de cisticercos. Barra con cuadros: quistes múltiples, barra con rayas horizontales: quistes y calcificaciones, barra blanca: un sólo quiste.

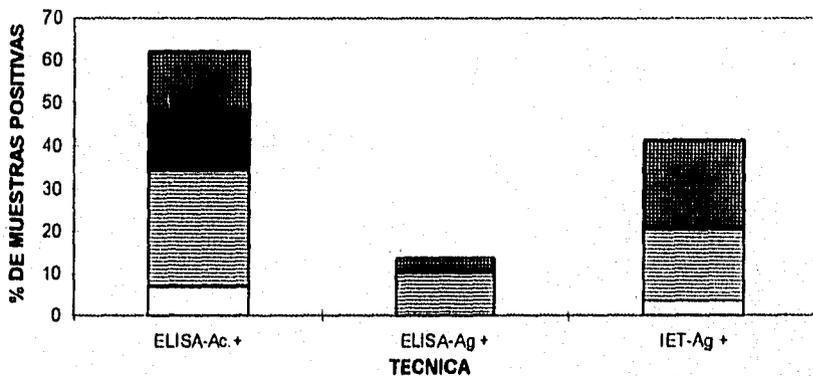


Figura-29. Gráfica del porcentaje de muestras de LCR de pacientes con cisticercosis positivas por las técnicas de ELISA-Ac, ELISA-Ag e IET-Ag en relación a la localización de los cisticercos en el cerebro. Barra con cuadros: localización Mixta, con rayas horizontales: subaracnoidea, blanca: intraventricular y barra negra: parenquimatosa.

VII. DISCUSIÓN

En esta tesis se identificaron algunos antígenos del metacéstodo de *Taenia solium* por IET en muestras de suero y LCR de pacientes con neurocisticercosis confirmada por TAC; dos aspectos muy novedosos fueron: la identificación de antígenos en el suero y el hallazgo de antígenos diferentes a los reportados en LCR. Por otro lado, se logró comparar el patrón antigénico entre el LCR y el suero de cada paciente y se correlacionó con el número, tipo y localización de los parásitos en el cerebro. Finalmente también se identificaron antígenos de reacción cruzada en muestras de suero de pacientes con otras parasitosis.

Durante la etapa de estandarización de las condiciones de trabajo se presentó el problema de reacción de fondo, pues aparecían bandas en muestras de individuos no cisticercosos o testigo negativos, por lo que se trató de llevar a cabo algún procedimiento para eliminar esta reacción. Uno de ellos fue el realizado por Estrada y Kuhn (83), en nuestro caso no tuvo el éxito esperado, ya que al colocar las soluciones de trabajo como son las muestras, el anticuerpo y el conjugado junto con el agente bloqueador (PBS-Leche 3%), se disminuye la unión inespecífica de anticuerpos, pero también la unión de anticuerpos específicos contra las bandas específicas, fenómeno que no fue conveniente para nuestros fines. Otro de ellos surgió al final de la parte experimental y consistió en preadsorber el anticuerpo anti-EC sobre papel de nitrocelulosa que contenía muestras de suero de personas sanas, las cuales fueron sometidas a electroforesis y transferidas, antes de ser usado en los sueros de individuos con cisticercosis. Los resultados demostraron que este procedimiento podría ser útil y aplicable a futuro en otros proyectos, debido a que se logró eliminar reacción de fondo y las bandas antigénicas se evidenciaron correctamente (datos no mostrados).

En lo que corresponde a la identificación de antígenos en muestras de pacientes con cisticercosis, el número de antígenos diferentes identificados fueron 7; 4 en suero y 3 en LCR. En suero los antígenos caracterizados tienen un peso molecular de 183 y 105 kDa cuando las muestras son tratadas en condiciones reductoras, y 97 y 80 kDa cuando las muestras son tratadas en condiciones no reductoras, y en LCR se encontraron bandas de 200, 190 y 50 kDa solo cuando las muestras fueron tratadas en condiciones reductoras. De todas las bandas antigénicas obtenidas, solamente la de 190 kDa puede coincidir con uno de los dos

antígenos reportados por Estrada y Kuhn, ya que el peso molecular corresponde también a 190 kDa, en muestras de LCR tratadas en condiciones reductoras. Por otro lado, podemos decir que las banda de 183 kDa de suero no corresponde a la de 190 kDa presente y LCR, pues se encontraron en condiciones de reducción diferentes. (figuras 17 y 18, tabla XII)

En general en muestras de suero se identificaron antígenos en el 6.9% de los casos y en muestras de LCR en el 37.9%. Es probable que esto se deba a que el SNC es el lugar de preferencia para alojar al cisticerco de *Taenia solium* y por lo tanto el lugar de mayores posibilidades de encontrar antígenos, ya que se sabe que si existe una respuesta local de anticuerpos en el SNC (48, 51, 53) esto indica que deben de existir antígenos que la inducen en el cerebro. La procedencia de los antígenos presentes en suero se puede explicar de tres maneras: una es que los antígenos salgan del LCR junto con componentes que son eliminados hacia el torrente sanguíneo por los plexos coroideos; otra posibilidad es que además de cisticercos en el cerebro también se encuentren parásitos en regiones extracerebrales como son el tejido subcutáneo o el músculo, ya que la posibilidad de encontrar cisticercos en cerebro y en otra región, aunque es muy baja, no se elimina; y por último puede deberse a la presencia de otros parásitos de reacción cruzada, principalmente por teniosis como se puede ver cuando se identificaron antígenos en muestras de pacientes con otras parasitosis, en donde los antígenos de 183, 105 y 97 kDa eran compartidos entre pacientes con teniosis y con cisticercosis y el de 183 kDa también con toxocariosis; no sólo estos se encontraron, también se identificaron antígenos diferentes a los encontrados en sueros de pacientes con cisticercosis que nos sugieren que existen antígenos diferentes con epítomos compartidos entre parásitos; entre ellos está el de 141 kDa presente en sueros de pacientes con teniosis e himenolepiosis que se trataron en condiciones reductoras y los de 110, 120 y 150 kDa cuando las muestras de himenolepiosis y toxocariosis fueron tratadas en condiciones no reductoras.

