

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

11281  
2  
2ej

**Características de la Respuesta Inmune a  
Trichinella spiralis**

Tesis

Que para obtener el Título de  
*Doctor en Ciencias Biomédicas,*  
*Area de Inmunología*

Presenta:

**M. en C. MARIA ALEJANDRA MORENO GARCIA**

Guadalupe, Zacatecas, México. 1994

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

UNAM



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Este trabajo fue realizado en el Centro de Biología Experimental de la Universidad Autónoma de Zacatecas, bajo la dirección del Dr. Rafael Herrera Esparza.**

## INDICE

	Página
<b>ABREVIATURAS</b>	i
<b>RESUMEN</b>	ii
<b>INTRODUCCION</b>	1
<b>OBJETIVOS</b>	10
<b>JUSTIFICACION</b>	10
<b>HIPOTESIS</b>	10
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	10
<b>RESULTADOS</b>	16
<b>DISCUSION</b>	30
<b>CONCLUSIONES</b>	34
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	35

## ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
ADCC	Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo
Ag	Antígeno
AM	Anticuerpo monoclonal
ASB	Albúmina sérica bovina
AST	Antígeno soluble de <u>Trichinella spiralis</u>
C3	Fracción 3 del complemento
CD4	Marcador de superficie de células T cooperadoras
CD8	Marcador de superficie de células T citotóxicas
CIEF	Contrainmunolectroforesis
ELISA	Análisis inmunoenzimático
EGPA	Electroforesis en gel de poliacrilamida
kD	kilo Dalton
IDD	Inmunodifusión doble
IET	Inmunolectrotransferencia
IEF	Inmunolectroforesis
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
Ig	Inmunoglobulina
IP	Inmunoperoxidasa
LA	Larva adulta
LB	Linfocitos B
LI	Larva infectante
LRN	Larva recién nacida
LT	Linfocito T
PM	Peso molecular
RI	Respuesta inmune
RIH	Respuesta inmune humoral
rpm	Revoluciones por minuto
SSB	Solución amortiguadora salina-borato
SSF	Solución amortiguadora salina-fosfato
TEMED	Tetra-etil-metilen-diamina
WB	Western blot
UCi	Unidades Curie

## RESUMEN

En este trabajo se estudia la respuesta inmune humoral en un modelo experimental en conejos infectados con larvas musculares de Trichinella spiralis. Los animales controles fueron conejos aparentemente sanos.

La respuesta humoral se evaluó durante 12 semanas determinando los niveles de anticuerpos contra el antígeno soluble de Trichinella spiralis (AST) por técnicas inmunoserológicas como: precipitación en gel (CIEF, IEF, IDD), inmunofluorescencia indirecta (IFI), inmunoperoxidasa (IP) y Western blot (WB).

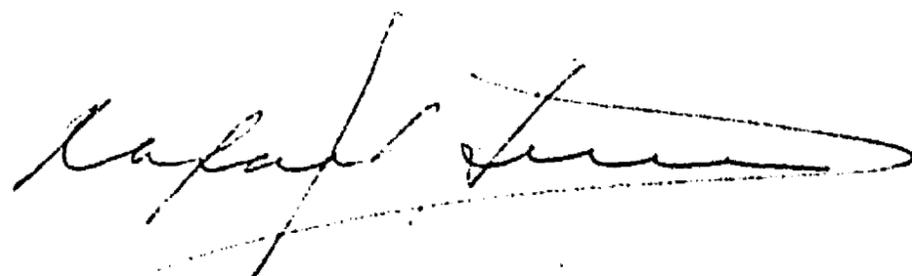
A la 4 semana después de la infección, los animales presentaron anticuerpos circulantes anti-trichinella que reconocían de 1-4 determinantes antigénicos. Por IFI se identificaron 2 patrones de reactividad: contra cutícula y contra esticosoma. Por IP se detectó la presencia de: IgG en cavidad celómica, la IgM en cutícula e IgA en la superficie corporal de la larva.

Características anatómicas de los antígenos de T. spiralis: Con IgG purificada por cromatografía de intercambio iónico se estudió la ultraestructura larvaria y se encontró que los anticuerpos tienen una reacción específica con los gránulos de los esticocitos  $\alpha$  0,  $\alpha$  1,  $\beta$  y en menor proporción con la cutícula.

Características moleculares de los antígenos purificados de T. spiralis: El AST parcialmente purificado por cromatografía de filtración en gel y por cromatografía de afinidad, mostró en electroforesis de poliacrilamida 5 bandas protéicas con pesos moleculares de 69 kD, 52 kD, 45 kD, 42 kD y 38 kD, con predominio de la banda de 45 kD.

En WB se encontró que los animales infectados con T. spiralis reconocen varios componentes antigénicos, con rango de peso molecular de 29-97 kD con predominio de un triplete de 50 kD, 47 kD y 45 kD en el 100% de los sueros estudiados.

En base a nuestros resultados, concluimos que la respuesta inmune de tipo humoral en conejos, puede ser evaluada por varias técnicas inmunoserológicas y es similar a la observada en otras especies.



## INTRODUCCION

La triquinosis es una enfermedad parasitaria causada por el nemátodo Trichinella spiralis que es capaz de invadir e infectar los músculos de diferentes especies de mamíferos, además de infectar a humanos, ocasiona pérdidas económicas de importancia en la porcicultura por lo que es oportuno contar con mejor conocimiento de la biología del parásito y con metodología más susceptible de diagnóstico.

### *Características biológicas de la Trichinella spiralis*

Phylum	Nematoda
Clase	Aphasmidia
Superfamilia	Trichinellidea
Género	Trichinella
Especie	spiralis

**Morfología de Trichinella spiralis.**- En etapa de adulto tiene las siguientes características: el macho mide 1.5 x 0.04 mm y la hembra 3.5 x 0.06 mm, presenta: 1) un extremo anterior adelgazado, con una pequeña boca orbicular, sin papilas, 2) El extremo posterior es redondeado en la hembra y con curvatura ventral y dos apéndices caudales lobulares en el macho, 3) Un solo ovario con vulva, en la quinta parte anterior de la hembra y un solo testículo en el macho, 4) El tubo digestivo es largo y estrecho y posee esticosomas que son glándulas exócrinas constituidas por 50 esticocitos que son células discoideas que tienen 5 tipos de gránulos citoplásmaticos  $\alpha$  0,  $\alpha$  1,  $\alpha$  2,  $\beta$  y  $\gamma$ , éstos secretan material antigénico en las primeras 30 horas postinfección y son capaces de inducir una respuesta inmune<sup>86,87,89,90</sup>. La larva tiene una punta lanceolar en su extremo anterior. Mide de 80 a 120 micras x 5.6 micras al nacimiento y crece poco hasta que penetra en una fibra muscular, donde alcanza un tamaño de 900 a 1300 micras x 35 a 40 micras. El aparato digestivo de la LI es similar al del adulto y aunque los órganos reproductores no están plenamente desarrollados es posible diferenciar los sexos (las larvas recién nacidas carecen de esticosomas y de antígenos secretorios)<sup>11,12,13</sup>.

Anatómicamente la T. spiralis está constituida por dos estructuras, el tubo externo formado por la cutícula y el interno por el esófago, entre éstos se encuentra el espacio pseudocelómico, donde se encuentran, la hemolinfa y las células del primordio genital<sup>37</sup>.

**Ciclo vital.**- El mismo hospedero actúa como huésped intermediario y definitivo, albergando transitoriamente al parásito adulto y a la LRN, y por largos períodos a la LI. Para que la T. spiralis complete su ciclo vital, es preciso que otro huésped ingiera

carne que contenga larvas enquistadas.

La larva parasitaria se encuentra principalmente en el hombre, rata, oso, zorro, morsa, perro, gato y cerdo, pero puede infectar a cualquier carnívoro y omnívoro, las aves adultas pueden albergar transitoriamente al parásito adulto, pero las larvas no se enquistan en sus músculos, los animales poiquiloterms no son susceptibles a la infección por T. spiralis. Cuando la carne o sus derivados están contaminados con LI de T. spiralis y son ingeridas, éstas pasan al estómago donde sus cápsulas son disueltas, las larvas son liberadas en pocas horas, después pasan a la porción proximal del intestino delgado, invaden la mucosa donde pueden permanecer por varios días, la hembra aumenta de tamaño y en aproximadamente 48 horas perfora la mucosa intestinal desde el duodeno hasta el ciego e incluso en el colon, en infecciones intensas. En el estadio adulto los machos copulan a las hembras; la hembra vivípara comienza a depositar larvas recién nacidas en la mucosa después del 5o. día y a veces directamente en los ganglios linfáticos y mesentéricos, durante un periodo de 4 a 16 semanas, sin embargo, la producción continúa con menor intensidad mientras queden hembras en el intestino. La hembra adulta muere después de liberar sus larvas y luego es eliminada o expulsada del intestino en ocasiones, las LRN pueden quedar libres dentro de la luz intestinal, pasan al conducto torácico y al torrente sanguíneo principalmente por la circulación linfática<sup>13</sup>.

A través de los sinusoides hepáticos y del pulmón, las larvas pasan a la circulación general, y penetran en las fibras musculares mediante el aparato lanceolar que tienen en el extremo anterior. Las LRN son capaces de enquistarse y desarrollarse en el músculo estriado, particularmente en la porción tendinosa; en otros tejidos como miocardio y encéfalo, se desintegran y son absorbidas. Por su tropismo específico hacia músculo estriado, se dirigen principalmente a los músculos diafragmáticos, maseteros, intercostales, laríngeos, linguales, oculares, de la nuca, pectorales, deltoides, glúteos, bíceps y tríceps crural.

En los músculos estriados, la LI de T. spiralis vive intracelularmente en una célula modificada del músculo esquelético estriado denominada célula nodriza (la transformación dura 20 días), el citoplasma de esta célula está constituido por membranas lisas en espiral, mitocondrias difuncionales y por 45 a 50 grandes núcleos, los núcleos empiezan a crecer 5 días después de la infección muscular, alcanzando su tamaño óptimo a los 8 días. La célula nodriza contiene una proteína glicosilada de 43 kD que parece tener importancia en la inducción de respuesta inmune. Poco después desarrolla una capa de colágena rígida y una red de vasos anastomosados (constituidos por arteriolas y vénulas)<sup>11,36,57,83</sup>.

Al cabo de 1 mes, el quiste está bien formado (de 250 a 500 micras) y es un mecanismo de defensa del huésped a la vez que una protección para la larva infectante, ésta puede permanecer viable por años, en espera de ser ingerida por un nuevo

huésped, si esto no sucede, el quiste termina por recubrirse por sales de calcio y la larva infectante muere. Cuando un nuevo huésped ingiere larvas enquistadas viables (ej. cuando el hombre ingiere carne mal cocida, o el cerdo se alimenta de ratas infectadas), el músculo es digerido en el estómago y se liberan las larvas infectantes, que penetran a la pared del intestino delgado, donde crecen y se transforman en parásitos adultos que reinician el ciclo de vida<sup>11</sup>.

**Sintomatología.-** En la triquinosis la variabilidad e intensidad de los síntomas, depende del número de parásitos que afectan al individuo, edad del paciente, sexo, estado nutricional, estado hormonal, estados de inmunosupresión y tejido invadido; así mismo debe establecerse la diferencia entre infección y enfermedad.

Las manifestaciones clínicas de la triquinosis dependen de la etapa del ciclo biológico en la que se encuentra el parásito<sup>6</sup>.

a) **Período intestinal:** En las primeras 24 horas, a partir de la ingesta de la carne infectada, la penetración de las larvas infectantes a la pared intestinal pueden ocasionar diarrea, que puede durar hasta una semana; así como dolor abdominal, náuseas y vómito, que generalmente se diagnostican como gastroenteritis o intoxicación alimentaria<sup>13</sup>.

Durante esta fase el cuadro clínico puede ser leve en la infección ligera, o intenso en cuadros graves, a pesar de que no se identifique las LI, excepto durante epidemias. La mayoría de los casos de triquinosis no se diagnostican, ya que las manifestaciones clínicas pueden confundirse con otras enfermedades y en aquellos casos en que la dosis infectante es baja, la infección puede pasar inadvertida.

b) El período de migración de las larvas y penetración a células musculares, es generalmente de 1 a 8 semanas; durante esta fase las larvas dañan los vasos sanguíneos, lo que provoca el edema, que es evidente en cara y párpados. Las larvas migratorias también pueden causar neumonía, encefalitis, nefritis y peritonitis. La muerte en esta fase puede ser debida a una miocarditis, aunque las larvas generalmente no penetran a las células miocárdicas.

El dolor, la hiperestesia muscular, las artralgias, la cefalea y el edema periorbitario, son referidos como signos clínicos característicos, que en la práctica tienen expresión variable. La triquinosis es la única helmintiasis que cursa con fiebre, la cual puede persistir durante varias semanas simulando un cuadro de fiebre tifoidea.

El dato más importante en las pruebas de laboratorio, es la eosinofilia progresiva; este dato asociado con fiebre, edema facial, mialgias y trastornos gastrointestinales apoyan el diagnóstico triquinosis, sobre todo, si existe el antecedente de la ingestión de carne de cerdo mal cocida (chorizo y embutidos)<sup>2,11,13,46</sup>.

c) El período de estado (convalecencia), suele durar algunos meses e incluso años, en esta fase, las larvas se han establecido en la fibra muscular y se ha efectuado el enquistamiento; los síntomas generales desaparecen o disminuyen considerablemente y solo persiste el dolor muscular que se hace mas evidente con el ejercicio.

**Anatomía patológica.-** Las lesiones provocadas por la triquinosis se relacionan con la presencia de larvas infectantes en músculo estriado y órganos vitales, así como la reacción del huésped a los productos metabólicos y a las secreciones tóxicas de la T. spiralis, exceptuando las lesiones intestinales tempranas causadas por gusanos adultos.

#### *Guía Diagnóstica de la triquinosis.*<sup>46</sup>

##### I. Sospecha diagnóstica.

- a) Cuadro clínico compatible.
- b) Eosinofilia.
- c) Valores elevados de enzimas musculares (a y b).
- d) Alteraciones electromiográficas (a y b).

##### II. Diagnóstico incontrovertible.

a) Se basa en la demostración directa de la forma adulta de triquina en: a) intestino, ya que teóricamente la larva adulta puede ser recuperada por aspiración duodenal durante la fase entérica, o en las heces, durante el período de expulsión o cuadro diarreico.

b) La demostración directa de LRN de triquina en la sangre periférica, que pueden recuperarse por filtración, usando filtros con poro de 3 micras, durante la fase parenteral.

c) La demostración directa de LI de T. spiralis en el tejido muscular estriado por, compresión y observación al microscopio de luz.

##### III. Demostración indirecta por estudios serológicos.

Presencia de anticuerpos anti-triquina determinados por: a) Precipitación en gel. b) IFI. c) Inmuno-punto. d) ELISA. e) IET. f) Prueba de floculación con bentonita. g) Radioinmunoensayo. Y, análisis de la respuesta inmune celular: intradermorreacción<sup>46</sup>.

**Epidemiología de la triquinosis.-** En 1947 Stoll<sup>7</sup> calculó que había 27.8 millones de personas infectadas con T. spiralis en el mundo, de las cuales tres cuartas partes se

encontraban en Estados Unidos de Norte América, esta cifra disminuyó en los últimos 25 años, de 1982 a 1986, se reportaron 57 casos y sólo 3 muertes en USA. Este padecimiento es cosmopolita desde la región ártica hasta los trópicos. La infección se presenta como resultado de la ingestión de carne cruda, o insuficientemente cocida, que tienen larvas infectantes de T. spiralis. En algunas regiones se presenta como pequeños brotes, después de la ingestión de carne infectada.

La frecuencia de la triquinosis en el hombre, puede determinarse identificando las LI y por estudios inmunoserológicos, sin embargo no se conoce con certeza el número de nuevos casos, ya que un gran porcentaje son subclínicos pero se puede especular que hay algunos cientos y de estos casos algunos individuos pueden llegar a fallecer.

En los cerdos alimentados con basura, la frecuencia es inferior a 0.5%, bajando a 0.1% cuando los animales se alimentan con semillas<sup>13</sup>.

En México, la triquinelosis fue reportada por primera vez por Zuñiga en 1891, en un cadáver humano, Barragán realiza su tesis sobre este tema, reportando 4 casos probables en cadáveres disecados en 1893. En 1943, Mazzotti reportó el estudio de 600 diafragmas humanos obtenidos en autopsias en la Ciudad de México<sup>68</sup>. En 1974, Martínez reporta por primera vez un brote epidémico (40 casos). En otros estudios se ha reportado una prevalencia del 2 al 16%, pero su promedio en diafragmas humanos, es aproximadamente del 8%<sup>66</sup>.

