

40
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

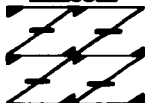
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
" ZARAGOZA "

Efecto de Lactobacillus casei sobre la
resistencia inespecifica de ratones NIH contra
la infección por Trichinella spiralis

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
MANUEL ORDUÑA SANCHEZ

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO SUMAMO EJE
DE NUESTRA REFLEXIÓN

MEXICO, D. F.

JUNIO 1997

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.

**EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACION SE
DESARROLLO EN EL LABORATORIO DE
INMUNOPARASITOLOGIA DEL DEPARTAMENTO DE
PARASITOLOGIA DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS
BIOLOGICAS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL,
BAJO LA DIRECCION DE LA QBP OLGA INTA RODRIGUEZ Y
EL ASESORAMIENTO DE LA QFB YOLANDA FLORES
CABRERA.**

PROYECTO NO. 964263 FINANCIADO POR DEPI

DEDICATORIAS

A DIOS:

Por darme luz a mi camino y ser guía de mis pasos.

A LA VIDA:

Por la oportunidad que me brinda y no defraudare.

A MI MADRE:

Por darme la vida y el valor de seguir siempre adelante.

A MI PADRE:

Por que pase lo que pase siempre estas ahí.

A MIS HERMANOS:

Las palabras sobran con todos ustedes solamente tengo que decirles que los quiero mucho y estoy orgulloso de ser su hermano.

A MIS GRANDES AMIGOS:

Enrique : Por quitarme la venda de los ojos y cambiar mi forma de ver la amistad
GRACIAS.

Armando : Por presionar a que este objetivo y otros más salieran adelante, se que siempre cuento contigo.

Rene : Recuerda que los caminos de la vida se entrecruzan y algún día volveran encontrar.

Antonino: Por enseñarme lo bueno y malo de las cosas, por ahora y siempre seras mi profesor.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS:

Por esos momentos buenos y malos donde todos ustedes estuvieron presentes.

A TODOS MIS PROFESORES:

Que contribuyeron con su granito de arena para la construcción de este objetivo de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en particular a la facultad de Estudios Superiores Zaragoza:

Por permitir el uso de sus instalaciones durante mi formación profesional.

A quienes conforman el jurado de tesis, por sus valiosos comentarios en la revisión de este escrito.

Dr. Ruben Marroquín Segura.

Q.B.P. Olga Ixta Rodríguez.

Q.F.B. Yolanda Flores Cabrera.

Q.F.B. Margarita Chávez Martínez.

Q.F.B. Oscar González Moreno.

A los profesores:

M. en C. Carlos Ramón Bautista Garfías.

M. en C. Federico Martínez Gómez.

Q.B.P. María Eugenia Villarreal.

Q.B.P. Blanca Rosa Aguilar Figueroa.

Por el apoyo y asesoría que brindaron para la realización de la tesis.

A todo el departamento de Parasitología y Morfología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN por permitir el uso de sus instalaciones para la realización de este trabajo.

Agradezco a todos los Laboratorios Clínicos de las UMAI's de la FES Zaragoza dado que pase en cada una de ellas momentos muy importantes de mi formación académica.

**Efecto de Lactobacillus casei sobre la
resistencia inespecífica de ratones NIH contra la
infección por Trichinella spiralis**

INDICE

	PAGINA
INTRODUCCIÓN.	I
ANTECEDENTES.	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	33
OBJETIVOS.	34
HIPÓTESIS DE TRABAJO.	35
MATERIAL Y MÉTODOS.	36
RESULTADOS.	45
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	58
CONCLUSIONES.	62
APÉNDICE.	63
REFERENCIAS.	66

INTRODUCCIÓN.