Por otro lado la presencia de antígenos se ve ligada siempre a la presencia de quistes múltiples, ya sea que los pacientes cuenten o no con calcificaciones, debido a que en muestras de pacientes con calcificaciones o que presentan un solo quiste los resultados son negativos. Por lo tanto, encontramos, una asociación entre la presencia de alguna banda antigénica en suero o en LCR, y el número y tipo de cisticercos presentes que debe ser de más de uno, y estar vivos. Esto era de esperarse, ya que entre mayor número de cisticercos existan, mayor es la liberación de antígenos, de tal forma que cuando existe solamente un quiste,

no se produce una cantidad suficiente de antígenos que puedan ser detectados por la técnica; además el hecho de que se encuentren antígenos cuando los cisticercos están vivos es lógico, ya que el cisticerco vivo es capaz de liberar componentes a la circulación que puedan ser detectables y no así en cisticercos calcificados que se encuentran muertos.

La localización también es un factor importante ya que las posibilidades de encontrar antígenos se ven favorecidas conforme existan mayor número de cisticercos en diferentes regiones en el cerebro; por ejemplo, en suero se requiere de la presencia de cisticercos con localización mixta, es decir que, debe de haber cisticercos en diferentes regiones de tal forma que sean abundantes los antígenos y estos se eliminen por los plexos coroideos a la circulación. En LCR donde la localización es de preferencia de tipo mixta o subaracnoidea y ocasionalmente intraventricular, no se requiere forzosamente de una localización mixta, basta con que existan cisticercos en regiones que se encuentran en contacto con el LCR para poder encontrar antígenos en éste (ver figura 23 y 25). No se encontraron antígenos en ninguno de los casos con localización parenquimatosa, esto debido posiblemente a que el parenquima y las cavidades en donde se encuentra el LCR son diferentes y es poca la liberación de componentes de uno hacia el otro de tal forma que no es posible detectarlos.

En este trabajo esperábamos encontrar antígenos en la mayoría de los pacientes con diagnóstico de cisticercosis, hallazgos comprobados por tomografía; sin embargo, no fue así, existen varias posibilidades que pueden ayudarnos a explicar esto, una de ellas es que para llevar a cabo la parte experimental se utilizó un anticuerpo policlonal que reconocía a más de cuarenta proteínas del cisticerco de *Taenia solium* como antígenos, cuyos epítomos eran de tipo secuencial y de tipo conformacional, es decir, estaban dirigidos contra antígenos secuenciales y conformacionales. El ELISA reconoce antígenos de tipo secuencial y de tipo conformacional a diferencia de la IET, en donde al tratar a la muestra se produce la desnaturalización de sus proteínas o la reducción de éstas, con lo que se pierden posibilidades para encontrar antígenos, así que nosotros esperamos más sensibilidad en ELISA que en IET; esto es cierto para muestras de suero pero no ocurrió lo mismo en LCR, ya que al comparar el porcentaje de muestras positivas por ELISA y por IET para antígenos, vemos que en suero hay más muestras positivas por ELISA que por IET como se pensaba y al contrario en LCR hay más por IET que por ELISA. Se esperaba el mismo resultado en suero que en LCR puesto que se trata de las muestras del mismo paciente, sin embargo

esto se puede deber a la desnaturalización de antígenos en LCR dado que la concentración de proteínas totales es mucho más baja que en suero; estas proteínas protegen la preservación de otras proteínas y por consiguiente mantienen estable la estructura de los epítomos de los antígenos de interés. Esto se podría evitar manteniendo las muestras en mejores condiciones, es decir, desde el momento de la recolección agregar proteínas estabilizadoras que eliminarán esta fuente de error. Otra posible explicación es que el número de antígenos en ambas muestras es mínimo en comparación con el total de antígenos que reconocen los anticuerpos policlonales, es decir que en el reconocimiento de los pocos antígenos en las muestras participa una gama de anticuerpos dirigidos contra muchas proteínas y de estos son muy pocos los que son específicos hacia los antígenos que están presentes.

Los resultados en el número de casos positivos por ELISA para anticuerpos es diferente a la de antígenos por cualquiera de las dos técnicas empleadas, como se puede observar en las figuras 26, 27, 28 o 29 existe un mayor porcentaje de casos positivos por ELISA para anticuerpos que en ELISA y que en IET para antígenos. Estos resultados se deben a que los anticuerpos son más fáciles de identificar porque generalmente se encuentran en mayor cantidad circulando en el organismo y permanecen por más tiempo. Otra razón es que en este caso los pacientes con calcificaciones siguen teniendo anticuerpos como se puede ver en las gráficas de las figuras 26 y 28 cuando los cisticercos estaban vivos se produjeron anticuerpos contra estos y debido a la memoria inmunológica, siguen presentes.