Los estudios epidemiológicos señalan que la triquinelosis se encuentra en todo el territorio nacional, con existencia de zonas endémicas. En el registro de la población derecho habiente del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) se reporta que en el decenio de 1976-1985 se registraron algunos brotes epidémicos, como casos esporádicos, principalmente en Zacatecas, Durango, Estado de México, Guanajuato y DF. La infección se relacionó principalmente con la ingesta de chorizo o carnitas de cerdo crudas o mal cocidas y en general el diagnóstico se confirmó por la observación histopatológica de las larvas enquistadas en los músculos, en 1981 (136 casos), 1986 (175 casos) y en 1987 (380 casos)<sup>17</sup>.

En el estado de Chihuahua ha sido reportado el brote mas grande de triquinosis en México, en octubre de 1987, 50 personas fueron hospitalizadas por presentar el cuadro clínico y biopsia positiva a LI de T. spiralis, por ingesta de chorizo comprado a un productor de la localidad, fueron identificados 294 casos entre 5974 personas con una tasa de ataque de 5.1%, la cual fué 8 veces mas alta entre los que acostumbran comer chorizo<sup>98</sup>.

En Zacatecas, Del Río y Herrera Diosdado, encontraron 8 diafragmas positivos a T. spiralis en 51 cadáveres que analizaron entre 1982-1983<sup>25</sup>. Zacatecas es uno de los estados que aparentemente tiene una incidencia mayor de la enfermedad, desde 1968 a

1988 se han documentado clínica e histológicamente 166 casos, de los cuales 7 fallecieron<sup>14</sup>. El primer brote fue registrado en 1976 en Laguna del Carretero, con 8 defunciones<sup>38</sup>. En 1988, Contreras y col realizaron una encuesta seroepidemiológica analizando 15,000 sueros de población abierta del estado de Zacatecas, utilizando técnicas de precipitación en gel, encontraron una prevalencia de 4.4%<sup>18</sup>; así mismo, analizaron 105 sueros de cerdos<sup>19</sup> y 70 de cánidos (comunicación personal), en los que encontraron un 6% de positividad, lo anterior muestra que existe un alto riesgo para el desarrollo de la enfermedad en humanos. En las poblaciones rurales y suburbanas de nuestro país, se acostumbra el criadero de cerdos en forma doméstica, los cuales son alimentados con desechos alimenticios, fenómeno que provoca aumento de la incidencia de la triquinelosis.

La frecuencia de triquinelosis es menor en los trópicos y subtropicos, principalmente por el bajo consumo de carne de cerdo. Los tabús religiosos sobre la carne de cerdo, y los hábitos alimenticios explican la ausencia del padecimiento en indúes, judíos, musulmanes, adventistas del 7o. día y en individuos vegetarianos<sup>13</sup>.

**Respuesta inmune contra *Trichinella spiralis*.**- La infección por *T. spiralis* se ha estudiado en el hombre y en otras especies como es el ratón, rata, conejo, cerdo, etc., con el fin de conocer la biología del parásito. Se ha señalado que la presencia de *T. spiralis* en los tejidos desencadena una reacción de hipersensibilidad retardada y producción de anticuerpos; ambos mecanismos confieren en ocasiones, una protección específica<sup>2,84</sup>. Se propone que el mecanismo de eliminación del parásito se lleve a cabo en dos pasos: primero, se produce el daño metabólico inducido por anticuerpos que bloquean la alimentación del parásito, o daño a los tejidos parasitarios internos y en segundo lugar, la expulsión del helminto del nicho intestinal por la acción de la respuesta inmune, donde participan linfocitos activados y anticuerpos de la clase IgE e IgG<sup>1,40,76</sup>.

La respuesta inmune del huésped contra la *T. spiralis* fué estudiada inicialmente por Bachman en 1928, él demostró en conejos y cobayos infectados con *T. spiralis*, que presentaban una respuesta inmune cuando eran retados en pruebas intradérmicas con partículas antigénicas del parásito, por otro lado, el suero presentaba reacción de precipitación, con estas partículas<sup>3,4</sup>. Posteriormente muchos autores han confirmado estas observaciones.

La respuesta inmune humoral en modelos experimentales y en humanos se manifiesta por aumento en las inmunoglobulinas en forma policlonal contra estructuras del parásito, tubo externo, tubo interno y espacio pseudocelómico, inicialmente la respuesta es de tipo IgM y subsecuentemente de tipo IgG<sup>31,86</sup>.

La producción de anticuerpos de tipo IgA dimérica, es característica del tejido linfoide intestinal, la infección por LI de *T. spiralis* estimula la proliferación de

linfocitos B y de células plasmáticas productoras de IgA involucrada en la respuesta inmune local a nivel intestinal contra el parásito<sup>27</sup>.

Las linfocinas estimulan a los linfocitos B, los que preferentemente aumentan la producción de IgE y contribuyen a la inmovilización y muerte del parásito mediante un mecanismo de citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos, en este mecanismo las células cebadas, los eosinófilos y los macrófagos actúan como células efectoras; este mecanismo de daño es común en otras parasitosis.

En estudios de restricción isotópica realizados en ratones infectados con *T. spiralis*, han demostrado que la IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM se encuentran aumentadas siendo más importante en el caso de IgG4, en el caso de IgG1 e IgG2 tuvieron especificidad contra las células del esticosoma y la IgM contra la cutícula<sup>7,43,47,67,76</sup>. En base a lo anterior parece ser que la IgG4 juega un papel importante en la inmunomodulación de la respuesta en contra de *T. spiralis*.

Los anticuerpos anti-gránulos  $\alpha$  de los esticocitos, son los de mayor especificidad para el diagnóstico de la enfermedad.

El sistema del complemento también participa en el daño de las larvas. La cutícula parasitaria puede activar per se la vía alterna del complemento, mientras que los anticuerpos activan la vía clásica. Durante la activación de este sistema algunas fracciones peptídicas del complemento (C3, C3b) producen opsonización de la larva y reclutamiento de eosinófilos y células cebadas que colaboran al daño de las larvas, vía activación del complemento<sup>6,60,61</sup>. El resultado de estos eventos, es una reacción inflamatoria a nivel local en los tejidos del huésped, cuya finalidad es la muerte y eliminación de las larvas; por ejemplo, las células cebadas reclutadas en la lámina propia del intestino, se desgranulan y liberan mediadores de la inflamación que favorecen la eliminación intestinal del parásito adulto<sup>42</sup>. Por otro lado, el eosinófilo con su sistema de peroxidasa, y proteína básica mayor, interactúan con las células cebadas y producen daño en la cutícula del parásito, que le causan la muerte.

**Características celulares de la respuesta inmune en triquinosis.-** La inmunidad celular en triquinosis es importante en la defensa del huésped en contra del parásito; el intestino funciona como barrera primaria, a través de células presentadoras de antígeno, células citotóxicas, basófilos y eosinófilos; sin embargo algunas larvas logran penetrar la barrera intestinal y pasan a la circulación sistémica. Los mecanismos de respuesta inmune local en el intestino, encargados de la expulsión del parásito, aparentemente son controlados por los genes de respuesta inmune del huésped (Ir en el ratón y moléculas de clase II en el humano)<sup>52,101</sup>, las células interactúan con la superficie de la larva y posteriormente el daño al parásito es mediado por un mecanismo de citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos (ADCC) o por células NK, cuyo fin es la inactivación, muerte o eliminación del

parásito<sup>2,84,103</sup>.

El mecanismo de hipersensibilidad de ADCC, a través de la interacción de la IgE con las células cebadas, estimula y aumenta la actividad citotóxica de los eosinófilos mediante un tetrapéptido quimiotáctico o factor quimiotáctico eosinofílico de anafilaxia, que a su vez estimula la expresión del receptor C3b.

Se ha observado que tanto la IgG como la IgE promueven la reacción de ataque dependiente de anticuerpos de los eosinófilos y macrófagos por medio de la vía de unión específica Fc a su superficie. También, las células cebadas constituyen otro mecanismo inespecífico ya que aumentan considerablemente ante la invasión del parásito; se involucra a células cebadas precursoras presentes en los nódulos linfáticos periféricos estimulados por células inductoras probablemente por la IL3 e IL-10.

La inmunidad que está mediada por linfocitos con actividad facilitadora o de ayuda, liberan IL2, IL3, IL4, IL5 e interferón, cuando son retados por los antígenos de T. spiralis y juegan un papel importante en la regulación de la eosinofilia local y sistémica<sup>7,41,56,62,75,95</sup>.

**Composición antigénica de T. spiralis.**- La cutícula y los elementos del tubo digestivo de triquina son capaces de desencadenar una respuesta de tipo inmune, específicamente los esticocitos y los elementos del espacio pseudocelómico, que varían de acuerdo a la etapa de su ciclo vital. Por otro lado, la triquina también es susceptible de cambios bioquímicos asociados a su alimentación digestión, toma de nutrientes, biosíntesis, crecimiento, metabolismo, reproducción etc. Así mismo, el huésped presenta una respuesta inmune a estos elementos y depende de sus condiciones como el sexo, edad, estado nutricional, hormonal, inmunodeficiencias, etc.<sup>6,16,28</sup>.

Numerosos autores nacionales e internacionales han llevado a cabo estudios al respecto reportando que los antígenos están constituidos por glicoproteínas, que están presentes en estadios tempranos de la larva, así como en el parásito adulto.

Las investigaciones de Despommier han mostrado que los esticocitos son de dos tipos, un grupo contiene gránulos  $\alpha$  y el otro, gránulos  $\beta$ ; estos pueden ser parcialmente purificados de homogeneizados libres de células de las larvas, mediante centrifugación diferencial<sup>33,35</sup>, cada gránulo tiene cuando menos cuatro diferentes antígenos definidos por pruebas de doble inmunodifusión usando antisueros anti-triquina. Estudios posteriores usando anticuerpos monoclonales, definen a los antígenos mayores de los gránulos de los esticocitos con un peso molecular de 37 kD, 48 kD y 50/55 kD, en estudios recientes se reporta un antígeno de 43 kD, el cual está presente en la formación de la célula nodriza<sup>36</sup>.

Despommier y Müller aislaron antígenos de los gránulos secretorios de larvas

muertas, que inocularon a animales experimentales y obtuvieron altos niveles de protección<sup>31</sup>.

Los estudios de Takahashi por microscopía electrónica demuestran que los sueros que presentan patrón de esticosoma, están dirigidos contra antígenos secretores de los esticocitos  $\alpha$  en las células anteriores y  $\beta$  en células posteriores<sup>87,88,90</sup>.

El grupo de investigadores de Ortega y Chapa han aportado información sobre el estudio de las características de los antígenos de LI de T. spiralis, en modelos experimentales y en humanos con varias técnicas inmunológicas.

Chapa ha demostrado por IET que la respuesta inmune en humanos es inducida por antígenos 30-105 kD con anti-Igs totales, siendo inmunodominantes los de 46 y 42 kD. Estos antígenos se aislaron y se usaron en inmunoensayo enzimático indirecto, diferenciando los positivos de los negativos, por lo cual se considera que esta fracción antigénica permite el diagnóstico de la triquinelosis humana de manera específica y confiere al ELISA una mejor sensibilidad<sup>22</sup>.

Ortega y Col. han llevado a cabo el estudio inmunológico de la triquinososis en un modelo experimental con la producción de anticuerpos monoclonales (AM) contra la superficie del parásito, de cada uno de los estadios del parásito, para las LRN denominados M5 y M6 con un peso molecular aproximado de 64 kD. Respecto a los AM dirigidos contra antígenos de superficie de la LI denominados M1 y M2, M1 reconoce 4 componentes de 105, 90, 55 y 47 kD, mientras que M2 sólo reconoce 2 componentes 90 y 47 kD por inmunofluorescencia con M1 se observó principalmente en la superficie de LI y por cortes histológicos de LI se localizó reactividad en el esticosoma, sugiriendo que este es el sitio de producción de los antígenos de superficie.

En relación a los AM en contra de los estadios adultos, se aislaron clonas denominadas M3, M4 y M7, que reconocen antígenos muy similares a los de 20 y 40 kD<sup>73,74</sup>.

Herrera y Col. han llevado a cabo estudios de investigación sobre las características del antígeno soluble de triquina, el cual se obtiene de tejido muscular de ratas infectadas con T. spiralis purificado en cromatografía de filtración en gel, en Sephacryl S-300. Por inmunoelectrotransferencia se identificaron 6 péptidos antigénicos con peso molecular aproximado de 68, 59, 48, 45, 33 y 28 kD<sup>45</sup>. De este mismo grupo, Rumayor y Col. han estudiado el contenido de aminoácidos del AST, el cual está constituido por aminoácidos esenciales y por residuos de ácidos orgánico del ciclo de los ácidos tricarbónicos (comunicación personal).

## OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fué evaluar la respuesta inmune humoral en Triquinosis, en un modelo experimental de conejos infectados con larvas musculares de T. spiralis.

## JUSTIFICACION

Los parásitos metazoarios se encuentran entre los patógenos más complejos para el ser humano, de éstos, los nemátodos son causantes de diversas enfermedades, el aspecto inmunológico ha sido difícil de estudiar debido a que muchos de ellos solo infectan a humanos ó primates, en este contexto T. spiralis provee un modelo muy favorable, debido al hecho de que se puede infectar a un número variado de huéspedes y todo su ciclo de vida puede llevarse a cabo en un solo huésped, entre ellos ratas ó ratones.

Actualmente la incidencia de la triquinosis, ha disminuido debido principalmente, al control sanitario. Sin embargo, en nuestro país, estudios recientes reportan un aumento en el número de casos de esta parasitosis por lo cual, el estudio inmunológico en modelos experimentales de triquinosis puede proveer información sobre los mecanismos que participan en la inducción de la enfermedad causada por este parásito.

## HIPOTESIS

Si, T. spiralis tiene compuestos inmunogénicos, su presencia en el huésped provocará inducción de anticuerpos anti-trichinella, así, las técnicas inmunoserológicas nos permitirán conocer la cinética, la aparición y la especificidad de los anticuerpos.

## MATERIAL Y METODOS

**Animales experimentales.**- En el estudio se utilizó una población de 20 conejos de raza Nueva Zelanda, hembras de 2.5 Kg de peso, de los cuales 10 fueron infectados con LI de T. spiralis y 10 fueron controles sanos.

**Infección experimental y obtención de anticuerpos antitriquina.**- El grupo de 10 conejos Nueva Zelanda infectado con LI de T. spiralis recibieron un promedio de 1500 larvas por vía oral. Las LI se obtuvieron a partir del músculo de conejos infectados

con T. spiralis. Los conejos se sangraron por venas marginales cada 8 días por 12 semanas, a los 30 días se re infectaron. La producción de anticuerpos se evaluó por técnicas inmunoserológicas que se describen posteriormente.

De algunos sueros con patrón de reactividad específica se aisló IgG, usando el siguiente método. Los sueros fueron precipitados con sulfato de amonio saturado al 33% seguida de centrifugación a 10,000 rpm por 10 minutos. El precipitado fue dializado con agua destilada por 48 horas a 4°C, cambiando el agua cada 24 horas, posteriormente se utilizó, en la cromatografía de intercambio iónico.

**Cromatografía de intercambio iónico.-** Para purificar la IgG antiesticosoma, se utilizó DEAE-celulosa, a una proporción de un gramo diluido en 15 ml de agua destilada, se midió el volumen de resina hidratada y se calculó su rendimiento, se hicieron lavados con agua destilada, se ajustó a pH 8.0 con solución amortiguadora de fosfatos, luego se pasó el buffer de fosfatos de corrimiento 0.015 M y se aplicó la muestra con las proteínas precipitadas, se colectaron volúmenes de elución de 4 ml por tubo, las muestras se caracterizaron en espectrofotometría UV a 280 nm.

**Preparación del antígeno soluble de T. spiralis.**- Fue obtenido a partir de larvas de músculo de conejo experimentalmente infectados con T. spiralis (la inoculación se efectuó como se describió previamente), para confirmar que los animales estaban infectados se obtuvo suero y se enfrentó al AST por inmunodifusión doble.

Los animales infectados se sacrificaron a la octava semana de inoculación y se observó al microscopio de luz para determinar la cantidad de LI en músculo encontrando un promedio de 25 LI por campo. El tejido infectado fue sometido a digestión con pepsina (10,000 U ) 0.3% HCL 0.2 N e incubado a 37°C por 24 horas (De acuerdo con el método descrito por Del Rio y Col)<sup>26</sup>. Después de completar la digestión de las larvas, fueron lavadas extensamente con SSF y desengrasadas con acetona, el paquete larvario fue resuspendido en SSF y los antígenos del parásito fueron extraídos por sonicación usando un 50% de eficiencia y 2 minutos por pulso, el homogenizado se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C por una hora. Se obtuvo el sobrenadante y se le determinó la concentración de proteína por el método de azul de Coomassie G-250 a 610 nm. El extracto total fue utilizado como AST, determinando su actividad antigénica por precipitación en gel con un suero prototipo positivo y negativo.