Trichinella spiralis causa la enfermedad conocida como triquinosis, la cual tiene amplia distribución mundial, constituyendo un problema de salud pública y veterinaria, siendo la carne de cerdo cruda o mal cocida infectada con la larva muscular de este parásito la fuente principal de transmisión de la enfermedad. En México, en el periodo de 1975-1982 ha habido brotes de la enfermedad en diferentes estados de la República Mexicana de los que destacan Zacatecas, Durango, Estado de México y Distrito Federal con 260 casos reportados. [1-3]

La Dirección General de Epidemiología/SS-EPI-1-85 desde 1988 hasta 1994 ha reportado 778 casos lo que indica que la enfermedad esta aumentando [4]

La expulsión de *Trichinella spiralis* es acompañada por un marcado cambio inflamatorio en el intestino del huésped; es posible que la expulsión del gusano sea mediada por la respuesta timodependiente. La respuesta inmune puede afectar a los gusanos en forma directa, reduciendo su capacidad a permanecer en el intestino. [5-8]

Un incremento en la concentración de proteinasas de las células cebadas del intestino sugiere que pueden participar en la inducción de cambios en la permeabilidad del epitelio, promoviendo así el paso de moléculas al lumen intestinal. Otro nivel de acción de los mecanismos de defensa del huésped están dirigidos contra la larva recién nacida, hacia la cual se han determinado efectos citotóxicos de eosinófilos mediado por anticuerpos de la clase IgE e IgG. [2, 9-10]

Una alternativa para el control de enfermedades parasitarias es el uso de inmanomoduladores los cuales actúan incrementando la inmunidad inespecífica del huésped induciendo una gran variedad de citocinas tales como interleucina-1 (IL-1) , IL-6, factor estimulante de colonias (CFS) , factor de necrosis tumoral (TNF) e interferón-gamma (IFN- γ) en ratones y humanos. [11]

En estudios previos se demostró que el adyuvante completo de Freund (FCA), inyectado intraperitonealmente en borregos puede estimular la inmunidad inespecífica contra los parásitos

Haemonchus contortus y *Fasciola hepatica*, sin embargo el FCA es tóxico y no se utiliza como vacuna veterinaria. Recientemente se observó que el mitógeno Concanavalina A (Con-A) inoculado intraperitonealmente estimula una respuesta protectora contra *Toxoplasma gondii*, así como, la protección contra *Trichinella spiralis* en modelos murinos al emplear como inmunostimulantes, la Con-A y el Equimune una semana antes de la infección [12-15]

En años recientes se ha sugerido que la inmunopotenciación del huesped parasitado, podría ser un método factible para incrementar la actividad de un antihelmintico dado, esto se analizo en el modelo murino con dos nematodos, tales como *Nematospiracle dubius* y *Trichinella spiralis* [17]

Por otro lado se demostró que *Lactobacillus casei*, administrado por vía oral, intravenosa o subcutánea a ratones, incrementa la respuesta inmune contra patógenos tales como *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*. [18-19] En otros experimentos se utilizaron *Lactobacillus casei* muertos por calor y estos son efectivos para prevenir la proliferación de bacterias patógenas tales como *Pseudomonas aeruginosa* y *Listeria monocytogenes* [20] por activación de macrófagos de manera inespecífica [18] En niños se ha observado que *L. casei* actúa como un adyuvante cuando es administrado por vía oral junto con una vacuna contra rotavirus[21] Anteriormente se observó que *L. bulgaricus* y componentes de la pared celular del mismo poseen una potente actividad antitumoral, en la inmunoesimulación contra tumores malignos humanos y experimentales [22]

ANTECEDENTES.

La triquinosis es una enfermedad parasitaria de distribución cosmopolita producida por la ingesta de carne cruda o mal cocida de animales silvestres (oso, zorro, lobo, jabalí, etc.) ó domésticos (cerdo, gato, perro, etc.) infectados con la larva del nemátodo *Trichinella spiralis* enquistada en músculo esquelético [1-2, 23-29]

Es una infección comúnmente encontrada en toda Europa, Unión Soviética, Estados Unidos y Centro América. En México no se tienen registros epidemiológicos precisos sobre triquinosis en humanos aunque se han descrito brotes aislados. En nuestro país como en otros la carne de cerdo y sus derivados (chorizo, salchicha, jamón, etc.) son la fuente de infección más común en humanos. Es un padecimiento que predomina en países donde las bajas condiciones socioeconómicas, la insalubridad del ambiente y ciertos hábitos de alimentación favorecen su transmisión [1,27-29]

Ha afectado al ser humano desde tiempos remotos aunque se tienen reportes desde 1828, 1833 y 1835 de autopsias realizadas en Londres. En México como en otras partes del mundo, se descubrió el agente causal en un cadáver, después se estudió la frecuencia de esta parasitosis en series relativamente grandes de autopsias en los años 40' y 70'. [30-32]