Coincidimos en realizar la observación de que donde hay anticuerpos en LCR y en suero del mismo paciente determinados por ELISA, los resultados de absorbancia son generalmente mayores en LCR que en suero, datos que coinciden con otros trabajos (69 y70)

Este estudio nos ha permitido conocer 7 antígenos diferentes del cisticerco de *Taenia solium* presentes en muestras de suero y LCR de pacientes con cisticercosis y establecer que su identificación se logra cuando existe más de uno, es decir múltiples quistes, los cuales deben estar vivos y localizarse en una región mixta o subaracnoidea preferentemente. Estos hallazgos pueden servir de base a otros trabajos que requieran de la misma información, como por ejemplo que con el uso de anticuerpos monoclonales se haga una identificación de antígenos y que como primera prueba se seleccionen muestras de pacientes que tengan quistes múltiples y de localización mixta para asegurar que se tendrá más éxito en ello.

Además se establece que también hay antígenos de reacción cruzada en muestras de pacientes con toxocariosis, himenolepiosis y teniosis.

IX. CONCLUSIONES

- Se identificaron 7 bandas antigénicas, 3 de ellas en muestras de LCR y 4 en muestras de suero.
- En muestras de LCR los antígenos corresponden a un peso molecular de 200, 190 y 50 kDa en muestras tratadas en condiciones reductoras.
- En suero los antígenos encontrados son de un peso molecular de 183 y 105 kDa, en muestras tratadas en condiciones reductoras y de 97 y 80 kDa en muestras tratadas en condiciones no reductoras.
- La proporción de muestras positivas por inmunoelectrotransferencia a cuando menos la presencia de una banda antigénica en LCR fue del 37.9% (11 de 29 muestras) y en suero de 6.9% (2 de 29 muestras).
- La presencia de antígenos en muestras de LCR se relaciono con individuos con cisticercosis que tienen quistes múltiples con o sin calcificaciones.
- Se encontraron antígenos únicamente en muestras de suero de pacientes con cisticercosis que tienen múltiples quistes.
- No se identificaron antígenos en muestras de suero y LCR de pacientes con un solo quiste o con calcificaciones.
- Se identificaron antígenos en muestras de suero y LCR de pacientes cisticercosos cuando los quistes del metacéstodo de *Taenia solium* se localizaron en la región mixta o subaracnoidea y con menos frecuencia en la región intraventricular.
- No se identificaron antígenos ni en LCR, ni en suero cuando los quistes o calcificaciones se localizaron en la región parenquimatosa.
- Se identificaron 7 antígenos de reacción cruzada con el metacéstodo de *Taenia solium* en muestras de suero, cuando dichas muestras son tratadas en condiciones reductoras, los antígenos corresponden a un peso molecular de 105, 181 y 183 kDa en pacientes con teniosis, toxocariosis e himenolepiosis; y cuando son tratadas en condiciones no reductoras de 97, 110, 120 y 150 kDa en pacientes con teniosis y toxocariosis.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Flisser A. (1994), Taeniasis and Cysticercosis due to *Taenia solium*, cap. 4 págs. 77-116.
2. Correa D. Teniasis y cisticercosis por *Taenia solium*. Una revisión de viejos y nuevos descubrimientos, Cuaderno Técnico del INDRE Secretaría de Salud, México, D.F., 1994, No. 3, 54 pp.
3. Lombardo L. Cisticercosis cerebral, editado por el Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F., 1982, 71 pp.
4. Macías SR y Hernández Peniche J. Cisticercosis cerebral. Prensa Médica Mexicana, 1966, 5:147.
5. Rabiela Cervantes MT. Patología de la neurocisticercosis benigna y grave. En: Flisser A y Malagón F, (eds.), Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigación en México, 1a. ed., Limusa-Noriega México, 1989, págs. 107-124.
6. García HH, Martínez M, Gilman M, Herrera G, Tsang VSW, Pilcher JB, Díaz F, Verastegui M, Gallo C, Porras M, Alvarado M, Naranjo J, Miranda E y the cysticercosis working group in Perú: Diagnosis of cysticercosis in endemic regions. *The Lancet*, 1991, 338:549.
7. Gemmell MA y Lawson JR. The ovine cysticercosis as models for research into the epidemiology and control of the human and porcine cysticercosis *Taenia solium*: I. Epidemiological considerations. *Acta Leidensia*, 1989, 57:165.
8. Mazzoti L y Treviño A. Ensayo de tratamiento con dietilcarbamazina (Hetrazan) en tres casos de cisticercosis humana. *Rev. Inst. Sal. y Enf. Trop.*, México, 1953, No. 13, 209 pp.
9. Mazzoti L. Resultados negativos de Hetrazan en dos casos humanos de cisticercosis ocular. *Rev. Inst. Sal. y Enf. Trop.*, México, 1955, No. 15, 217 pp.
10. Trujillo VM, González BD, Orozco BR, Villanueva DA y Sandoval IM. Tratamiento experimental con metrifonato en cisticercosis. *Arch. Invest. Med. Mex.*, 1981, 12:15.
11. Lombardo L. Tratamiento de la cisticercosis cerebral con flubendazole. Presentado en el IV Congreso Nacional de Parasitología, México, oct., 1980.
12. Spina-Franca A, Nobrega JPS, Livramento JA y Machado LR. Administration of praziquantel in neurocysticercosis, *Trop. Med. Parasit.*, 1982, 33:1