**Inmunodifusión doble.-** Se disolvió el agar al 1.5% en SSB y azida de sodio al 0.1% en un baño de agua a 92°C, el agar se depositó en portaobjetos 3 ml aproximadamente y se dejó gelificar durante 30 minutos a 20°C. Se guardaron las placas a 4°C en cámara húmeda durante 18 horas. Se hicieron 2 oradaciones en el agar de 3-4 mm de diámetro, uno central y 6 periféricos con una distancia entre los pozos de 5-6 mm, se colocaron 50 µl de la muestra antigénica en el pozo central en las de la

periferia, se depositaron los sueros de cada muestra.

Se dejó difundir durante 24 horas a 20°C en una cámara húmeda, para eliminar precipitados inespecíficos, se lavaron exhaustivamente SSF a 4°C, realizando 2 cambios frecuentemente se lavaron finalmente en agua destilada durante 2 horas. Se tiñeron con azul de Coomassie durante 15 minutos y se aclararon con la solución decolorante. Se registraron las bandas de precipitación obtenidas<sup>100</sup>.

**Contrainmunolectroforesis.**- Se disolvió agarosa al 0.8% en una solución salina con pH 8.6 para electroforesis (Sigma), con agua desionizada (v/v) agregando 0.1% de azida de sodio, en un baño de agua a 92°C. Se colocaron 3 ml de agarosa fundida por laminilla, dejando gelificar durante 30 minutos a 20°C, se hicieron 6 pares de orificios en cada laminilla, uno en frente de otro a una distancia de 5 mm se extrajo la agarosa de ellos y se procedió a llenarlos con, los antígenos y anticuerpos correspondientes, se utilizó azul de bromofenol-ASB como indicador. Las placas de agar se colocaron en una cámara de electroforesis que contenía la solución de barbital (pH 8.6) para electroforesis (Sigma), se pasó una corriente de 1.0 mA por cada laminilla hasta que el indicador recorrió 2.5 cm. Se incubó 3 días a 20°C en cámara húmeda, se lavaron las placas en SSF 0.15 M pH 8.4 durante 5 días a 4°C realizando 2 cambios de esta solución, posteriormente se dejaron 2 horas en agua destilada, se cubrieron las placas con papel filtro y se incubaron a 37°C hasta que se secaron, se tiñeron con azul de Coomassie durante 10 minutos y se decoloraron con la solución decolorante, se registró el número de bandas de precipitación obtenidas<sup>30</sup>.

**Inmunolectroforesis.**- Se cubrieron portaobjetos con agar al 1% diluido en solución salina con pH 8.6 para electroforesis (Sigma) y con agua desionizada (v/v) y en un inmunomarco usando aproximadamente 3 ml por portaobjeto se dejaron gelificar, se perforó el agar y se extrajo de los pozos por succión, se aplicaron las muestras en los pozos y se agregó una gota de azul de bromofenol al AST, se llenó la cámara de electroforesis con la solución de barbital (pH 8.6) (Sigma). Se ajustó a 100 volts (2.5 mA por laminilla), y se llevó a cabo la electroforesis hasta que el colorante se desplazó 2.5 cm del punto de origen se sacó el agar de los canales y se aplicaron en ellos los sueros con anticuerpos anti-triquina obtenidos de los conejos infectados con LI de T. spiralis (muestras secuenciales) y los sueros de los conejos normales, se dejó difundir de 12-24 horas, y se registró el número y la posición de las bandas. Se siguió la misma técnica para lavados y la tinción utilizados en IDD y CIEF<sup>30</sup>.

**Inmunofluorescencia indirecta.**- Las LI se fijaron a portaobjetos tratados con ASB al 5%; las LI fueron obtenidas del músculo de conejo infectado con T. spiralis. El suero problema, fue diluido progresivamente hasta 1:640; y se incubó sobre las LI en cámara húmeda por 30 minutos, se lavaron 10 minutos con SSF por 2 veces, seguida de incubación durante 30 minutos, con anti-gammaglobulina de conejo marcada con fluoresceína (diluida 1:500) luego se lavaron 10 minutos con SSF por 2 veces y los

portaobjetos fueron montados con SSF y glicerol (9:1), las laminillas se observaron al microscopio de epifluorescencia<sup>26,50,54</sup>.

Otra fracción de larvas se permeabilizó con Triton X-100 al 5% por 10 minutos, después se centrifugaron por 5 minutos y se eliminó el detergente de la suspensión; se resuspendieron en solución amortiguadora y se fijaron en citocentrífuga, colocando 1, 5 y 10 microlitros para estandarización del número de LI de T. spiralis, a 1,000 rpm por 5 minutos. Las larvas adheridas a portaobjetos se fijaron con acetona fría por un minuto y se siguió el resto del procedimiento ya señalado.

**Inmunoperoxidasa.**- El paquete de LI (aproximadamente 10-20 LI por 10 microlitros en SSF), se incubaron con el suero problema hasta dilución de 1:640, por 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron 10 minutos con SSF por 2 veces, la incubación con anti-gammaglobulina de conejo clase IgG, IgA e IgM marcada con peroxidasa y diluida 1:500 fué realizada durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron 10 minutos con SSF 2 veces, se revelaron 10 minutos, con 3,3 diaminobenzidina y se lavaron con agua, se colocaron en un portaobjetos y se agregó glicerol-SSF (9:1) cubriéndolas con el cubreobjetos, se observaron al microscopio de luz<sup>84</sup>.

#### ***Purificación del antígeno de T. spiralis.***

**Cromatografía de filtración en gel Sephadex G-200.**- El AST disuelto en 2 ml de PBS fué pasado en la columna de Sephadex-G-200 equilibrada con PBS, se colectaron los volúmenes de elución en tubos de 10 ml, las fracciones eluidas fueron analizadas en espectrofotómetro a 280 nm, se hicieron pools que fueron dializados con agua destilada y posteriormente liofilizados conservándose así hasta su uso.

**Cromatografía de afinidad.**- Para el acoplamiento de la IgG purificada en DEAE se utilizó una concentración de 10 mg de peso seco por ml de buffer de acoplamiento y se obtuvo una concentración de proteína de 25 mg por ml. La IgG se resuspendió en 20 ml de buffer de acoplamiento y se mezcló a la Sepharosa-4B.

Se utilizó Sepharosa-4B activada con bromuro de cianógeno Pharmacia (100 microgramos de Sepharosa-4B tienen capacidad de unión de 2.5 gramos de proteína). Se incubaron 500 mg Sepharosa-4B por 15 minutos con HCl 0.1 M pH3, la resina hidratada se centrifugó a 2,500 rpm por 10 minutos decantando el sobrenadante, el botón fue lavado 3 veces con buffer de acoplamiento (NaCl 0.25M y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.04 M pH 8.5). Se centrifugó 2,500 rpm por 10 minutos se añadió el extracto de proteína y 125 microlitros buffer para luego acoplamiento de 10 a 15 volúmenes por cada 100, se agitó por toda la noche a 4°C. Se eliminó el buffer por centrifugación, se lavó con glicina (0.5 M pH 2.5) y se agitó por 2 horas en agitación rotatoria. Se centrifugó a 2.500 rpm por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante, se lavó con una solución ácida

(acetato o ácido cítrico) y se centrifugó a 2,500 rpm por 10 minutos, se lavó con un buffer básico por 10 minutos y se centrifugó a 2,500 rpm por 10 minutos, los dos últimos pasos se repitieron por dos ocasiones. Se lavó con buffer salino de fosfatos y se guardó en azida de sodio a 4°C hasta su uso.

La Sepharosa acoplada se empaquetó en una columna de 5 x 1 cm y se equilibró con PBS pH 7.0. El antígeno se centrifugó en frío a 10,000 rpm por 20 minutos para aclararlo; y a través de la columna se pasó un ml del Ag de triquina con una concentración de proteína de 4.7 mg/ml (con azul de Coomassie) y se colectaron volúmenes de elución de 1 ml, el buffer de elución (0.05 M glicina pH 2.5) se aplicó en el tubo 15, el corrimiento se continuó hasta el tubo 40, las fracciones fueron leídas en espectrofotómetro a 280 nm; de acuerdo al cromatograma, se hicieron 3 pooles que fueron liofilizados<sup>33</sup>.

**Localización ultraestructural de antígenos secretorios.-** Las larvas de *T. spiralis* fueron fijadas en solución de Karnovsky, luego deshidratadas con alcohol, y embebidas en resina LR. Se realizaron cortes ultrafinos de 80nm que fueron utilizados como fuente de antígeno para los estudios en inmunohistoquímica, para revelar la presencia de anticuerpo, se utilizó el complejo de Proteína A oro coloidal, que fue preparado de acuerdo con el método de Tanaka y colaboradores. Los cortes fueron incubados con el suero de los animales infectados que presentaron el patrón antiesticosoma (2) por IFI, y dos controles sanos a diluciones de 1:200 a 1:3,000 en PBS con ovoalbúmina al 1% por 30 minutos. Después de extensos lavados los cortes se incubaron por 30 minutos con Proteína A oro coloidal, se lavaron con PBS y fueron teñidas con acetato uranilo y evaluadas en microscopio electrónico de transmisión. La técnica anterior fue realizada por el Doctor Yuzo Takahashi, en el Departamento de Parasitología de Nara Medical University<sup>87,89</sup>.

**Electroforesis de poliacrilamida.-** Con el AST se realizaron corrimientos electroforéticos preparativos en minigeles de poliacrilamida (PAGE) en condiciones reductoras. Se utilizaron geles de 7x7 cm preparados con dodecil sulfato de sodio (SDS) de acuerdo a la metodología descrita por Laemmli<sup>55</sup>, con una concentración de acrilamida al 11% y la relación acrilamida-bisacrilamida fue de 1:60 en el gel separador. El tiempo de corrimiento, fue de 2 horas a 100 Volts.

El AST fue preparado por ebullición durante 2 minutos en una solución reductora (Tris HCL 1 M pH 6.8, glicerol, SDS 2%, azul de bromofenol al 0.5%, EDTA, H<sub>2</sub>O, ditiotreitól 5 mM y 2-mercaptoetanol al 5%). Se utilizaron los siguientes marcadores de peso molecular: Fosforilasa (97 kD), albúmina sérica bovina (68 kD), ovoalbúmina (43 kD), anhidrasa carbónica (24 kD), lisosima (14 kD). Se usó una cámara miniprotean II (Bio-Rad), aplicando 60 volts por 3 horas, posteriormente uno de los geles fue teñido con azul de Coomassie y desteñido con solución aclaradora, luego secado en membranas de papel celofán.

**Western Blot.**- El A.S.T, fue separado por PAGE, los geles no teñidos fueron transferidos a papel de nitrocelulosa (NC) de acuerdo con el método descrito por Towbin<sup>94</sup>, utilizando una cámara de minitransblot-cell (Bio-Rad), a 15 volts, durante toda la noche a 4°C; las proteínas fueron reveladas por 5 minutos con el colorante de Fast green al 0.1% y luego decoloradas con agua destilada. El papel de nitrocelulosa con las proteínas transferidas fué cortado en tiras de 2 mm de ancho en forma paralela al corrimiento, se bloquearon a temperatura ambiente con PTX (fosfatos 0.01 M, pH7.5, tritón X-100 al 0.2%, NaCl 0.15 M y EGTA 1 mM, ASB al 4%) albúmina al 4% con agitación suave, fueron incubadas con los sueros problemas y controles a diferentes diluciones (1:200, 1:1000, 1:10,000, 1:1'000,000), por toda la noche en agitación suave con PTX-ASB al 4%. Se lavaron por 5 ocasiones con GB (Tritón X-100 0.5%, trietanolamina 50 mM pH 7.4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM pH 7.4, SDS 1 mM, H<sub>2</sub>O), en agitación moderada, durante 10 minutos cada intervalo; posteriormente se agregó PTX-ASB por 15 minutos en agitación. Los anticuerpos unidos al papel de nitrocelulosa, se marcaron con proteína A de *Staphylococcus aureus* (SPA) SPA-I<sup>125</sup> (60,000 cpm/ml de PTX), incubándose por 45 minutos en agitación suave a temperatura ambiente, posteriormente las tiras de NC fueron lavadas 5 veces con solución de lavado GB por 10 minutos y finalmente fueron montadas y secadas. Las bandas inmunorreactivas se observaron por autorradiografía utilizando película Kodak XAR5 en cassettes con pantalla intensificadora, incubándose por 16 horas a -70°C.

**Radiomarcaje.**- El marcaje de SPA con Yodo radioactivo se hizo por la técnica de cloramina T<sup>63</sup>, para la detección de antígenos.

Se montó una columna de Sephadex G-25 7x1 cm se hidrataron 2.5 gramos en 25 ml de agua destilada y se equilibró con 20 a 30 ml de buffer de columna ASB al 1% en solución de fosfatos.

Se hidrataron 5 mg de SPA (Pharmacia) con solución amortiguadora de fosfatos; se tomó 1 mg, al que se agregaron 500 mCi de I<sup>125</sup>, en agitación suave, en presencia de 15 µl de cloramina T y se incubaron 2 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 40 µl de metabisulfito de sodio y finalmente se mezclaron con 20 µl de yoduro de potasio para estabilizar la reacción, la muestra de la Proteína A-I<sup>125</sup> conjugada se aplicó a la resina de Sephadex G-25 pre equilibrada, se colectaron muestras de 250 µl (25 tubos), al finalizar el corrimiento se tomó 1 µl de cada fracción y se transfirió a un vial de centelleo el procedimiento se hizo por duplicado, se midió la radioactividad en cuentas por minuto (cpm) I<sup>125</sup> en un contador gamma (Wallac), con las lecturas se hizo un cromatograma. Del Yodo conjugado se hizo un pool para la solución de trabajo.

Se determinó que el valor óptimo en cpm para producir una buena señal en la autorradiografía era de 30,000 a 90,000 cpm.

## RESULTADOS

**Propiedades inmunoquímicas del A.S.T.-** El antígeno obtenido de LI de T. spiralis alcanzó una concentración protéica de 2.2 mg/ml, por la técnica de azul de Coomassie en la gráfica del estándar de albúmina sérica bovina a las diluciones de 1,5 y 10 microlitros se obtuvo una línea recta del AST.

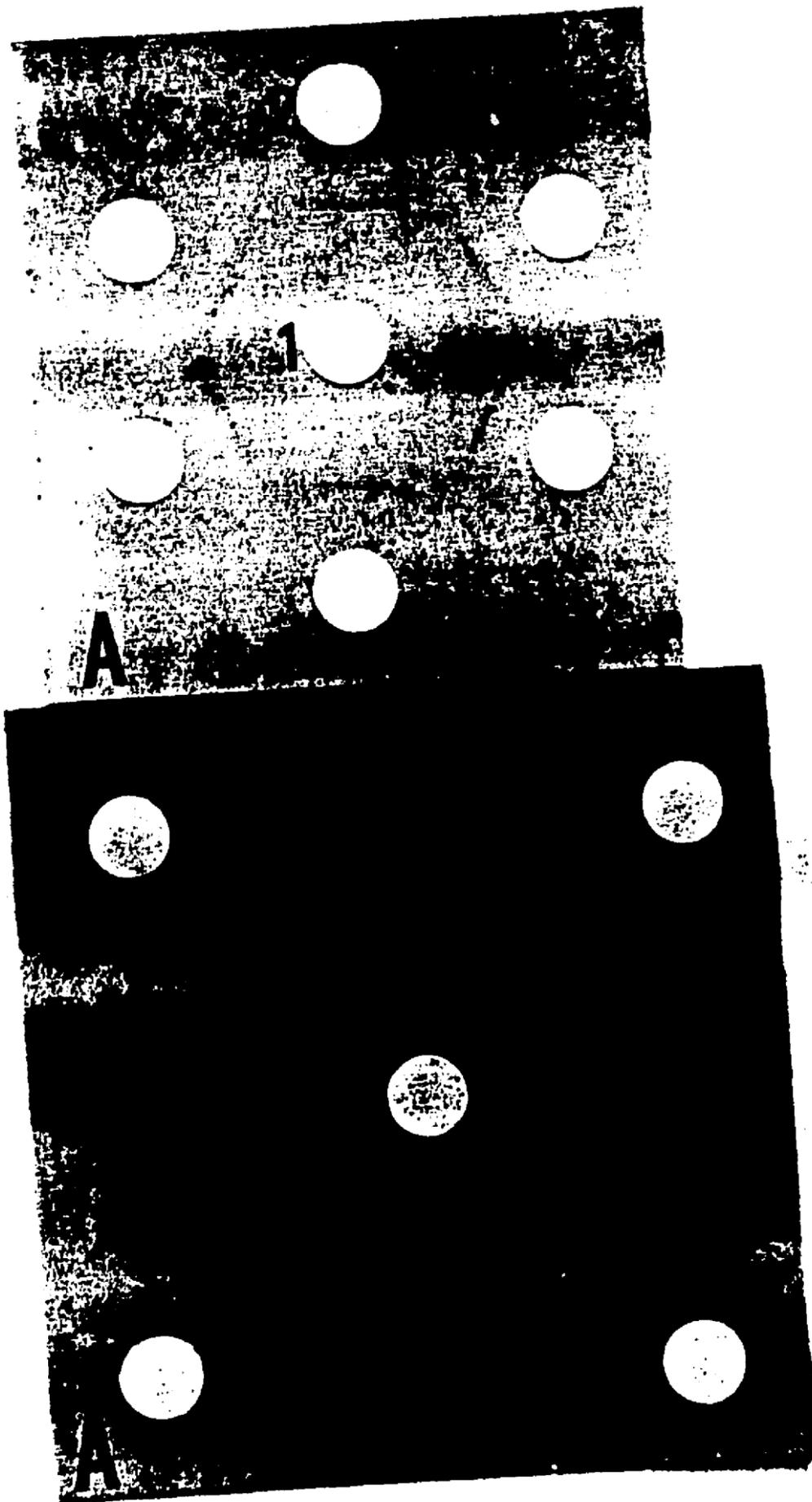
El extracto crudo de AST probado con un suero prototipo positivo mostró una reacción de precipitación por inmunodifusión doble a las 24 horas. Al titularlo, mediante diluciones progresivas del antígeno se encontró reacción inmune hasta la dilución de 1:32 que corresponde a una concentración protéica de 0.0682 mg/ml.