Trichinella spiralis es un helminto que pertenece al phylum nematoda, donde se encuentran agrupados otros organismos de importancia médica, como *Ascaris* sp., *Onchocerca* sp. y *Trichuris* sp. [31]

La clasificación de este organismo según Despommier, D. D. [27] se menciona a continuación:

Reino	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
Animal	Nematoda	Aphasmida	Trichurata	Trichinellidae	<i>Trichinella</i>	<i>spiralis</i>

La caracterización de las especies del género *Trichinella* permaneció incierto durante algunos años, esta se basaba principalmente en las características biológicas y su distribución geográfica. Con la comparación de patrones isoenzimáticos de diferentes especies aisladas se reveló la existencia de cuando menos siete especies diferentes de *Trichinella* (ver tabla 1) [33-35]

Tabla 1. Huéspedes específicos de diferentes variedades de *Trichinella spiralis* aisladas.

Especie y variedad	Tipo	Huéspedes	Infectiva Para Los Cerdos
<i>T. spiralis</i> var. doméstica	T1	La mayoría de mamíferos, incluyendo roedores y el humano	Si
<i>T. spiralis</i> var. nativa	T2	Carnívoros, especialmente osos árticos y lobos; humanos, roedores	No
<i>T. spiralis</i> var. nelsoni	T7	Hiena, puerco espín, leopardo, poco infectiva en ratas	No
<i>T. spiralis</i> var. britovi	T3	Carnívoros, especialmente zorros, lobos, ratas, humanos y herbívoros como el caballo	No
<i>T. pseudospiralis</i> (no capsulada)	T4	Aves; roedores, primates	No

Fuente: Referencia 34.

MORFOLOGÍA

El gusano adulto de *Trichinella spiralis* (thrix-hilo) es un nemátodo muy pequeño que difiere de muchos gusanos cilíndricos en que las hembras son ovovivíparas ó larvíparas, o sea no produce huevecillos. Tanto la hembra como el macho se afilan ligeramente hacia el extremo anterior, están provistos de un sencillo poro bucal orbicular sin papilas y el esófago en forma capilar que se extiende aproximadamente hasta la mitad del cuerpo, está rodeado por células grandes - espicocitos- que se piensa secretan enzimas hacia el intestino del gusano y se les relaciona con la respuesta inmune del huésped. [32,36-39]

Los machos miden entre 1.4 a 1.6 mm de longitud por 40-60 micras de diámetro (Figura 1). En el extremo posterior, presenta dos papilas carnosas y visibles que resguardan la cloaca y se introduce durante el coito [31-32,37,39-40]

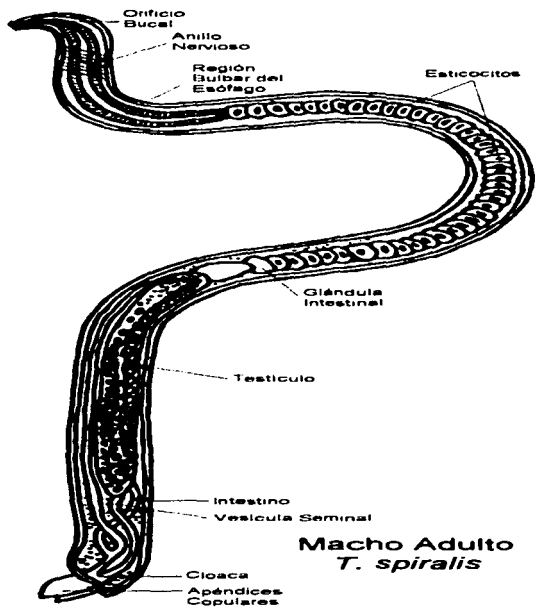
Las hembras (Figura 2) miden de 3.0 a 3.5 mm de largo por 60 a 90 micras de diámetro cerca del doble de longitud y una y media veces del ancho del macho. La proporción con respecto a los machos resulta alrededor de 2:1. Poseen un sólo ovario que comunica al útero y la vagina (la mayoría del cuerpo la ocupan estas partes), y desemboca en la vulva situada en la quinta parte anterior de la hembra [31-32,36,38-39].