13. Botero D y Castaño S. Treatment of cysticercosis with praziquantel in Colombia. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1982, 31:81.
14. Thomas H, Andrews P y Mehlhorn H. New results of the effect of praziquantel in experimental cysticercosis. Am. J. Trop. Med. Hyg, 1982, 31:803.
15. Frohbrg H y Schulse SM. Toxicological profile of praziquantel a new drug against Cestode and Schistosome infections, as compared to some other schistosomicides. Arzeim.-Forsh, Drug. Res. 1981, 31:3.
16. Leopold G, Ungethven W, Groll E, Diekmann HW, Nowak H y Wegner DHG. Clinical pharmacology in normal volunteers of praziquantel. A new drug against Schistosome and Cestodes. Europ. J. Clin. Pharm., 1978, 14:281.
17. García Domínguez C, Correa D, Rabiela MT y Flisser A. Praziquantel treatment of muscle *Taenia solium* cysticercosis. 4. Reversible in vitro effect. Parasitol. Res., 1991, 77:691.
18. Flisser A, Gonzalez D, Plancarte A, Ostrosky P, Montero R, Stephano A y Correa D. Praziquantel treatment of porcine brain and muscle *Taenia solium* cysticercosis. 2. Immunological and cytogenetic studies. Parasitol. Res. 1990, 74:640.
19. Flisser A, González D, Skurovich M, Madrazo I, Correa D, Rodríguez Carvajal E, Cohen S, Rodríguez Del Rosal E, Collado M, Fernández B, Fernández F y Alija A. Praziquantel treatment of porcine brain and muscle *Taenia solium* cysticercosis. 1. Radiological physiological and histopathological studies. Parasitol. Res., 1990, 76:263.
20. Keilbach Ma. N, Aluja SA, y Sarti-Gutierrez E, A programme to control taeniasis-cisticercosis (*Taenia solium*): experiences in a Mexican village. Acta Leidensia, 1989, 57:2:181.
21. Schenone H, Villarroel F, Rojas A, Ramirez R., Epidemiology of human cysticercosis in Latin America. En: Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C. Ridaura C y Beltran F (eds). Cysticercosis, present state of knowledge and perspectives. Academic Press, N.Y., 1982, págs. 25-38.
22. Schenone H, Rojas A, Ramirez R. Aspectos epidemiológicos de la neurocisticercosis en América Latina. Bol. Chile Parasitol., 28:61.
23. Acevedo HA, Economic impact of porcine cysticercosis. En: Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C y Beltran F (eds). Cysticercosis, present state of knowledge and perspectives. Academic Press, N.Y., 1982, págs. 63-68.

24. Flisser A. Neurocysticercosis in Mexico. *Parasitol. Today*, 1988, 4:131.
25. Costero I. Cisticercosis del sistema nervioso. En: *Tratado de anatomía patológica*, Tomo II, de Atlante, México, 1946, 26 pp.
26. Briseño CE, Biagi F, Martínez B. Cisticercosis observaciones sobre 97 casos de autopsia. *Prensa Médica Mexicana*, 1961, 26:193.
27. Marquez M y Austria B. Cisticercosis en el Hospital General de México. Estudio anatomopatológico de 155 casos. *Rev. Lat. Amer. Pat.*, 1969, 8:79.
28. Macias V y Maqueo M. Cisticercosis cerebral. *Rev. Invest. Clín.* 1958, 10:443.
29. Flores BF y Velasco AF. Principales padecimientos encontrados en en las necropsias de algunos Hospitales de la Ciudad de México. Hallazgos en el Hospital General, Centro Médico Nacional. *Gaceta Médica de México*, 1971, 102:208.
30. Rabiela MT, Lombardo L, Flores BF. Cisticercosis cerebral: análisis de 68 casos de autopsia. *Patol. Méx.*, 1972, 10:27.
31. Rabiela MT, Rivas HA y Rodríguez L. Consideraciones anatomopatológicas sobre la cisticercosis cerebra como causa de muerte. *Patol. Méx.*, 1979, 17:119.
32. Albores SJ, Altamirano DM. Algunas consideraciones sobre 9412 autopsias realizadas en el Hospital General de México. *Rev. Invest. Sal. Públ.*, 1971, 31:1.
33. Sarti E, Situación actual de la Teniasis/Cisticercosis en las Americas. Centro de Referencia Epidemiológica, SSA.
34. Goldsmith RS, Kagan IG, Reyes G, Cedeño JF. Estudios seroepidemiológicos realizados en Oaxaca, México. *Bol. Ofna. Sanit. Panam.*, 1971, 71:500.
35. Flisser A, Bulnes I, Díaz MN, Luna R, Woodhouse E, Beltrán F, Martínez I y Larralde C. Estudios seroepidemiológicos de la cisticercosis humana en poblaciones predominantemente indígenas y rurales del Estado de Chiapas. *Arch. Invest. Med.*, 1976, 7:107.
36. Sarti E, Epidemiología de la Teniasis-Cisticercosis. En Flisser A y Malagón F, (eds.), *Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigación en México*, 1a. ed., Limusa-Noriega México, 1989, págs. 233-242.