**Detección de anticuerpos antitriquina por técnicas de precipitación en gel.-** Los 10 animales experimentales y los 10 controles estudiados, se sangraron por un período de 12 semanas, los sueros probados con AST resultaron negativos durante las primeras tres semanas postinfección.

En la cuarta semana todos los sueros de los animales infectados fueron positivos exhibiendo bandas de precipitación inmune las cuales presentaron identidad entre ellas, y en algunos casos exhibieron dos bandas con identidad entre ellas, la quinta semana fué similar, en las subsiguientes persistió la positividad incrementándose el número de bandas hasta 4. En el caso de los sueros con 3 y 4 bandas solo una de ellas presentó identidad con las muestras obtenidas en diferentes semanas (Tabla 1, Figura 1). Los controles fueron negativos durante las 12 semanas.

**Tabla I.- Anticuerpos anti-T. spiralis por Inmunodifusión Doble.**

Conejo	Semanas											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2
2	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2
3	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	0	0	0	2	2	2	2	2	3	3	3	3
5	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2
7	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2
9	0	0	0	2	2	3	3	3	4	4	4	4
10	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Promedio bandas	0	0	0	1.4	1.4	1.5	1.5	1.5	1.9	1.9	1.9	1.9

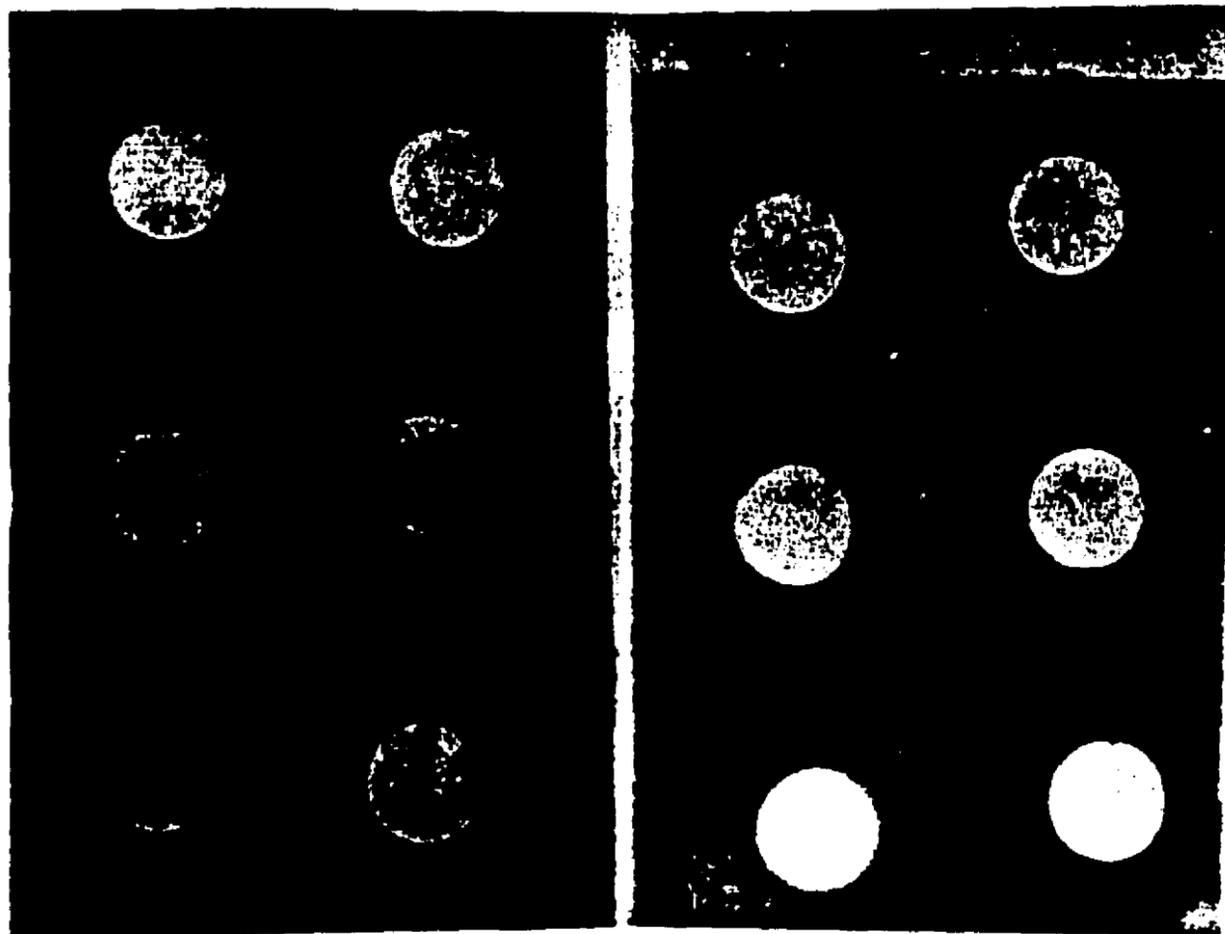


**FIGURA 1.-** IDD, en A se muestran las bandas de precipitación entre el AST (1) y los Acs anti-Trichinella (2), con identidad entre ellas. A'. Se muestran diferentes sistemas Ag-Ac (a, b, c, d) entre el AST (3) y los Acs anti-Trichinella (4).

**CIEF.-** El grupo experimental fué negativo durante las primeras 3 semanas postinfección; a partir de la cuarta semana, los sueros reaccionaron con un promedio de 1.5 bandas, alcanzando un promedio de 1.8 bandas en las semanas subsiguientes con un mínimo de 1 y máximo de 4 bandas, que mostraron migración hacia el cátodo (Tabla 2, Figura 2). Los controles fueron negativos durante las 12 semanas.

**Tabla II.- Anticuerpos anti-*T. spiralis* por Contrainmunolectroforesis.**

	Semanas											
Conejo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2
5	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2
7	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2
8	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	0	0	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4
10	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Promedio bandas	0	0	0	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.8	1.8	1.8	1.8



**FIGURA 2.- C.I.E.F.** en A se observa una bandas de precipitación entre el AST (1) y los Acs anti-Trichinella (2), en B similar situación pero se observa otra banda que hace identidad entre ellas.

**IEF.-** Los sueros de los 10 conejos infectados, fueron negativos durante las primeras tres semanas postinfección; a partir de la cuarta, todos fueron positivos, con un promedio de 1.8 bandas, lo que se mantuvo hasta la semana 12, con un rango de 1 a 4 bandas. Las bandas presentaron diferencias entre sí en cuanto a longitud y grosor (Tabla 3, Figura 3). Los controles fueron negativos.

**Tabla III.- Anticuerpos anti-T. spiralis por Inmunolectroforesis.**

Conejo	Semanas											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2
5	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2
7	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2
8	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	0	0	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4
10	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Promedio bandas	0	0	0	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8

**Detección de anticuerpos antitriquina por IFI.-** En las primeras tres semanas los sueros fueron negativos, a partir de la cuarta semana se observó que los 10 sueros problemas presentaban afinidad por la cutícula de la LI y algunos gránulos de fluorescencia en la cavidad celómica (Figura 4). En 2 sueros se presentó un puntillero en la cavidad celómica, que aparenta los esticosomas (Figura 4). Los controles fueron negativos durante las doce semanas del estudio.

**Permeabilización de larvas.-** Al valorar el efecto de la permeabilización de las LI, de T. spiralis se observó afinidad de la fluorescencia a lo largo de la cavidad celómica y en cutícula; en las larvas no tratadas con tritón X-100, se observó igual afinidad (Figura 5). Los controles fueron negativos.

**Isotipos de anticuerpos antitriquina.-** La distribución topográfica de los anticuerpos en la larva, y su isotipo; analizada por pruebas de inmunoperoxidasa indirecta. Se encontró en las primeras tres semanas que todos los sueros fueron negativos a los diferentes tipos de inmunoglobulinas, a partir de la cuarta semana, la IgM en la superficie corporal con predominio en la cutícula, a partir de la quinta semana la IgG se encontró localizada en la cavidad celómica en forma de puntillero lineal (Figura 6); la IgA se distribuyó en toda la superficie larvaria. Los controles fueron negativos (Figura 6).

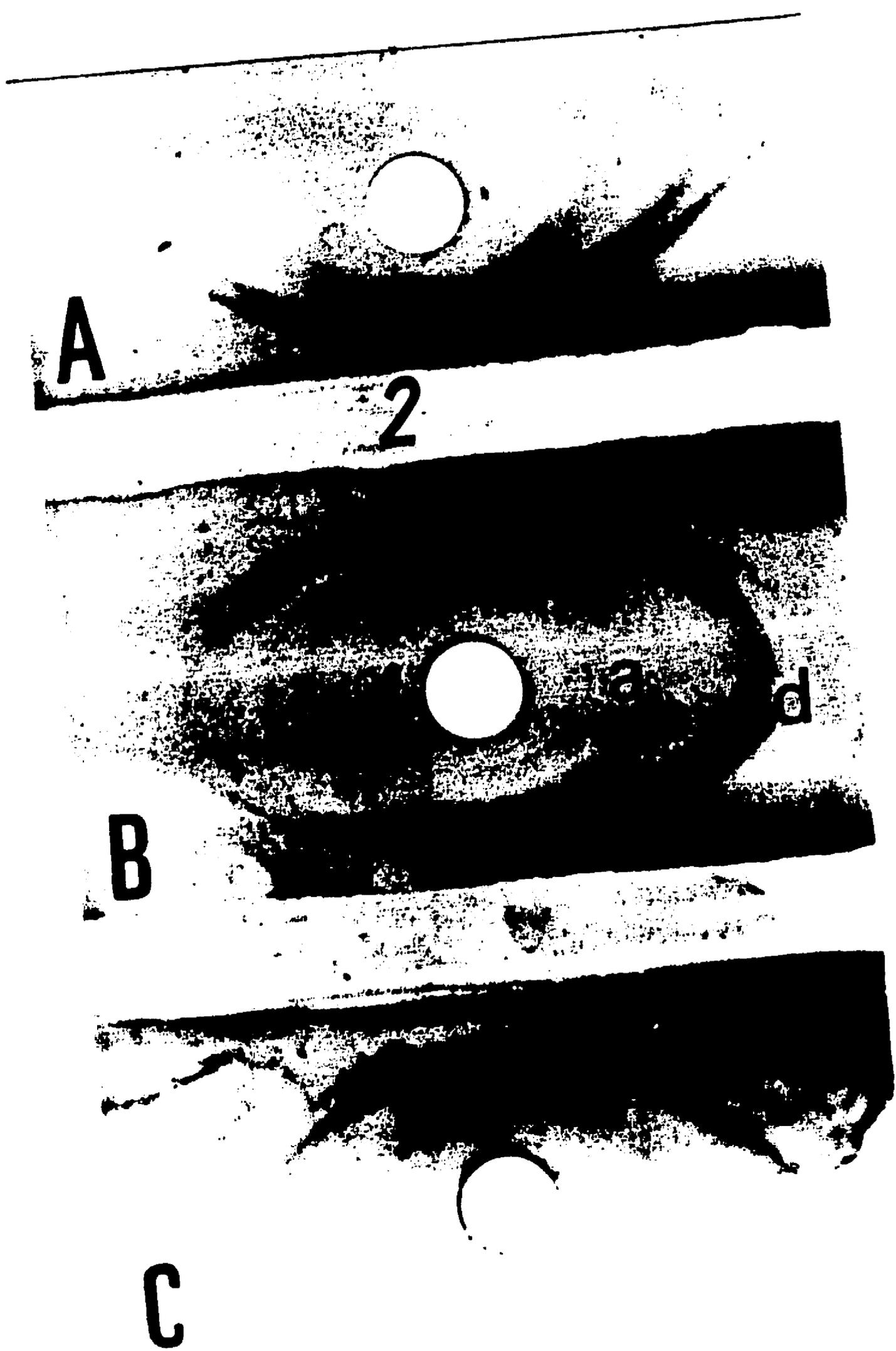


FIGURA 3.- I.E.F. en A, B, C, se observan diferentes bandas de precipitación entre el AST (1) y los Acs anti-Trichinella (2).

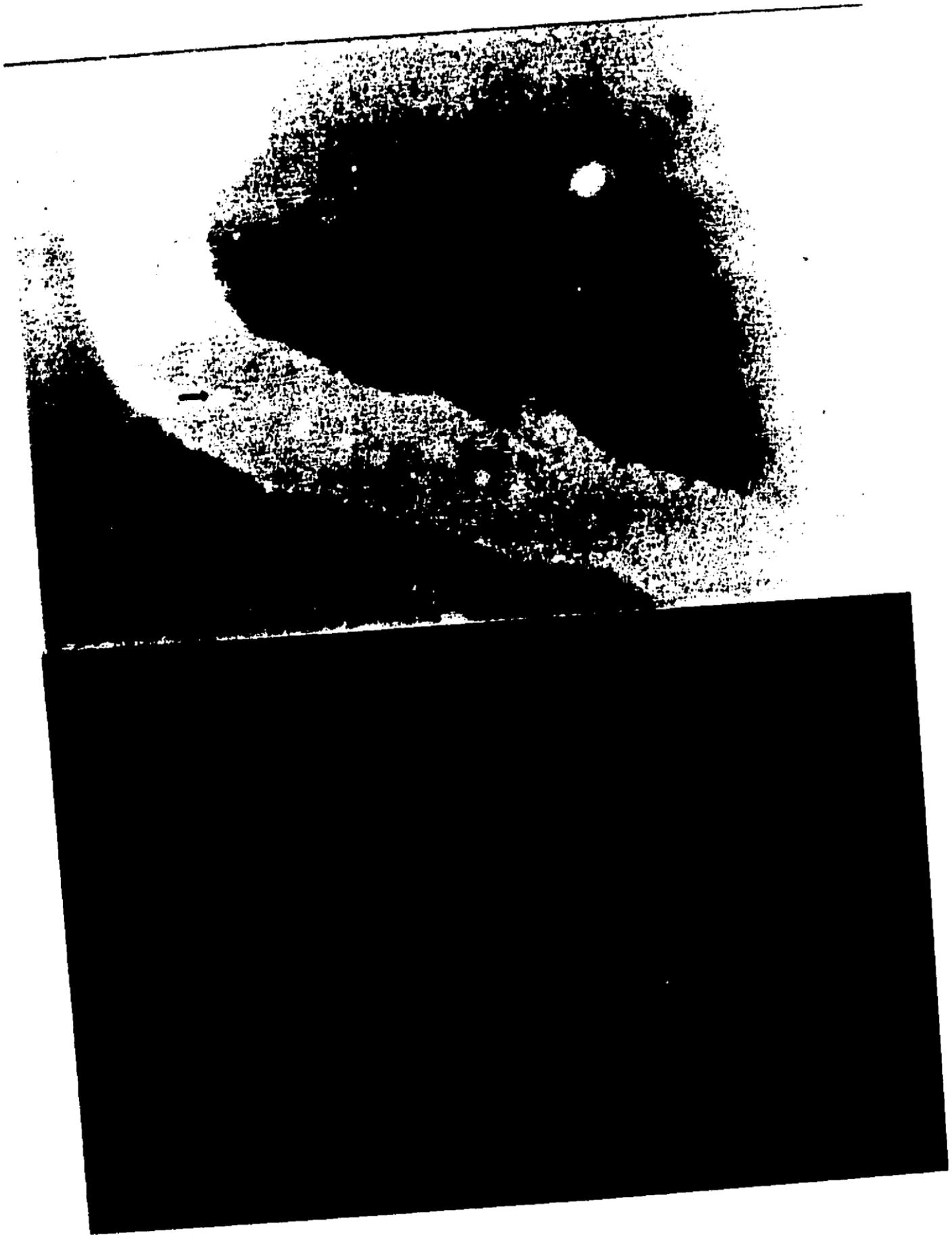


FIGURA 4.- I.F.I. En 1 se localiza afinidad de la fluorescencia en la cavidad celómica en forma de puntillero lineal. En la 2, la afinidad es en la superficie corporal y cutícula.