Las larvas que se desarrollan en el útero miden de 100 x 5-6 micras de longitud cuando son expulsadas a través de la vulva, poseen una punta lanceolar en su extremidad anterior y crecen poco a poco hasta alcanzar un tamaño de 900 - 1300 x 35-40 micras en las fibras musculares, una hembra puede expulsar 200-1500 larvas. El aparato digestivo de la larva madura es similar al del adulto, aunque los órganos reproductores no están plenamente desarrollados. [32,36,40]

CICLO DE VIDA.

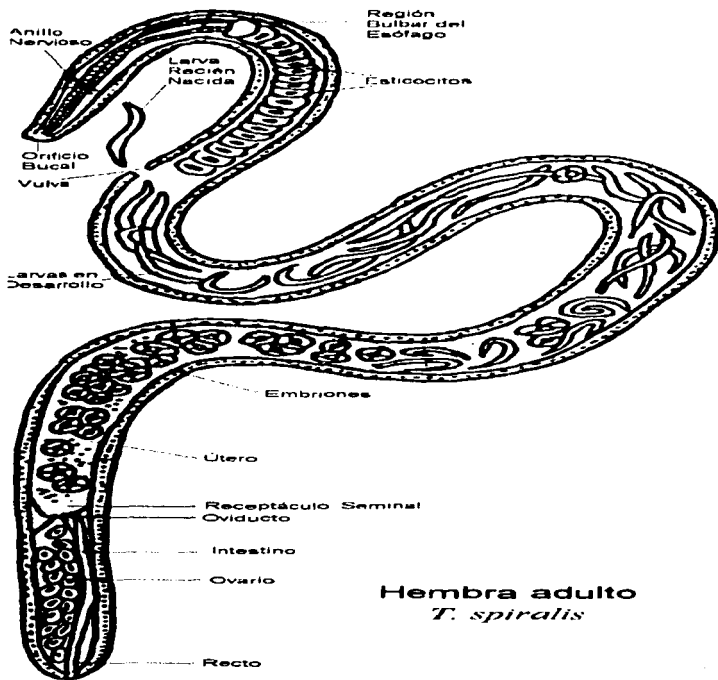
Trichinella spiralis es un parásito intracelular tanto en su estadio larvario como el adulto. El primer estadio en la vida de la larva es una porción modificada de la célula musculoesquelética denominada célula nodriza. Los gusanos adultos ocupan una región en la membrana del epitelio columnar. La larva recién nacida es el único estadio no intracelular, dado que viven libres en la circulación. Tales organismos, no matan a la célula huésped, pero inducen modificaciones en la estructura celular (bioquímica y estructuralmente) que incrementa su propia sobrevivencia. [24]

El ciclo de vida se caracteriza por que en la fase entérica el período de vida es muy corto de una semana para el macho, y de 3 a 4 semanas para la hembra; en cambio la fase parenteral como forma larvaria, su longevidad y viabilidad es de hasta dos años o más. [23,42]



Fuente: Referencia 41

FIGURA 1.



Fuente: Referencia 41

FIGURA 2.

Fase entérica.

1. *Trichinella spiralis* no tiene huésped específico. Todos los mamíferos son susceptibles. La infección inicia por ingestión de carne cruda o mal cocida infectada con la larva en el primer estadio (L.1), la cual esta enquistada en el músculo esquelético estriado (Ver figura 3)

2. Los parásitos se liberan del tejido del huésped secundario por enzimas digestivas del estómago y estos ingresan al intestino delgado

3. En el intestino delgado la larva penetra rápidamente al epitelio columnar. Se considera actualmente como un parásito intramulticelular. El gusano sufre cuatro mudas en 28 horas, desarrollándose en adulto macho o hembra.

4. El apareamiento ocurre a las 30 horas después de la infección. La localización precisa en el intestino en donde ocurre este, no se ha determinado.

5. Del 5-6 día después de la infección, las hembras expulsan larvas recién nacidas (primer estadio) en el espacio intracelular. Penetra a través de las vellosidades hasta la lámina propia utilizando su estilete que se encuentra dentro del esófago. Entran a conductos linfáticos o vasos sanguíneos.

Fase parenteral.

6. Eventualmente la larva entra a la circulación general y se distribuye a través de todo el cuerpo (Ver figura 4).

7. La penetración al tejido por la larva recién nacida ocurre solamente por el uso de su estilete. Penetrando los capilares para ingresar así a cualquier tejido adyacente a vasos sanguíneos, pero estas únicamente permanecen en las células del músculo esquelético estriado. Las larvas que ingresan a otros tejidos reingresan a la circulación general.