37. Woodhouse E, Flisser A, Larralde C, Willms K, Laclette JP, Ridaura C y Beltrán F. Seroepidemiology of human cysticercosis in México, Cisticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press, N. Y., 1982, págs. 11-24.
38. Larralde C, Padilla A, Hernández M, Govezensky T, Scuitto E, Gutiérrez G, Tapía-Conyer R, Salvatierra B, y Sepulveda AJ. Seroepidemiología de la cisticercosis en México. Salud Pública de México, 1992, **34**:2:197.
39. Sarti E. La Teniasis/Cisticercosis en México, (revisión bibliográfica). Salud Pública de México, 1986, **28**:556.
40. Díaz Camacho S, Candil RA, Uribe BM y Willms K. Serology as an indicator of *Taenia solium* tapeworm infections in a rural community in México. Trans. Royal. Soc. Trop. Med. and Hyg., 1990, **84**:563.
41. Larralde C, Laclette JP, Owen Ch, Madrazo I, Sandoval M, Bojalil R, Scuitto E, Contreras L, Arzate J, Díaz ML, Govezensky T, Montoya RM y Goodsaid F. Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid. ELISA and Hemagglutination test. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1986, **35**:5:965.
42. Díaz Camacho S, Candil RA, Suate PV, Zazueta R, Félix M, Lozano R, Willms K. Epidemiologic study and control of *Taenia solium* infections with praziquantel in a rural village of México. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1991, **45**:4:522.
43. Tsang VCW, Brand JA, Boyer AE. An Enzyme linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosis of human cysticercosis (*taenia solium*). J. Infec. Dis., 1989, **159**:1:50.
44. Sarti E, Schantz MP, Plancarte A, Wilson M, Gutierrez O, Aguilera J, Roberts J, y Flisser A. Epidemiological investigation of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a village of Michoacan State, México. Trans. Royal. Soc. Trop. Med. and Hyg., 1994, **88**:49.
45. Tapía Romero R. Seroprevalencia de anticuerpos anti-cisticercos de *Taenia solium* en Cerritos, San Luis Potosí, Tesis de Licenciatura, FES-Cuatitlan, UNAM, 1995, 69 pp.
46. Aranda Alvarez JG, Tapía Romero R, Alcantara Anguiano I, Meza Lucas A, Mata Ruiz O, Celis Quintal G, Grijalva Otero G, Correa Beltrán D. Human cysticercosis: risk factors associated with circulating serum antigens in an open community of San Luis Potosí, México, Ann. Trop. Med. and Parasitol., 1995, **89**:6:689.
47. Aluja A, Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C and Beltrán F. (eds). Frequency of cysticercosis in México, Cisticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press, N. Y., 1982, pp. 53-62.

48. Espinoza B, Ruiz-Palacios G, Tovar A, Sandoval MA, Plancarte A y Flisser A. Characterization by enzyme-linked-immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, 1986, **24**:536.
49. Rosas N, Sotelo J y Nieto D. ELISA in the diagnosis of neurocysticercosis. *Arch. Neurol.*, 1986, **43**:353.
50. Plancarte A, Espinoza B, Flisser A. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Child's Nerv. Syst.*, 1987, **3**:203.
51. Estañol B, Juárez H, Irigoyen Ma. del C, González-Barranco D y Corona T. Humoral immune response in patients with cerebral parenchymal cysticercosis treated with praziquantel. *J. Neurol. Neurosurgery and Psychiatry* 1989, **52**:254.
52. Flisser A, Woodhouse E y Larralde E, Human cysticercosis: antigens and antibodies and non responders, *Clin. Exp. Immunol.* 1980, **39**:27.
53. Miller BL, Heiner D y Goldberg MA. The immunology of cerebral cysticercosis, *Bull. Clin. Neurosci.*, 1983, **48**:18.
54. Cho SY, Kim SI, Kang SY y Park AJ. Intracranial synthesis of specific IgG antibody in cerebrospinal fluid of neurocysticercosis patients, *Korean J. Parasit.* 1988, **26**:15.
55. Miller B., Myers A., Goldberg M., Cerebral cysticercosis diagnosis by a specific IgG antibody. *Neurol.*, 1982, **32**:79.
56. Wilson M., Bryan RT, Fried JA, Ware DA, Schantz PM, Pilcher JB y Tsang VCW. Clinical Evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis, *J. Infect. Dis.*, 1991, **164**:107.
57. Correa D, Dalma D, Espinoza B, Plancarte A, Rabiela MT, Madrazo I, Gorodesky C y Flisser A. Heterogeneity of humoral immune components in human cysticercosis. *J. Parasit.* 1985, **71**:535.
57. Correa D., Cisticercosis humana: relación inmunológica huésped-parásito. En: Flisser A. y Malagón F. (eds.), *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México.* Limusa-Noriega, México D.F., 1989, págs. 31-44.
59. Pérez Ishiwara DG. Procesamiento de antígenos somáticos y de excreción-secreción del cisticerco de *Taenia solium* por macrófagos. Tesis de Licenciatura, Facultad de ciencias, UNAM, 56 pp.

60. Lacleste J.P., Merchant Marie T. and Kaethe W., Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *Taenia solium*, J. Parasitol, 1987, **73**:1:121.

61. Plancarte A, Flisser A and Larralde C. Fibronectin-like properties in antigen B from the cysticercus of *Taenia solium*, Citobios. 1983, **36**:83.