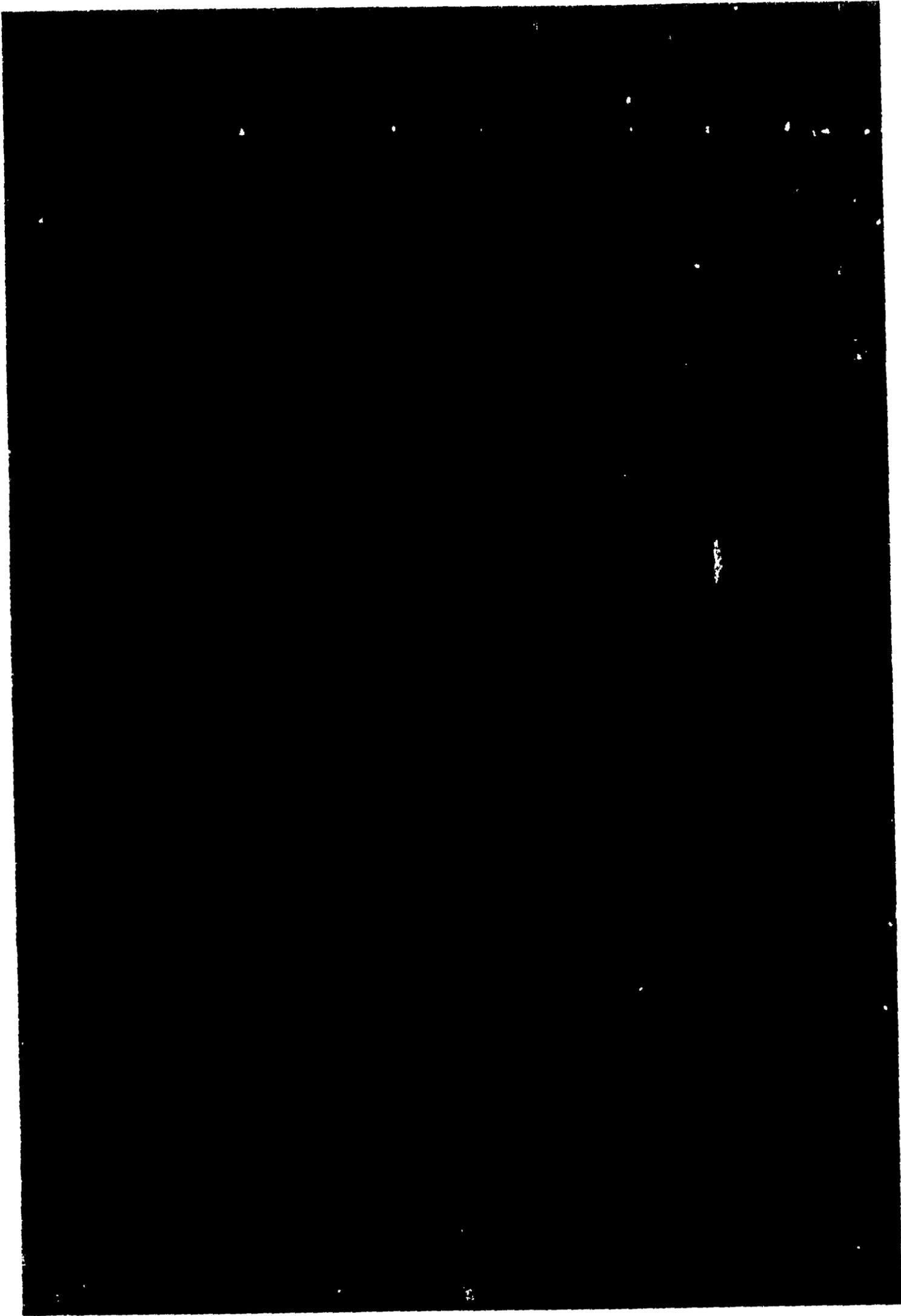


FIGURA 5.- I.F.I. A: Larvas permeabilizadas. B: Larvas sin permeabilizar. semejante afinidad.

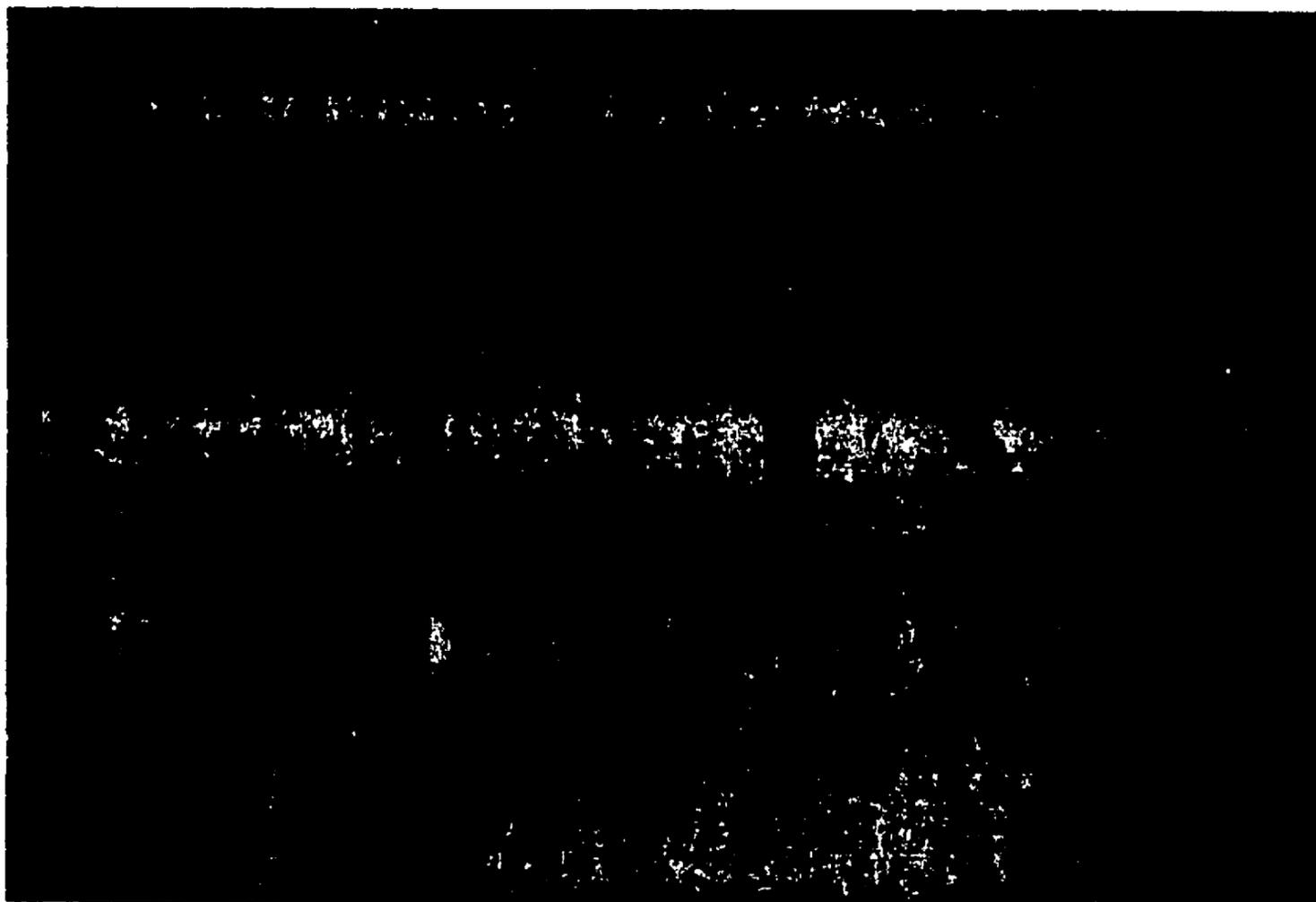


FIGURA 6.- Inmunoperoxidasa. A: LI con suero de conejos sanos, de la quinta semana. B: LI con suero de animales infectados de la quinta semana, tratados con anti IgG de conejo, se observa un puntilleo en cavidad celómica.

**Características anatómicas y moleculares de los antígenos.-** La IgG purificada por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Celulosa, la fracción de IgG fue obtenida en el primer pico con un buffer de fosfato (0.1 M, pH 8.4). Se determinó la presencia de IgG por precipitación en gel utilizando antisueros monoespecíficos anti IgG, IgM e IgA. En La fracción de IgG se determinó su actividad antitriquina por IFI encontrando que después de ser sometida a purificación conservaron su actividad antitriquina localizándose la fluorescencia en forma preferencial en los esticosomas.

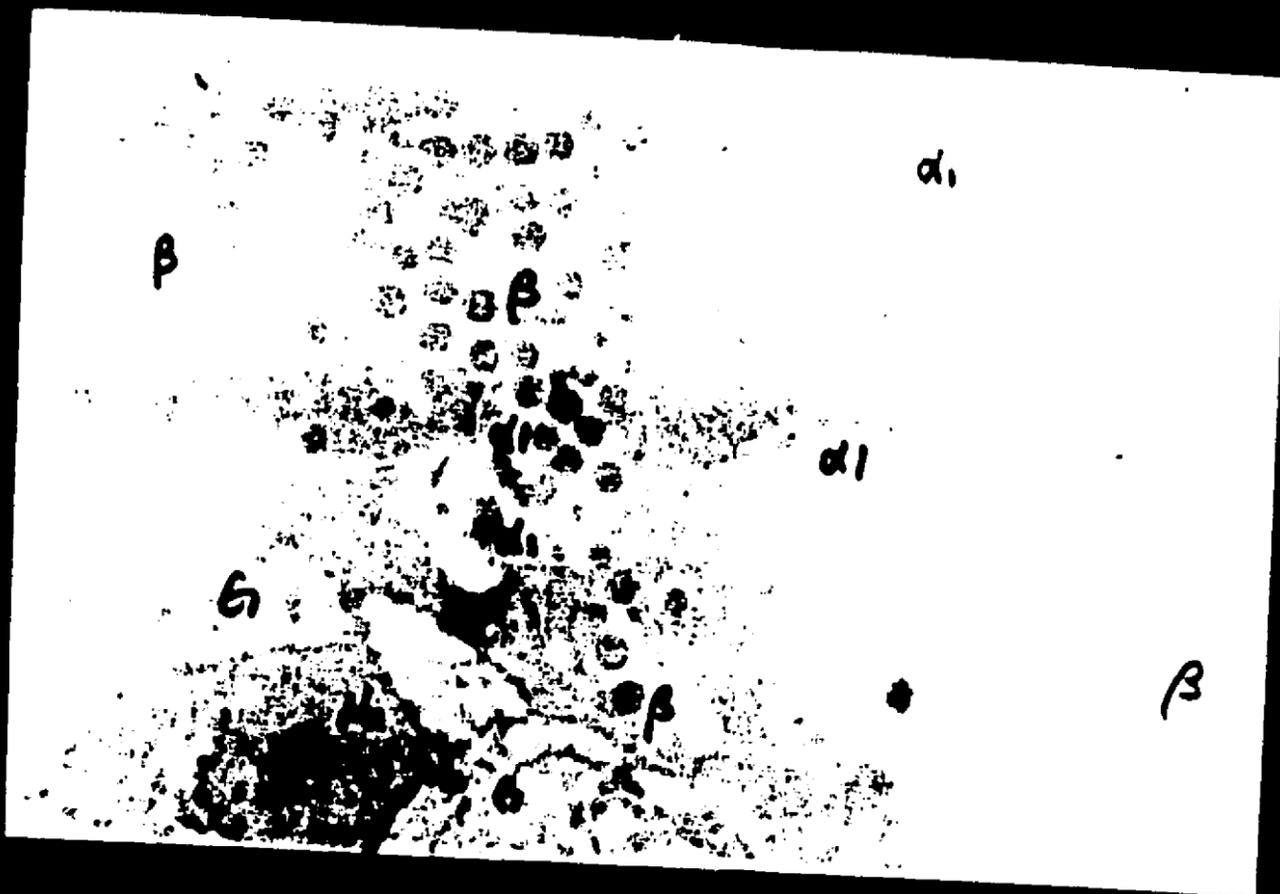
Esta fracción fue enviada al Departamento de Parasitología de Nara Medical University al Dr. Takahashi para estudio de ultraestructura. Reportando que esta fracción de los conejos infectados por *T. spiralis* tienen una reacción específica con los gránulos de los esticocitos  $\alpha 0$ ,  $\alpha 1$ ,  $\beta$  y en menor proporción con la cutícula, en los controles no se observaron depósitos del complejo proteína A oro coloidal (Figura 7).

**Características moleculares de los antígenos purificados de *Trichinella spiralis*.-** El antígeno soluble de triquina (AST) parcialmente purificado por cromatografía de filtración en gel Sephadex G-200 y luego en la cromatografía de afinidad Sepharosa-4B fue caracterizado por electroforesis de poliacrilamida, demostrando 5 bandas protéicas con pesos moleculares de 69 kD, 52 kD, 45 kD, 42 kD y 38 kD, con el predominio de la de 45 kD (Figura 8).

**Electroforesis de poliacrilamida, Western blot y autorradiografía.-** Del total de 240 sueros obtenidos durante el estudio, se analizaron 86 muestras por estas técnicas. En una primera fase, treinta sueros que correspondieron a 20 positivos y 10 negativos por precipitación en gel.

Los sueros de los animales infectados reconocieron varios componentes antigénicos en el extracto crudo, cuyo rango de peso molecular fue de 29-97 kD. La reacción resultó específica a diferentes diluciones del suero (1:200, 1:1,000, 1:10,000). La reactividad predominante fue a un triplete de 50 kD, 47 kD y 45 kD en el 100% de los sueros estudiados.

Los 56 sueros restantes (muestras secuenciales), 21 correspondían a las primeras 3 semanas postinfección y eran negativos por precipitación en gel; se encontró, que 11 de ellos presentaron reactividad a la banda de 45 kD y el resto eran negativos, de los 35 sueros restantes que eran positivos por precipitación en gel, 33 presentaron el triplete descrito y los 2 restantes reaccionaron hasta la 5 semana; la banda de 68 kD también persistió en 55 sueros positivos (Tabla 4 y Figura 9).