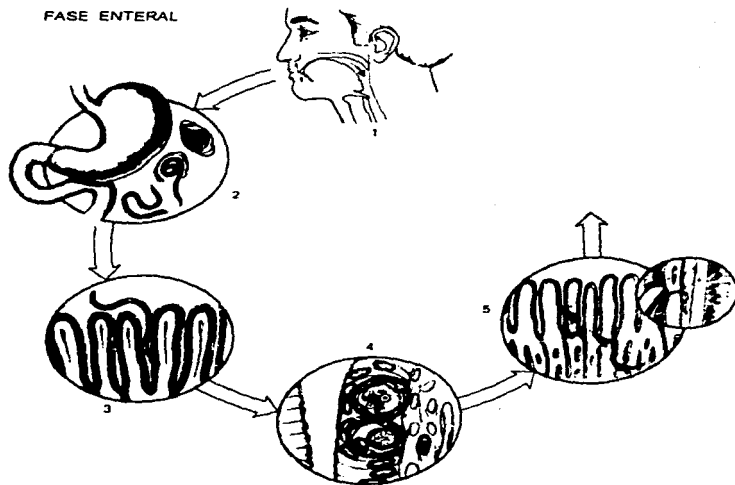


FIGURA 3.

Fuente: Referencia 1

8. La larva crece y se diferencia en la matriz intracelular de la célula muscular infectada. Durante el proceso, la larva induce cambios dramáticos en la célula muscular, resultando en un arreglo totalmente nuevo del citoplasma del huésped. Detectándose más cambios al noveno día después de la infección intracelular.

9. De las modificaciones en la célula huésped del día 10 al 12 da como resultado un estadio casi maduro conocido como célula nodriza. El nombre describe la actividad de esta célula, cuyo propósito es facilitar la adquisición de nutrientes a la larva y excreción de sus desechos metabólicos.

10. El complejo célula nodriza-larva se diferencia completamente al día 20 después de la infección, y la transmisión de esta parasitosis de animal a animal es en gran parte por canibalismo y depredación de los mismos. En Europa, Asia y Norteamérica el cerdo es la fuente de infección más común. Los osos polares, nutrias y puerco espín son reservorios comunes para infecciones en climas como el ártico y tropical.

EPIDEMIOLOGÍA

Distribución geográfica

Numerosas investigaciones demostraron que el organismo causante de la triquinosis, *Trichinella spiralis*, es de distribución mundial. Más de 100 especies de mamíferos silvestres y domésticos, en especial los carnívoros incluido el hombre, son infectados, constituyendo un problema de salud médico y veterinario [2,30,34]

Los extremos de las regiones geográficas como la sabana del Oeste Africano y el Ártico son focos de infección para este importante patógeno. Sin embargo, la triquinosis es común en Europa, Norteamérica y Centro América en donde los cerdos domésticos son el medio de infección. Reportándose en nuevas regiones geográficas en el mundo como en Asia y Australia [1,33].

En México, no se tienen registros epidemiológicos sobre triquinosis en humanos aunque se han descrito brotes aislados y esto no permite conocer con exactitud su distribución en el país, sin embargo existen reportes que indican que la incidencia de la enfermedad está aumentando, siendo la

carne de cerdo infectada con la larva de este parásito la fuente principal de transmisión de la enfermedad.(2,27,29)

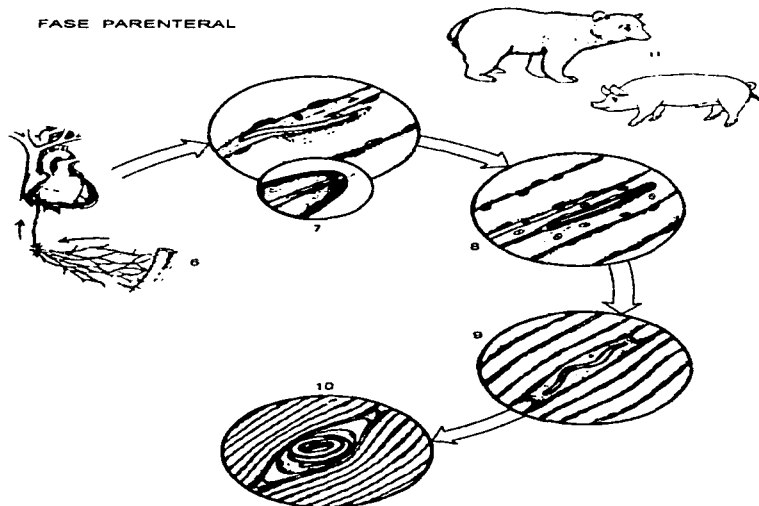


FIGURA 4.