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

63. Correa D, Lacleste JP, Rodríguez-Del-Rosal E, Merchant M y Flisser A. Heterogeneity of *Taenia solium* cysticerci obtained from different naturally infected pigs. J. Parasitol., 1987, **73**:443.

64. Flisser A, Tratamiento de cisticercosis porcina con praziquantel. En: Flisser A y Malagón F (eds.), Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Limusa-Noriega, México D.F., 1989, pp. 227-230.

65. Aluja A, La histopatología de la cisticercosis porcina. En: Flisser A y Malagón F (eds.), Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Limusa-Noriega, México D.F., 1989, pp 147-156.

66. Manual, Curso teórico-práctico de Diagnóstico de Cisticercosis-Triquinelosis", Publicaciones INDRE- Depto. de Inmunoparasitología, 1994, 49 pp.

67. Towbin HT, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, **76**:4350.

68. Plancarte A, Fexas M y Flisser A. Reactivity in ELISA and Dot Blot of purified GP24, and immunodominant antigen of *Taenia solium*, for the diagnosis of human neurocysticercosis. Int. J. Parasitol., 1994, **22**:3:1.

69. Corona T, Pascoe D, Gonzalez-Barranco D, Abad P, Landa L. y Estañol B. Anticysticercous antibodies in serum and cerebrospinal fluid in patients with cerebral cysticercosis, J. Neurol., Neuros. and Psych., 1986, **49**:1044.

70. Zini D, Farrell VJR y Wadee AA. The relationship of antibody levels to the clinical spectrum of human neurocysticercosis, J. of Neurol. Neuros. and Psych., 1990, **53**:656.

71. Nascimento E, Tavares CA y Lopes JD. Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*) with antigens purified by monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol., 1987, **25**:7:1181.

72 Espinoza B. y Flisser A., Antigenos específicos y de reacción cruzada de helmintos parásitos, Arch. Invest. Méd., 1986, Vol. 17, No. 3, págs. 299-311.

73. Capron A, Biguet J, Vernes A y Afchain D. Structure antigenique des helminthes, Aspects immunologique des relation Hote-parasite. Pathol. Biol., 1968, **16**:121.
74. Larralde C, Montoya RM, Sciutto E, Díaz ML, Govezensky T y Coltorti E. Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. Am. J. Trop. Med. and Hyg., 1989, **40**:3:282.
75. Gottstein B, Tsang VCWr y Schantz MP. Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *Taenia aolium* metacestode antigens, Am. J. Trop. Med. and Hyg. 1986, **35**:2:308.
76. Velasco OC, Guzmán BC, Gutiérrez QM, Romero V y Pulido RMa. Comparación de una técnica de detección de antígenos solubles de *Cisticercus cellulosae*. Salud Publica de México, 1983, **25**:2:205.
77. Tellez-Girón E, Ramos M, Dufour L, Alvarez P y Montante M. 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., 1987, **37**:169.
- 78- Estrada JJ y Kuhn ER, Immunochemical detection of antigens of larval *Taenia solium* and anti-larval antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis, J. Neurol. Sciences, 1985, **71**:39.
79. Correa D, Sandoval MA, Harrison LJS, Parkhouse RME., Plancarte A, Meza-Lucas A y Flisser A Human neurocysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg., 1989, **83**:814.
80. Correa D, Plancarte A, Sandoval MA, Rodriguez del Rosal E, Meza-Lucas A y Flisser A., Immunodiagnosis of human and porcine cysticercosis. Detection of antibodies and parasite products. Acta Leidensia, 1989, **57**:93.
81. Alcántara Anguiano Ma.I. Búsqueda de antígenos del cisticerco de *Taenia solium* en una población abierta de Cerritos, San Luis Potosí, Tesis de Licenciatura, Facultad de ciencias, UNAM, 1995, 66 pp.
82. Estrada JJ, Almon-Estrada J y Kuhn ER. Identification of *Taenia solium* antigens in cerebrospinal fluid and larval antigens from patients with neurocysticercosis. Am. J. Trop. Med. and Hyg., 1989, **41**:50.

83. Choromaski L, Estrada JJ y Kuhn RE. Detection of antigens of larval *Taenia solium* the cerebrospinal fluid of patients with the use HPLC and ELISA. J. Parasit., 1990, **46**:1:69.

84. Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 1976, **72**:248.

85.- Lemmli V. Cleavage of structural proteins during assembly at the head of bacteriophage T4. Nat., 1970, **227**: 680.

APENDICE DE SOLUCIONES

I). Sol. PB 10X

| | |
|--|---------|
| NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O | 2.62 g |
| Na ₂ H ₂ PO ₄ anhidro | 11.5 g |
| H ₂ O | 1000 ml |

Si las sales están en otros grados de hidratación, las cantidades a pesar varían y deben corregirse. MANTENER A 4°C.

II). Sol. PBS pH 7.2

| | |
|------------------------|---------|
| PB 10X | 100 ml |
| NaCl | 8.75 g |
| H ₂ O | 1000 ml |

MANTENER A 4°C.

III) PHMB (sal sódica de p-hidroximercuribenzoato)..... 160 mg

| | |
|--------------|------|
| NaOH 2N..... | 1 ml |
|--------------|------|

Disolver con agitación constante. MANTENER A -20°C.

IV) PMSF 100 mM (fenilmetil sulfonyl fluoruro) 24 mg

| | |
|-----------------------------------|------|
| Isopropanol o etanol al 70% | 1 ml |
|-----------------------------------|------|

Disolver con agitación constante. MANTENER A -20°C.