2

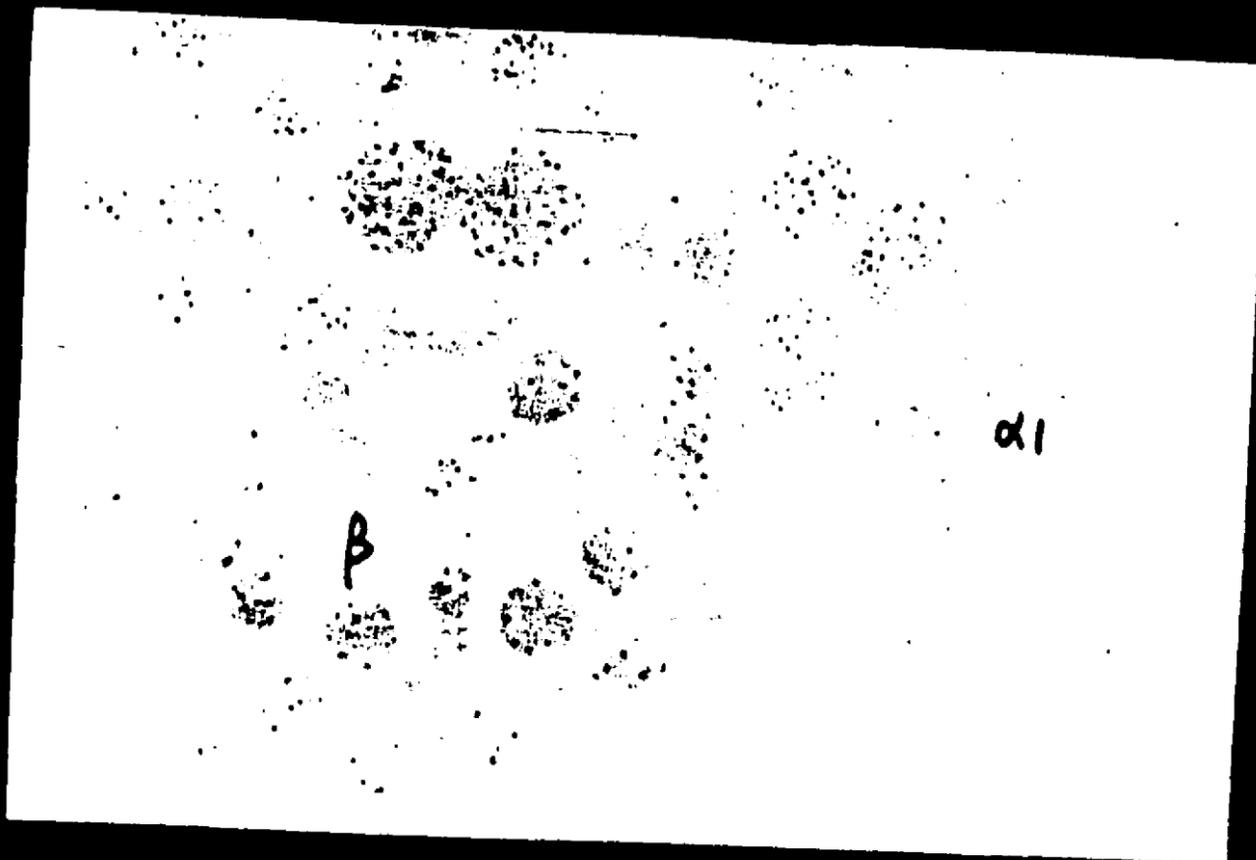


FIGURA 7.- Microscopía electrónica. 1: Suero negativo no se observa afinidad por los esticosomas. 2: Suero positivo a Triquina y que presentó afinidad en cavidad célomica en forma de puntilleo, se observa depósito del complejo proteína A oro coloidal en los esticocitos  $\alpha$  1 y  $\beta$ . Fotos: Dr. Yuzo Takahashi.

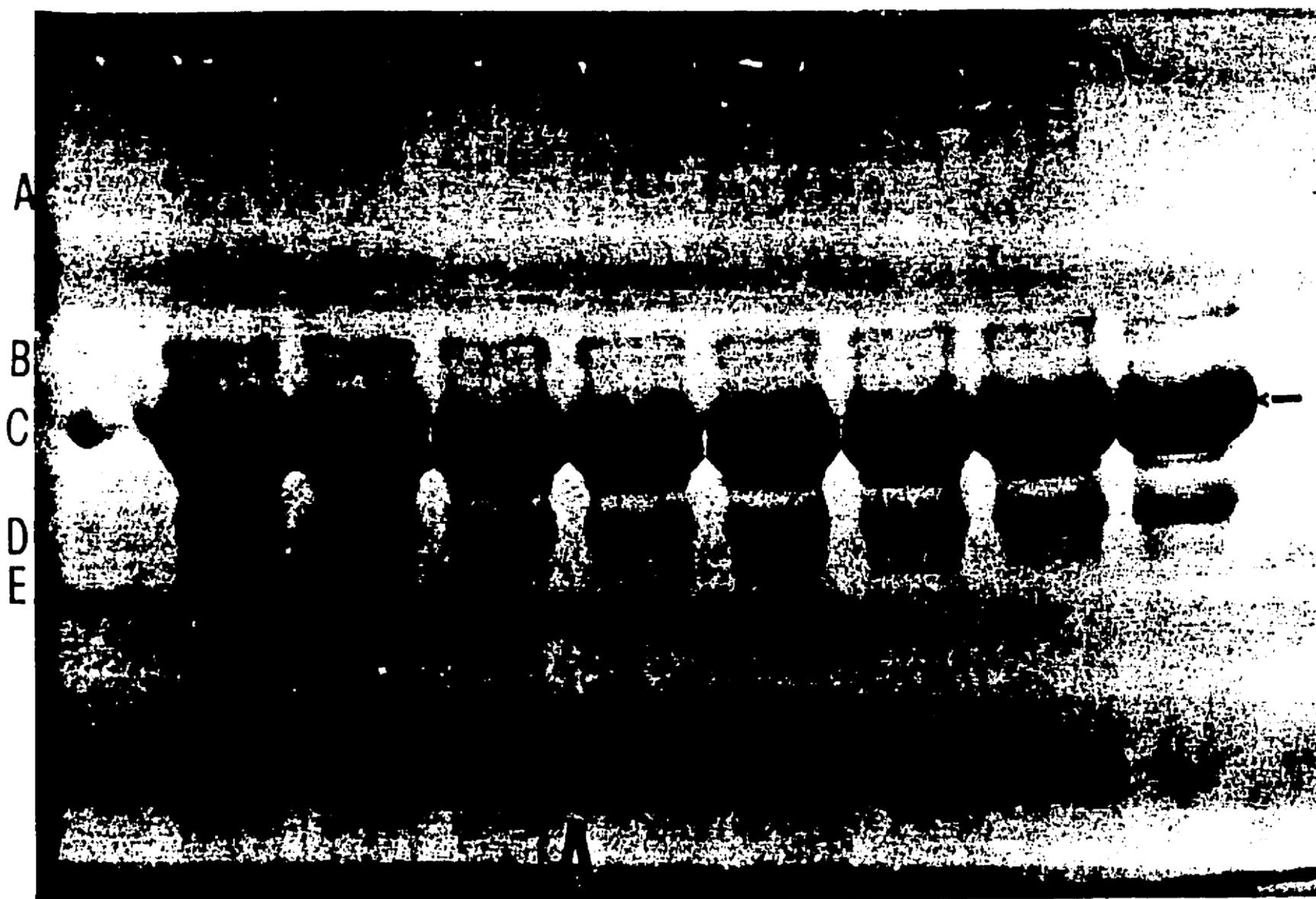
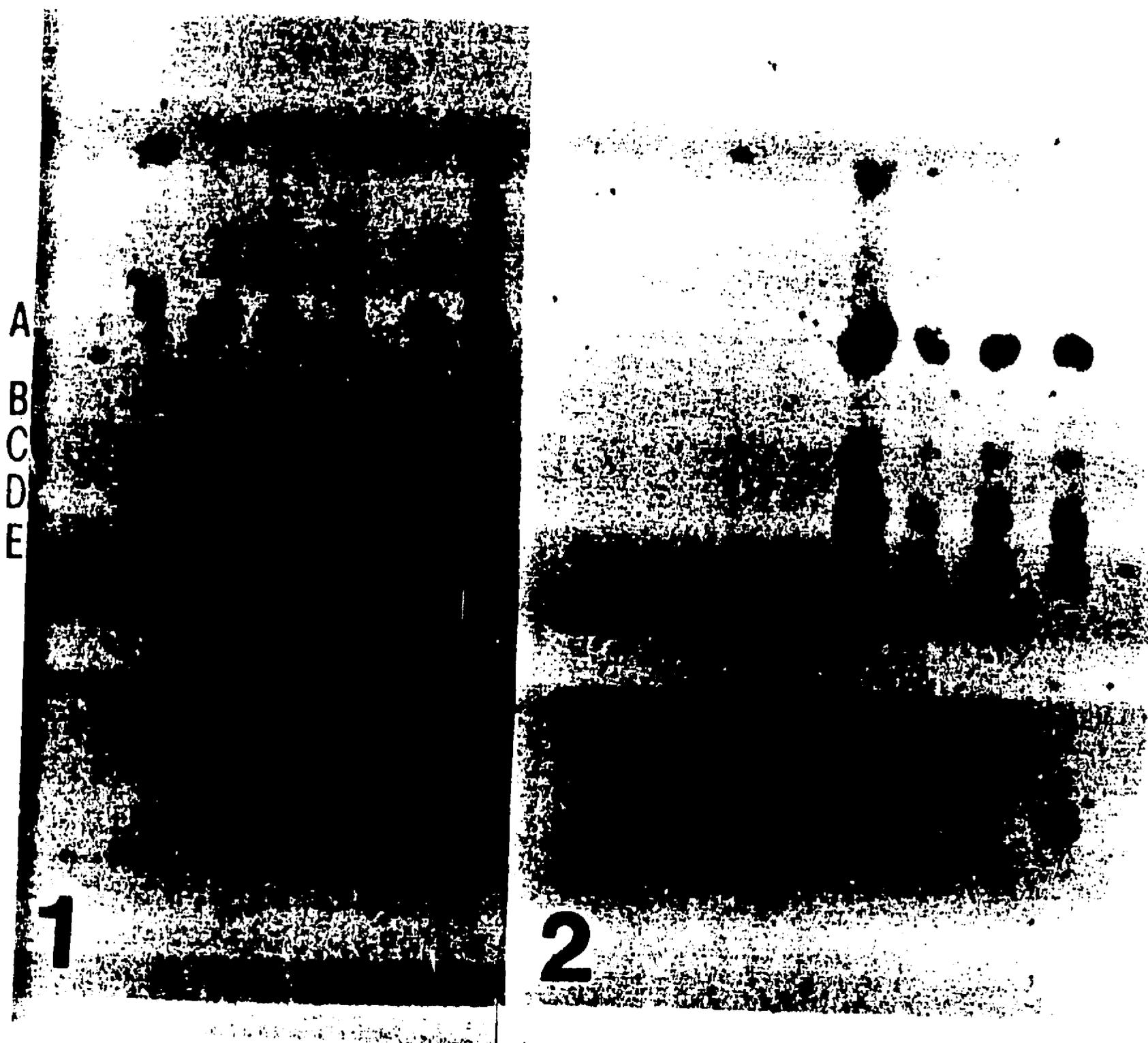


FIGURA 8.- EGPA del AST (A) con el predominio de una banda de 45 kD, en el primer carril, se encuentran los pesos moleculares.

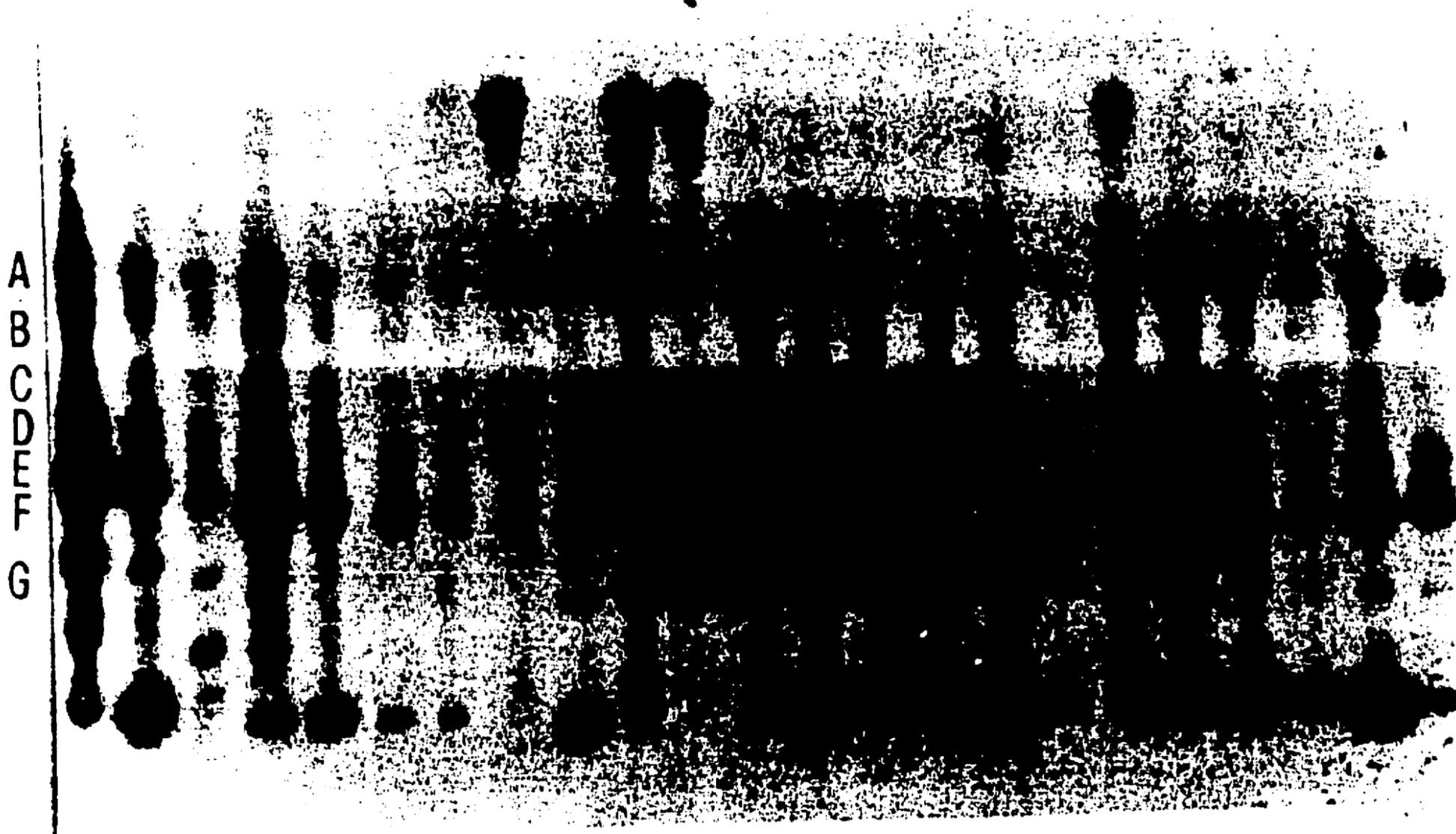
TABLA IV.- Antígenos reconocidos por *Western blot* (dilución 1:200) en infección por *T. spiralis*, en 55 sueros positivos por precipitación en gel.

Bandas	kD	Sueros	%
A	18	55	100
B	45	55	100
C	48	55	100
D	50	55	100
E	68	55	100
F	90	55	100

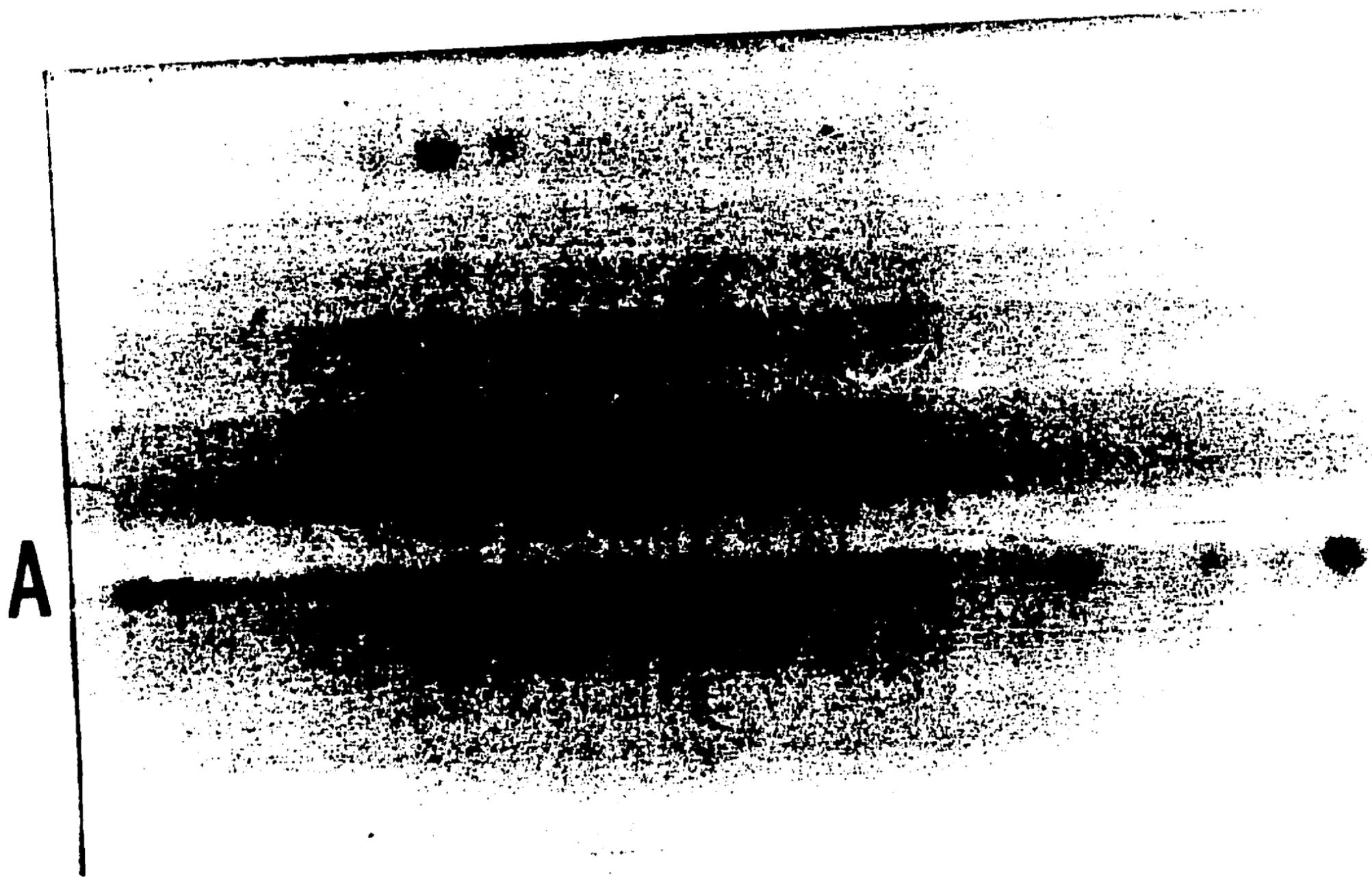


**FIGURA 9.-** Western Blot. 1: Se observa una banda de 45 kD (desde la segunda semana) y desde la cuarta el triplete ya mencionado (a, b, c). 2: Similar a la cuarta semana.