Fuente: Referencia 41

En México se tienen antecedentes del padecimiento desde 1944, cuando Mazzotti estudió 1000 *Jiariagnas* humanos obtenidos de cadáveres en el Hospital General de México, en los que se encontraron quistes del parásito. Se reportaron 102 casos de triquinosis en un lapso de 7 años en varias comunidades del Estado de Zacatecas y 158 en diez años en el resto de la República Mexicana. Generalmente cuentan con el antecedente de ingerir carne de cerdo infectado especialmente en forma de chorizo. [3,24,43]

En fecha reciente se han observado varios brotes epidémicos en algunos estados de la República Mexicana, como Zacatecas, Durango, Estado de México y el Distrito Federal. [29,32,343-45]

Transmisión

La triquinosis es una zoonosis que puede afectar a gran cantidad de especies de vertebrados fundamentalmente carnívoros. En el ciclo de la triquinosis juega un papel importante la rata, por sus hábitos necrófagos y por el canibalismo que presentan entre ellas. Participan en la cadena de transmisión de la enfermedad en los reservorios silvestres. A través del cerdo y otros animales domésticos puede llegar finalmente, la infección al hombre. [30,32,46]

Hay tres ciclos principales para el mantenimiento del parásito a saber: 1) de cerdo a cerdo, en zonas donde la costumbre de alimentarlos con desperdicios está muy difundida, 2) de rata a rata con la presencia o ausencia de infección en los cerdos, 3) selvática mantenida por animales carnívoros u omnívoros salvajes (esquema 1) [31,34]

La infección en humanos, se adquiere al comer carne cruda o mal cocida de animales infectados en particular el cerdo; pero los animales salvajes también tienen una importancia que va en aumento en cuanto a la transmisión. Brotes de triquinosis atribuidos al consumo de carne de caballo conduce a una reevaluación en donde animales herbívoros pueden ser una fuente de transmisión. [33,38]

En México la costumbre de crear dentro y alrededor de todas las poblaciones, grandes basureros donde se arrojan todos los desechos sólidos de la comunidad, entre ellos los animales domésticos y sinantrópicos muertos (ratas, perros), se considera una fuente potencial de infección. Además, de que existe a) una interrelación antes desconocida entre los ciclos silvestre y doméstico (porcino) de *T. spiralis* b) Aumento del número y prolongación de la permanencia de cadáveres de animales potencialmente infectados expuestos para el consumo de cerdos, perros u otros animales. [3]

Los períodos de mayor incidencia de brotes epidémicos de triquinosis, corresponden a festividades y celebraciones familiares ya que en estas ocasiones se consumen los cerdos "criados en casa", y las familias participan en la elaboración de los subproductos [3,26-27, 43-45]

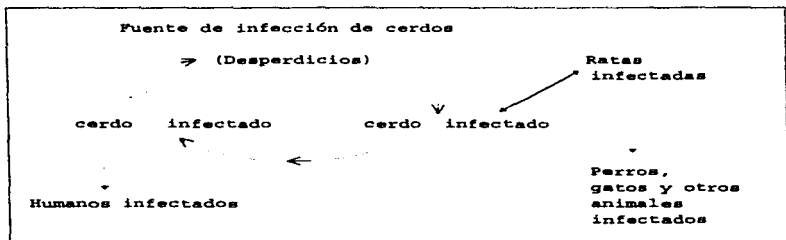
SIGNOS Y SÍNTOMAS.