VI) TLCK 5x (N-a-p-tosil-L-lisina clorometil cetona)..... 5 mg

| | |
|------------------------|------|
| H ₂ O | 1 ml |
|------------------------|------|

Disolver con agitación constante y prepararla al momento. A partir de esta solución 5x, se hace una dilución para obtener una de [1 mg/ml].

MANTENER

A -20°C.

V) TPCK 5x (N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona)..... 5 mg

| | |
|---------------|------|
| Metanol | 1 ml |
|---------------|------|

Disolver con agitación constante y prepararla al momento. A partir de esta solución 5x se hace una dilución para obtener una de [1 mg/ml]. MANTENER

A -20°C.

VII). BSA 1 mg/ml

| | |
|-----------|--------|
| BSA | 100 mg |
|-----------|--------|

| | |
|-----------------------------------|--------|
| Aforar con H ₂ O | 100 ml |
|-----------------------------------|--------|

MANTENER A -20°C.

VIII). Sol. amortiguadora de carbonatos 0.1 M pH 9.6

| | |
|---------------------------------------|--------|
| Na ₂ CO ₃ | 3.18 g |
|---------------------------------------|--------|

| | |
|--------------------------|--------|
| NaHCO ₃ | 5.86 g |
|--------------------------|--------|

| | |
|------------------------|------|
| NaN ₃ | 4 mg |
|------------------------|------|

| | |
|------------------------|---------|
| H ₂ O | 1000 ml |
|------------------------|---------|

MANTENER A 4°C.

- IX). Sol. PBS pH 7.2-Tween 20 al 0.05%
- | | |
|------------------------|--------|
| PB 10X | 100 ml |
| NaCl | 8.75 g |
| H ₂ O | 900 ml |
| Tween 20 | 500 µl |
- MANTENER A 4°C.
- X). Sol. de albúmina sérica bovina (ASB) al 1%-PBS pH 7.2-Tween 20 al 0.05%
- | | |
|-----------------------------|--------|
| ASB | 1.0 g |
| Tween 20 | 50 µl |
| Sol. Stock PBS pH 7.2 | 100 ml |
- XI). Acido cítrico 0.1M.
- | | |
|------------------------|---------|
| Acido cítrico..... | 21 g |
| H ₂ O | 1000 ml |
- MANTENER a 4°C.
- XII). Citrato de sodio 0.1M.
- | | |
|------------------------|---------|
| Citrato de sodio | 29.11 g |
| H ₂ O | 1000 ml |
- MANTENER a 4°C.
- XIII). Sol. H₂SO₄ 2 N
- | | |
|--------------------------------------|---------|
| H ₂ SO ₄ | 37 ml |
| H ₂ O | 1000 ml |
- Mantener a temperatura ambiente.
- XIV). Acrilamida-Bisacrilamida al 30%.
- | | |
|-----------------------------------|--------|
| Acrilamida | 29.2 g |
| Bis-acrilamida | 0.8 g |
| Aforar con H ₂ O | 100 ml |
- La solución de acrilamida-bisacrilamida es neurotóxica por lo que debe prepararse usando guantes y cubrebocas. MANTENER A 4°C.
- XV). Tris-base (tris-hidroximetil aminometano) 2 M pH 8.8
- | | |
|-----------------------------------|---------|
| Tris-base | 60.55 g |
| Aforar con H ₂ O | 250 ml |
- Esta solución es difícil de ajustar por lo que se requiere p.e. para un volumen de 100 ml, agregar 90 ml de H₂O, bajar el pH con HCl y entonces aforar. MANTENER A 4°C.
- XVI). SDS (dodecil sulfato de sodio) al 10%.
- | | |
|----------------------------------|--------|
| SDS..... | 10 g |
| Aforar con H ₂ O..... | 100 ml |
- MANTENER A 4°C.
- XVII). Persulfato de amonio (PSA) al 10%.
- | | |
|----------------------------------|--------|
| PSA | 10 g |
| Aforar con H ₂ O..... | 100 ml |
- MANTENER A -20°C

- XVIII). Tris-HCl (cloruro de tris-hidroximetil aminometano) 2 M pH 6.8
 Tris-HCl 79 g
 Aforar con H₂O 250 ml
 MANTENER A 4°C.
- XIX. Marcadores de peso molecular.
 Preparar por separado
 BSA [1 mg/ml] 1 ml de H₂O
 Lisozima [1 mg/ml] 1 ml de H₂O
 IgG [1 mg/ml] 1 ml de H₂O
 Tomar el volumen adecuado de cada proteína para tener la concentración
 querida. p.e. para obtener 50 µg de marcadores, mezclar 16.6 µl de BSA +
 16.6 µl de Lisozima + 16.6 µl de IgG, y agregar 50 µl de coctel con
 2-mercaptoetanol. MANTENER A -70°C.
- XX). Sol. amortiguadora de muestra para PAGE (Coctel).
 SDS al 10% 5 ml
 EDTA 37 mg
 Glicerol 5 ml
 Tris-HCl 2 M pH 6.8 1.25 ml
 Azul de bromofenol unos granitos
 Aforar con H₂O 50 ml
 En caso de que se requiera, agregar 10 µl de 2-mercaptoetanol/ml.
 MANTENER A -20°C en alícuotas de 1 ml.
- XXI). Tris-glicina 5X.
 Tris-base 12 g
 Glicina 57.6 g
 Aforar con H₂O 1 lt
 MANTENER A 4°C.
- XXII). Sol. amortiguadora de corrida.
 Tris-glicina 5x 200 ml
 SDS al 10% 8 ml
 Aforar con H₂O 1 lt
 MANTENER A 4°C.
- XXIII). Sol. amortiguadora de transferencia.
 Tris-base 2 M 12.5 ml
 Glicina 0.193 M 14.49 g
 Metanol al 20% 200 ml
 Aforar con H₂O 1000 ml
 MANTENER A 4°C.
- XXIV). Rojo de Ponceau S al 0.2%.
 Rojo de Ponceau S 200 mg
 Ac. tricloroacético (TCA) al 3% (3 g de TCA en 100 ml H₂O)..... 100 ml
 MANTENER A 4°C