A los sueros positivos 1:200, se les realizó otra prueba con una dilución 1:1,000, encontrando un promedio de 7 bandas con el predominio del triplete (Figura 10), a su vez, los positivos se analizaron 1:100,000 y todos reaccionaron con la banda de 45 kD (Figura 11), por último, todos fueron negativos a una dilución de 1:1,000,000.



**FIGURA 10.-** Western Blot de sueros positivos anti-triquina a una dilución de 1:1,000, se detectan hasta 7 bandas.



**FIGURA 11.-** Western blot de sueros positivos de anti-Triquina a dilución de 1:10,000, persistiendo la banda de 45 kD (A).

## DISCUSION

Al evaluar la cinética de la respuesta inmune humoral en un modelo experimental de triquinosis en conejo; se observó que la Trichinella spiralis proporciona un modelo favorable de estudio, ya que todo su ciclo de vida puede llevarse a cabo en un solo huésped y proporciona información sobre los mecanismos que participan en la inducción de la respuesta inmune, este modelo fué útil para explorar mejores y más sensibles métodos de diagnóstico. Por otra parte, nuestros resultados demuestran que los conejos infectados con LI de Trichinella spiralis producen anticuerpos en contra de epítopes que se expresan en la superficie del parásito y en los componentes del tubo interno (esófago), que al expulsar sus secreciones son accesibles al sistema inmune del huésped.

La respuesta inmune en los animales infectados demostró ser heterogenea, ya que en pruebas de precipitación en agar, fué posible detectar cuando menos 4 bandas que identifican diferentes sistemas antígeno-anticuerpo.

Los estudios de I.F.I. mostraron que el antígeno de superficie se localiza en la cutícula y en la cavidad celómica en forma de puntillado lineal. En cuanto a los isotipos de inmunoglobulinas, se identificó que el primer isotipo detectado es la IgM, esto ocurre a la cuarta semana postinfección, y es indicativo de una respuesta primaria. A partir de la quinta semana, estos anticuerpos son reemplazados por IgG, correspondiendo a una respuesta secundaria habitual.

Por estudios de inmuno-electromicroscopía, se observó que algunos sueros reaccionaron en forma preferencial, con estructuras del esticosoma y que reconocen diversas moléculas secretorias localizadas en los gránulos de los esticocitos  $\alpha 0$ ,  $\alpha 1$ ,  $\beta$  y en menor proporción en cutícula; estos hallazos estructurales e inmunoquímicos, sugieren que el sistema de antígenos secretorios juega un papel importante en la respuesta inmune, el cual es bastante complejo.

Las características moleculares demuestran el reconocimiento de varias fracciones antigénicas con rango de 29 kD a 97 kD, siendo la más prominente la de 45 kD que probablemente corresponde a un antígeno inmunodominante del parásito, ya que los sueros de este antígeno purificado por cromatografía de afinidad tienen un patrón de reactividad inmunológica similar que el extracto crudo y todos los animales infectados reconocen esta banda, aún con sueros diluidos 1:10,000, esta proteína de 45 kD se localiza en gránulos  $\alpha$  de los esticocitos.

Estos resultados demuestran, que si bien, existe un antígeno inmunodominante en el extracto crudo, la respuesta es heterogénea, por lo que significado que tienen los anticuerpos en relación a la protección específica del huésped, es difícil de evaluar, en

el modelo que se utilizó en el presente estudio.

Es característico que las infecciones por parásitos estimulen más de una vía de respuesta inmune, el presente estudio enfocó exclusivamente la respuesta humoral. Otros autores han estudiado este modelo experimental, con resultados similares a los aquí reportados.

Desde 1928 Bachman demostró en conejos y cobayos infectados con T. spiralis que el suero presentaba una reacción de precipitación al ser enfrentado a partículas del parásito. En la década de los 70s, Despommier llevó a cabo estudios de precipitación en gel (ID, CIEF y IEF) con antígenos parcialmente purificados reportando que son de utilidad y que poseen ciertas ventajas, por ejemplo, con la CIEF, en 1 hora se observan resultados de positividad, un inconveniente es la reacción cruzada que se tiene con otros antígenos. Este mismo autor al inmunizar animales con antígenos purificados, obtuvo hasta 12 sistemas antígeno-anticuerpo diferentes, por precipitación en gel.

La respuesta inmune humoral en modelos experimentales y en el humano, se manifiesta por aumento de inmunoglobulinas en forma policlonal contra estructuras del parásito; la IgG presenta especificidad contra las células del esticocoma y la IgM contra la cutícula<sup>7,43,47,67,76</sup>.

Varios autores, entre ellos, Capo, Chapa, Denkers, Despommier, Herrera, Ortega y Takahashi, han reportado una relación entre las características ultraestructurales del parásito Trichinella spiralis relativo a su composición (cutícula, tubo interno y espacio pseudocelómico) y la afinidad que tienen los anticuerpos, contra los antígenos secretados por cada una de sus estructuras, así como la metodología más adecuada para su detección<sup>15,22,23,28,30-36,45,73,74,86-89,91,92</sup>.

Es importante tener en cuenta que los elementos involucrados en desencadenar la respuesta inmune en contra de Trichinella spiralis son determinados por las características del huésped y del parásito, así como el estadio del ciclo vital, cambios bioquímicos asociados a su alimentación, digestión, toma de nutrientes, biosíntesis, crecimiento, metabolismo y reproducción; por otra parte, la respuesta inmune del huésped depende de sus condiciones generales como: sexo, edad, estado nutricional, hormonal, inmunodeficiencias, entre otras<sup>6,16,28</sup>.

Despommier describe que los esticocitos son de 2 tipos, uno contiene gránulos  $\alpha$  y otro  $\beta$ ; éstos han sido purificados y por medio de monoclonales, se definió que los esticocitos tienen un peso molecular de 37 kD, 48 kD, y 50/55 kD. Al utilizar antígenos de los gránulos secretorios como inmunógenos, obtuvo altos niveles de protección<sup>31-36</sup>. En sus más recientes observaciones reporta la formación de una célula nodriza la cual secreta un antígeno de 43 kD, que parece corresponder al inmunodominante de 45 kD. La variación de 2 a 3 kD en el rango de pesos

moleculares, no tiene gran significado, ya que es debido a diferentes modalidades técnicas.

Takahashi por microscopía electrónica reporta que los sueros de animales infectados por Trichinella spiralis, están dirigidos contra antígenos secretorios de los esticocitos  $\alpha$  en las células anteriores y  $\beta$  en células posteriores<sup>87,88,90</sup>.

Ortega y col llevaron a cabo un estudio con anticuerpos monoclonales, sobre los antígenos de superficie de la Trichinella spiralis en diferentes estadios, encontrando que los esticocitos son el sitio de producción de los antígenos de superficie<sup>73,74</sup>.

Cox encontró que los antígenos mayores de 60-120 kD corresponden a cutícula<sup>20</sup> y Wright reporta que estos antígenos de cutícula, son secretados en los esticocitos  $\alpha$ <sup>105</sup>. Los estudios citados apoyan, que el esófago está formado por esticosomas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y compuestos por esticocitos, que son las células que secretan material antigénico, el cual es importante en la respuesta inmune del huésped. Parkhouse compara al parásito Trichinella spiralis es como una ventana, ya que siempre está en relación su interior y exterior.

Los autores que han llevado a cabo estudios de ELISA para detección de anticuerpos contra Trichinella spiralis en modelos experimentales (conejo, rata, ratón y cerdo) y en humano con antígenos purificados y extratos totales, han encontrado que el método de ELISA es una prueba con una adecuada sensibilidad, que permite poner de manifiesto la reacción antígeno-anticuerpo y que es útil para el diagnóstico de la triquinosis<sup>22,58,71,97,106</sup>. Sin embargo, el *WB* tiene la ventaja de ser una prueba diagnóstica de especificidad molecular, ya que proporciona el perfil del antígeno.

Chapa y Col han demostrado por *WB*, que la respuesta inmune en humanos es inducida por antígenos de 30-105 kD, siendo los inmunodominantes los de 45 y 42 kD<sup>22,23</sup>. Así mismo, Muñoz y Col encontraron en sueros de pacientes con triquinosis, un triplete de 45, 47 y 50 kD, en forma predominante y en menor proporción, bandas de 68, 76 y 97 kD<sup>70</sup>.

Herrera y Col, en un modelo experimental en rata identificaron 6 péptidos antigénicos con peso molecular aproximado de 68 a 28 kD, siendo el más relevante el de 45 kD<sup>45</sup>. En nuestro estudio, encontramos que la mayoría de los animales infectados reconocían el antígeno de 45 kD, desde la primera semana post-infección y sólo uno de ellos, lo detectó hasta la quinta semana. Por otra parte, comparamos por *WB*, tres modelos experimentales, de rata, ratón y conejo, encontrando el triplete ya mencionado (45, 47 y 50 kD), así como la persistencia de una banda de 68 kD.

Nuestro estudio permite evaluar en forma panorámica, lo que ocurre con la respuesta inmune humoral en huéspedes infectados con Trichinella spiralis; resultados

que son acordes con los obtenidos por otros autores nacionales e internacionales, donde se demuestra que las estructuras internas del parásito (esticocitos), son los elementos que desencadenan la respuesta inmune.

En base a los resultados anteriores, concluimos que la Trichinella spiralis es un parásito que ofrece la alternativa de tener un patrón de respuesta similar, en diferentes especies (ratón, rata, conejo, cerdo, incluyendo al hombre); que su ciclo vital se puede estudiar en un solo modelo, como el de conejo, utilizado en este trabajo. Además, se cuenta con la alternativa de varias metodologías para su diagnóstico; por ejemplo, para llevar a cabo un estudio epidemiológico, son útiles las técnicas de precipitación en gel o ELISA, en cambio el *WB* y la autorradiografía, son pruebas más adecuadas, para un diagnóstico preciso. Así mismo, el modelo experimental de Triquinosis en conejos, permite contar con las bases para un mejor conocimiento de la biología de este nemátodo.

## CONCLUSIONES

- 1.- Se demostró la presencia de Acs contra la LI de Trichinella spiralis en el 100% de los conejos infectados con el parásito a partir de la cuarta semana, reconociendo de 1 a 4 sistemas antígeno-anticuerpo por técnicas de precipitación en gel, los controles fueron negativos.
- 2.- Se localizaron ultraestructuralmente los antígenos secretorios, por técnicas de I.F.I. y microscopía electrónica.
- 3.- Se demostró que en los animales infectados con LI de T. spiralis los anticuerpos encuentran predominio por los antígenos de 45 kD, La cual es persistente aún a diluciones del suero de 1:10,000 y se pueden detectar incluso desde la primera semana post-infección, por PAGE, WB y autorradiografía.
- 4.- Se concluye que el modelo experimental de Triquinelosis en conejo es adecuado para el estudio de la cinética de la respuesta inmune humoral.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Ahmad A, Wang CH, Bell RG: A role for IgE in intestinal immunity. *J Immunol.* 146:3563,1991.
- 2.- Bach FJ: *Inmunología*. En Ediciones Ciencia y Técnicas. Editorial Limusa. México. 1989.
- 3.- Bachman GW: An intradermal reaction in experimental trichiniasis. *J Prev Med.* 2:513,1928.
- 4.- Bachman GW: A precipitine test in experimental trichiniasis. *J Prev Med.* 2:35,1928.
- 5.- Beaver CP: The antigenic role of the excretions and secretions of adult *Trichinella spiralis* in the production of immunity in mice. *J Parasitol.* 43:593,1957.
- 6.- Befus D, Bienenstock J: Factors involved in symbiosis and host resistance at the mucosa-parasite interface. *Progr Allergy.* 31:77,1982.
- 7.- Becky EA, Cruz ES, Handa KM, Wassom L: IFN-gamma and IL-5 producing cells compartmentalize to different lymphoid organs in *Trichinella spiralis* infected mice. *J Immunol.* 147:306,1991.
- 8.- Bell RC, McGregor DD, Adams LS: *Trichinella spiralis*: Genetic basis for differential expression of phase-specific intestinal immunity in inbred mice. *Exp Parasitol.* 53:315,1982.
- 9.- Bell RG: Variation in responsiveness to *Trichinella spiralis* infection in inbred rat strains. *Parasitol.* 105:125,1992.
- 10.- Bolas-Fernandez F, Wakelin D: Infectivity, antigenicity and host responses to isolated of genus trichinella. *Parasitology.* 100:491,1990.
- 11.- Botero D: *Parasitosis Humana*. Ediciones corporación para Investigación Biológica. Colombia 1990.
- 12.- Bouree P: *Aide memoire de parasitologie et de pathologie tropicale*. 2a. ed. Flammarion medicine science. République Francaise. 1983.
- 13.- Broman WH: *Parasitología Clínica*. 4a. Ed. Interamericana. México. 1977.
- 14.- Cabral SJ, Villicaña FH, Fragoso UR, Contreras A: Triquinosis en Zacatecas: Perfil epidemiológico 1978-1988. *Infectología.* 2:627,1989.
- 15.- Capo V, Silberstein D, Desponmier DD: Immunocyto localization of the protection-inducing antigens of *Trichinella spiralis* during its steal phase in immune and non-immune

mice. J Parasitol. 72:931,1986.

- 16.- Carman JA, Poud L, Nashold F, Wassom DL, Hayes CE: Immunity to Trichinella spiralis infection in vitamin A-deficient mice. J Exp Med. 175:111,1992.
- 17.- Carrada Bravo T: Las parasitosis del hombre en la República Mexicana: avances recientes y perspectivas. Infectologia. 12:497,1992.
- 18.- Contreras A, Herrera RM, Herrera R: Encuesta seroepidemiológica de triquinosis humana en el estado de Zacatecas. VIII Congreso Nacional de Parasitología. Resumen 24.1988.
- 19.- Contreras A, Herrera R: Triquinosis porcina en el Estado de Zacatecas. Revista Mexicana de Parasitología. 3:25,1992.
- 20.- Cox GN: Molecular and biochemical aspects of nematode collagens. J Parasitol. 78:1,1992.
- 21.- Crandall R, Crandall C: Trichinella spiralis: Immunologic response to infection in mice. Exp. Parasitol. 31:378,1972.
- 22.- Chapa RR, Salinas Tobón MR, Martínez MR, Cedillo R, García E: Diagnosis of human trichinosis by indirect enzyme linked immunosorbent assay. Rev Lat Amer Microbiol. 31:136,1989.
- 23.- Chapa R, Salinas TR, Aguilar DJ, Martínez MR: Recognition of Trichinella spiralis muscle larvae antigens by sera from human infected with this parasite and its potential use in diagnosis. Rev Lat Amer Microbiol. 34:95,1992.
- 24.- Davis GK, Dibner MD, Battey JF: Basic Methods in Molecular Biology. Elsevier Science Publishing, Co., Inc. U.S.A. 302,1986.
- 25.- Del Río A, Herrera DR: Primer hallazgo de Trichinella spiralis en el diafragma de un cadáver en Zacatecas. Nota previa. Salud Pública de México. 26:596,1984.
- 26.- Del Río A, Herrera RM, Herrera R: Triquinosis experimental I. Extracción de antígenos y procedimientos para detectar anticuerpos. Arch Invest Med. 17:359,1986.
- 27.- Denkers EY, Wassom DL, Krco CJ, Hayes CE: The mouse antibody response to Trichinella spiralis defines a single, immunodominant epitope shared by multiple antigens. J Immunol. 144:3152,1990.
- 28.- Denkers EY, Wassom DL, Hayes CE: Characterization of Trichinella spiralis antigens sharing an immunodominant, carbohydrate-associated determinant distinct from phosphorylcholine. Mol Bioch Parasitol. 41:241,1990.
- 29.- Dick TA, Lu M, de Vos T, Ma K: The use of the polymerase chain reaction to identify porcine isolates of Trichinella. J Parasitol. 78:145,1992.

- 30.- Despommier DD, Müller B, Fruitstone M: Immunodiagnosis of human Trichinosis using counterelectrophoresis and agar gel diffusion techniques. *Am J Trop Med Hyg.* 23:41,1974.
- 31.- Despommier DD, Müller M: The stichosome and its secretion granules in the mature muscle larvae of Trichinella spiralis. *J Parasitol.* 62:775,1976.
- 32.- Despommier DD, Lacceti A: Trichinella spiralis: Protein and antigens isolated from a large-particle fraction derived from muscle larva. *Exp Parasitol.* 51:279,1981.
- 33.- Despommier DD, Lacceti A: Trichinella spiralis: Partial characterization of antigens isolated by immuno-affinity chromatography from the large-particle fraction of the muscle larvae. *J Parasitol.* 67:332,1981.
- 34.- Despommier DD, McGregor DD, Crum ED, et al: Immunity to Trichinella spiralis. II. Expression of immunity against adult worms. *Immunol.* 33:797,1977.
- 35.- Despommier DD, Müller M: The stichosome of Trichinella spiralis: its structure and function. *J Parasitol.* 566:76,1970.
- 36.- Despommier D, Symmans WF, Dell R: Changes in nurse cell nuclei during synchronous infection with Trichinella spiralis. *J Parasitol.* 77:290,1991.
- 37.- Edlinger J, Grecis RK, Wakelin D: Antigen-specific T-cell lines transfer protective immunity against Trichinella spiralis *in vivo*. *Immunol.* 58:57,1986.
- 38.- Fragoso R, Tavizón P, Villicaña H: Un brote de triquinosis en Laguna del Carretero, Zacatecas. *Rev Dialogo Abierto (Universidad Autónoma de Zacatecas, Mex.)*. 1:24,1983.
- 39.- Gamble HR, Graham CE: Monoclonal antibody-purified antigen for the immunodiagnosis of Trichinosis. *Am J Vet Res.* 45:67,1984.
- 40.- Gansmuller A, Anteunis A, Venturiello SM, Bruschi F, Binaghi RA: Antibody-dependent *in vitro* cytotoxicity of newborns Trichinella spiralis larvae: nature of cell involved. *Parasite immunol.* 9:281,1987.
- 41.- GhildyN, McNeil PH, Stechschulte S, Austen KF, Silberstein D, Gurish GF, Somerville LL, Stevens RL: IL-10 induces transcription of the gene for mouse mast cell protease-1, a serine protease preferentially expressed in mucosal mast cells of Trichinella spiralis infected mice. *J Immunol.* 149:2123,1992.
- 42.- Gleich GJ, Loegering DA, Frigas E, et al: The major basic protein of the eosinophil granule: physicochemical properties, localization and function; in Mahmoud, Austen. *The eosinophil, its role in health and disease*, 79, Grune Stratton, New York. 1980.

- 43.- Gold MA, Despommier DD, Stephen WB: Partial characterization of two antigens secreted by L1 larvae of Trichinella spiralis. Mol Biochem Parasitol. 41:187,1990.
- 44.- Herrera RM, Villalobos R, Saldivar S, Muñoz E, Perez O, Avalos E, Herrera R: Local immune response of intestinal epithelia in experimental Trichinellosis. 67th Annual Meeting The American Society of parasitologist. J Parasitol. 86,1992.
- 45.- Herrera ER, Del Rio CA, Avalos DE, Herrera RM: Trichinella spiralis immunochemical characterization of antigens in experimental infections. Exp Parasitol. 63:233,1987.
- 46.- Herrera R, Varela R, Morales G, Del Río A, Gallardo JM: Dermatomyositis-like syndrome caused by trichinae. Report of two cases. J Rheumatol. 12:782,1985.
- 47.- Hussain R, Ottesen EA: IgE responses in human filariasis. IV. Parallel antigen recognition by IgE and IgG4 subclass antibodies. J Immunol. 136:1859,1986.
- 48.- Hussain R, Grogl M, Ottesen EA: IgG antibody subclasses in human filariasis. Differential subclass recognition of parasite antigens correlates with different clinical manifestation of infection. J Immunol. 139:2794,1987.
- 49.- Ismail MM, Tanner CE: Trichinella spiralis: Peripheral blood, intestinal, and bone-marrow eosinophilia in rats and its relationship to the inoculating dose of larvae, antibody response and parasitism. Exp Parasit. 31:262,1972.
- 50.- Jackson GJ: Fluorescent antibody studies of Trichinella spiralis infections. J Infect Dis. 105:97,1959.
- 51.- Jensen DL, Castro GA: Trichinella Spiralis: Generation in the presence of rat serum of factors chemotactic for rat cells. Exp Parasitol. 52:53,1981.
- 52.- Krco CJ, Wasson DL, Abramson JE, David CS: Cloned T cell recognize Trichinella spiralis antigen in association with an IgE restriction element. Immunogenetics. 18:435,1983.
- 53.- Krco CD, David CS, Wassom DL: Characterization *In vitro* proliferation response to solubilized Trichinella spiralis antigens: Role of Ia antigens and  $I_2-1^+$  T cells. Cell Immunol. 68:359,1982.
- 54.- Labzoffsky NA, Baratawidjaja BK, Kuitunen E, Lewis FN, Kavelman DA, Morrissey LP: Immunofluorescence as an aid in the early diagnosis of trichinosis. Canad Med Ass J. 90:920,1964.
- 55.- Laemmli UK, Favre M: Maturation of the head of bacteriophage TA I DNA packing events. J Mol Biol. 80:5757,1973.
- 56.- Lamm DA, Wakelin D, Mitchell LA, Tuohy M, Else KJ, Grecis RK: Genetic influences upon eosinophilia and resistance in mice infected with Trichinella spiralis.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Parasitol. 105:117,1992.

- 57.- Lee DL, Ko RC, Yi XY, Yeung HF: Trichinella spiralis: antigenic epitopes from the stichocytes detected in the hypertrophic nuclei and cytoplasm of the parasitized muscle fibre (nurse cell) of the host. Parasitol. 102:117,1991.
- 58.- Leek ML, Dames JB, Littel RC: Minimizing ELISA background in the diagnosis of swine trichinellosis. J Parasitol. 78:822,1992.
- 59.- Ljungstrom I, Ruitenberg EJ: A comparative study of the immunohistological and serological response of intact and T cell-deprived mice to Trichinella spiralis. Clin Exp Immunol. 24:146,1976.
- 60.- Mackenzie CD, Jurger M, Taylor PM, Ogilvie BM: Activation of complement, the induction of antibodies to the surface of nematodes and the effect of these factors and cells on worm survival in vitro. Eur J Immunol. 10:594,1980.
- 61.- Mackenzie CD, Jungery M, Taylor PM, Ogilvie BM: The in vitro interaction of eosinophils, neutrophils, macrophages and mast cells with nematode surface in presence of complement or antibodies. J Parasitol. 113:161,1981.
- 62.- Mahanty S, Abrams JS, King CL, Limaye AP, Nutman TB: Parallel regulation of IL-4 and IL-5 in human helminth infections. J Immunol. 148:3567,1992.
- 63.- Marier R, Jansen M, Andriole VT: A new method for measuring antibody using radiolabeled protein A in solid-phase radioimmunoassay. J Immunol Meth. 28:41,1979.
- 64.- Marti HP, Murrel KD: Trichinella spiralis: antifecundity and antigen born larvae immunity in swine. Experimental Parasitology. 62:370,1986.
- 65.- Marinculic A, Gamble HR, Zaringa DS, Rapic D, Kozaric Z, Imamovic V, Murrel KD: Characterization of a noncyst-forming isolate of Trichinella from a wild boar in Yugoslavia. J Parasitol. 77:224,1991.
- 66.- Martínez MR, Trejo J, Delgado AB: Frecuencia de la infección por Trichinella spiralis en 1000 diafragmas de cadáveres en la ciudad de México en 1972-1973. Revista Investigación Salud Pública. 34:95,1974.
- 67.- Matossian RM, Salt I, Stephan E: Variation in serum immunoglobulin levels in acute trichinosis. J Helminthol. 51:1,1977.
- 68.- Mazzoti L, Chavira C: Investigación de triquina en 600 diafragmas humanos de la ciudad de México. Rev Ins Salud Enf Trop. 4:343,1943.
- 69.- Molinari JA, Hess JA, Wesley RK: Sequential mesenteric lymph node histological response following Trichinella spiralis infection. Int Archs Allergy Appl Immun. 69:81,1982.

- 70.- Muñoz ME: Disección Molecular de antígenos de Trichinella spiralis. Estudio en triquinosis humana. Tesis de Maestría. Centro de Biología Experimental, UAZ. Zacatecas, México. 1992.
- 71.- Nakai Y, Ogimoto K, Yamaguchi T: Detection of human and rabbit antibodies to Trichinella spiralis by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). J Parasitol. 36:328, 1997.
- 72.- Norman L, Kagan IG: Bentonite, latex and cholesterol flocculation tests for the diagnosis of trichinosis. Public Health Reports. 78:227, 1963.
- 73.- Ortega MG, Almond NW, Parkhouse ME: Applications of Biochemically defined antigens of Trichinella spiralis in host immunity, protection and diagnosis. W Parazytologiczne. 4:420, 1987.
- 74.- Ortega MG, Mackenzie CD, Parkhouse ME: Protection against Trichinella spiralis induced by a monoclonal antibody that promotes killing of newborn larvae by granulocytes. Parasite Immunol. 6:275, 1984.
- 75.- Pearce EJ, Sher A: Immunity to helminths. Current Opinion in Immunology. 2:375, 1990.
- 76.- Perrudet BA, Binaghi RA, Boussac AY: Production of different classes of immunoglobulins in rats infested with Trichinella spiralis. Immunochemistry. 13:443, 1976.
- 77.- Philip M, Parkhouse ME, Ogilvie BM: Changing protein on the surface of a parasitic nematode. Nature. 287:538, 1980.
- 78.- Pond L, Wassom DL, Hayes CE: Influence of resistant and susceptible genotype, IL-1 and lymphoid organ on Trichinella spiralis induced cytokine secretion. J Immunol. 149:957, 1992.
- 79.- Pozio E, La Rosa G, Murrell DL: Taxonomic revision of the genus Trichinella. J Parasitol. 78:654, 1992.
- 80.- Rivera OC, Nussenzweig R: Trichinella spiralis Anaphylactic antibody formation and susceptibility in strains of inbred mice. Exp Parasitol. 39:7, 1976.
- 81.- Rose ML, Delphine M, Parrot V, Bruce RG: Migration of lymphoblasts to the small intestine. I. Effect of Trichinella spiralis infection on the migration of mesenteric lymphoblasts and mesenteric T lymphoblasts in syngenic mice. Immunol. 31:723, 1976.
- 82.- Salinas TR, Chapa RR, Ortega PG: Utilidad de los antígenos de superficie de la larva muscular (Ags de la LM) de Trichinella spiralis en el diagnóstico de la triquinosis humana. X Congreso Nacional de Inmunología. Ixtapa Zihuatanejo, Guerrero. Cartel 072, 1993.

- 83.- Silberstein DS, Despommier DD: Antigens from Trichinella spiralis that induce a protective response in the mouse. *J Immunol.* 132:898,1984.
- 84.- Stites DP, Stobos JD, Fudenberg HH, Wells JV: *Inmunología Básica y Clínica.* 7a Ed. El Manual Moderno. 714,1990.
- 85.- Takahashi Y, Yoshikawa Y, Furuki J, Yamada S, Araki T: Morphological study of Trichinella spiralis: an overall picture of a muscle larva as revealed by longitudinal sectioning. *Jpn J Parasitol.* 36:361,1987.
- 86.- Takahashi Y, Mizuno N, Uno T, Aisaka A, Araki T: Spectrum of antibody response with time after Trichinella spiralis infection in rats. *J Parasitol.* 76:230,1990.
- 87.- Takahashi Y, Mizuno N, Shimazu K, Araki T: Ultrastructure, antigenicity, and histochemistry of stichocyte granules of adult Trichinella spiralis. *J Parasitol.* 78:518,1992.
- 88.- Takahashi Y, Uno T, Mizuno N, Susuki H, Yagi J, Araki T: Immunohistochemical localization of antigenic substances in Trichinella spiralis muscle larvae. *Parasitol.* 37:435,1988.
- 89.- Takahashi Y, Uno T, Mizuno N, Susuki H, Yagi J, Aisaka A, Araki T: Morphological study of the stichocyte granules of Trichinella spiralis muscle larvae. *J Parasitol.* 38:77,1989.
- 90.- Takahashi Y, Yoshikawa Y, Kim H, Aisaka A, Yamada S, Araki T: The morphological finding of Trichinella spiralis as revealed by PAS and AZAN stainings. *Jpn J Parasitol.* 74(2):270,1988.
- 91.- Takahashi Y, Uno T, Furuki J, Yamada S, Araki T: The morphology of Trichinella spiralis: Ultrastructural study of the mid and hindgut of the muscle larvae. *Parasitol Res.* 75:19,1988.
- 92.- Takahashi Y, Mizuno N, Uno T, Tokuda C, Araki T: Direct evidence that the cuticle surface of Trichinella spiralis muscle larvae shares antigenicity with stichocyte alfa granules and the esophagus-occupying substance. *J Parasitol.* 76:290,1990.
- 93.- Terry A, Dick ML, Theo V, Kathleen N: The use of the polymerase chain reaction to identify porcine isolates of Trichinella. *J Parasitol.* 78:145,1992.
- 94.- Towbin HT, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76:4350,1979.
- 95.- Tronchin EC, Dutoil E, Verres A, Biguet J: Oral Immunization of mice with metabolic antigens of Trichinella spiralis larvae, effects on the kinetics of intestinal allergic response including mast cell and polymorphonuclear eosinophils. *J Parasitol.* 65:685,1979.

- 96.- Ubelaker JE, Stewart GL, Martin JH: Modification of the ultrastructure of the muscle larva of Trichinella pseudospiralis following exposure to acidified pepsin solution. J Parasitol. 79:133,1993.
- 97.- Vander L, Mata L, Darre B, Littell RC: Minimizing ELISA background in the diagnosis of swine trichinellosis. J Parasitol. 78:822,1992.
- 98.- Vázquez JL, Sánchez C, Martínez R, Morales S, De La Garza H, Stetler H: El mas grande brote de triquinosis reportado en México. IX Congreso Nacional de Parasitología. Cartel 408 México. 1990.
- 99.- Wai F Ch, Mun HN, Pak LL: Trichinella spiralis: Light microscope monoclonal antibody localization and immunochemical characterization of phosphorylcholine and other antigens in the muscle larva. Exp Parasitol. 73:172,1991.
- 100.- Wadworth C: A microtechnique employing a gel chamber compared with other micro and macroplate technique for immunodiffusion. Int Arch Allergy. 21:131,1962.
- 101.- Wassom DL, Wakelin D, Brooks BO, Krco CJ, David CS: Genetic control of immunity to Trichinella spiralis infection of mice. Hypothesis to explain the role of H-2 genes in primary and challenge infection. Immunol. 51:625,1984.
- 102.- Weber K, Osborn M: The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J Biol Chem. 244:4406,1969.
- 103.- Weir DM: Inmunología. Manual moderno. México 1990.
- 104.- Williams JS, Gore RW, Sadum EH: Trichinella spiralis: Antigen antibody interaction assayed by radioactive iodinated antigen. J Parasitol. 31:299,1972.
- 105.- Wright KA, Hong H: Characterization of the accessory layer of the cuticle of muscle larvae of Trichinella spiralis. J Parasitol. 74:440,1988.
- 106.- Xinzhuan S, Prestowood KA: A dot ELISA mimicry Western blot test for the detection of swine trichinellosis. J Parasitol. 77:76,1991.