- XXV). Leche Sveltes al 5%.
 Leche 5 g
 Aforar con PBS pH 7.2-Tween 20 al 0.05% 100 ml
 Se prepara al momento.
- XXVI). Sol. de revelado.
 4-cloro-1-naftol 25 mg
 Metanol 5 ml
 PBS (sol. IV)..... 25 ml
 H₂O 3% 25 µl
 El 4-cloro-1-naftol se diluye primero en el metanol y posteriormente se mezcla con el PBS y el agua oxigenada.
- XXVII). Azul de Coomassie (0.06%).
 Azul de Coomassie 300 mg
 Metanol al 30% 150 ml
 Ac. acético al 10% 50 ml
 H₂O 300 ml
 MANTENER A TEMPERATURA AMBIENTE en frasco ámbar.
- XXVIII). Acido acético al 10%.
 Ac. acético 100 ml
 H₂O 900 ml
 MANTENER A TEMPERATURA AMBIENTE.

ESTA TESIS NO DEBE
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

GLOSARIO DE TERMINOS

APRAXIA: se refiere a la incapacidad del paciente de llevar a cabo un movimiento hábil o complejo cuando se le ordena o cuando así lo desea y es causada por lesiones encefálicas.

ASINERGIA: trastornos en la actividad normal, coordinada e integrada de los grupos musculares.

ATAXIA: insuficiencia en la coordinación muscular normal, causada por lesiones a nivel del cerebelo. Los signos característicos son vértigo, trastornos del equilibrio e irregularidad del movimiento.

ATROFIA OPTICA: estado en el cual hay pérdida visual o ceguera, originada por lesiones en el nervio óptico.

CEFALEA: dolor de cabeza.

COMA: Estado de inconsciencia en el cual no se puede hacer reaccionar al paciente a consecuencia de tumores, hemorragia o alguna otra causa que produce lesión en el mesencefalo o en la región hipotálamica.

CAMBIOS MENTALES: cambios obvios en la personalidad, inteligencia general, temperamento del paciente o en la conducta diaria.

CONVULSIONES: hipertonia de músculos esqueléticos, temblores y retraso en la capacidad de iniciar movimientos voluntarios, se debe a función inadecuada o lesión de los ganglios basales del cerebro.

DIPLOPIA o visión doble: estado en el cual los músculos oculares están débiles o paralizados y actúan desigualmente, de modo que las imágenes retinianas del mismo objeto en cada ojo no se fusionan y en lugar de ver una imagen, se ven dos imágenes del mismo objeto.

DISMETRIA: insuficiencia para evaluar la distancia del movimiento voluntario, causada por lesiones a nivel del cerebelo.

HEMIANOPSIAS: son de dos tipos, la *hemianopsia homónima* que es la ceguera parcial que afecta al mismo lado de ambos campos visuales, causada por una lesión que afecta una cintilla óptica y produce pérdida de la mitad del campo visual, y la *hemianopsia heterónima* que es la ceguera parcial que afecta al lado opuesto de cada campo visual, causada por lesiones que afectan al quiasma óptico y como consecuencia se produce destrucción de las fibras nerviosas ópticas.

ILUSIONES OPTICAS: errores en la visión que corresponden a la incorrecta interpretación en el cerebro de imágenes visuales, en lo que se refiere a juicio de tamaño y forma, así como percepción de relaciones entre diversos objetos y la distancia entre ellos.

TEMBLORES: trastornos hiperkinéticos del movimiento de tipo involuntario o voluntario, se trata de movimientos burdos, irregulares y arrítmicos que se deben a lesiones a nivel del cerebro.

TRASTORNOS DEL LENGUAJE: incapacidad o defecto de la comprensión de las palabras escritas y habladas y la expresión de las ideas por medio de la escritura y el lenguaje mismo, debido a lesiones en el hemisferio categórico del cerebro que se ocupa del aprendizaje y la memoria.

TRASTORNOS SENSORIALES: deficiencia de apreciar a todos los estímulos sensitivos a los cuales se está expuesto en forma constante durante la vida normal, como son el olfato, el gusto, la visión, el tacto, ect.

TRASTORNOS MOTORES: falta de coordinación de todas las actividades físicas que requieren de movimiento coordinado.

VÉRTIGO: falsa impresión de que ocurre movimiento y el sugeto percibe que el medio externo gira alrededor de él o que él mismo gira en el espacio es causada por enfermedades neurológicas o viscerales.

VOMITO: es un mecanismo por el cual el tubo degestivo alto, vacía su contenido en respuesta a irritación intensa, hiperexitabilidad o distensión excesiva.