Desde el punto de vista clínico la triquinosis se manifiesta como una enfermedad tóxica infecciosa aguda, grave e inespecífica. Los síntomas dependen del número de gusanos ingeridos, dado que la ingestión de 500 o más larvas puede producir una enfermedad moderada a severa, el tamaño y edad del paciente, los tejidos invadidos y la resistencia general del huésped. El padecimiento se puede confundir con salmonelosis, fiebre tifoidea, dengue, mononucleosis infecciosa, intoxicación por metales o pesticidas, etc. [2,29,40,43]

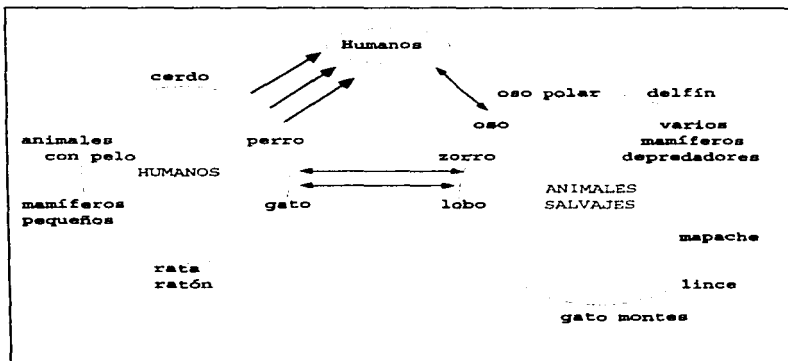
El cuadro clínico inicial consiste en un ataque grave de gastroenteritis, con náusea y vómito, además de síntomas como malestar general, astenia, adinamia, dolor abdominal y fiebre debidos a la presencia del gusano adulto en el intestino del huésped.[2, 26, 36]

En la segunda fase aparece edema palpebral, pérdida de peso, cefaleas intensas, exantemas, conjuntivitis, fotofobia y mialgias relacionadas con la migración del parásito y la respuesta del huésped hacia la larva una vez que se encuentra dentro de la célula muscular. El daño al corazón constituye una de las complicaciones más graves cuyos responsables de esta respuesta son los eosinófilos.[2, 26, 31, 47]

ESQUEMA 1. Diferentes fuentes de transmisión de *Trichinella spiralis* por Gozar (1969).



Ciclo doméstico o silvestre (Posterior a Faust: 1955)



Interacción entre triquinosis silvestre y selvática (Posterior a Gozar, 1960)

Fuente: Referencia 4.

En la etapa de convalecencia, la fiebre disminuye y se abaten en forma gradual el dolor, debilidad y otros síntomas. [38]

Una lista de síntomas y signos específicos e inespecíficos se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Criterios diagnósticos de triquinosis.

Específicos	Inespecíficos
Mialgias generalizadas	Dolor abdominal
Mialgias oculares	Diarrea
Edema de párpados, cara y manos	Vómito
Postración	Pérdida de peso
Eosinofilia	Exantemas

TRATAMIENTO

Los benzimidazoles mostraron ser eficaces contra varias triquinas aisladas. De estos el mebendazol es el medicamento de preferencia, y esta contraindicado en mujeres embarazadas, es muy eficaz para prevenir la infección tisular y contra el gusano adulto en la fase entérica por un efecto en inhibidores de la ciclooxigenasa, cuya dosis en adultos es 200 a 400 mg/3 veces al día/3 días y 400 a 500 mg/3 veces al día/10 días. El albendazol fue efectivo en un 92 % cuando se administra en una dosis de 800 mg/día/6 días y este no presenta reacciones adversas. El tiabendazol mata los gusanos adultos jóvenes en el intestino y destruye algunas larvas enquistadas en el músculo a una dosis de 25 mg/kg/2 veces al día/7-10 días, sin embargo esta sustancia produce náusea, vómito, molestias abdominales, dermatitis y fiebre medicamentosa [33, 38, 47-50]

El tratamiento con corticosteroides disminuye los fenómenos inflamatorios y alérgicos acompañantes, se recomienda prednisona en dosis de 20-40 mg diarios con disminución y suspensión después de tres a cinco días, combinado con antihelmínticos. Los sedantes y analgésicos están indicados para mitigar los dolores musculares. [31, 33, 36]

A nivel experimental se probaron dos benzimidazoles como el oxfendazol (OXF) y luxabendazol en ratones con buenos resultados. [33]

PREVENCIÓN Y CONTROL

El control de la triquinosis se basa principalmente en la educación del consumidor y regulación de preparaciones comerciales de productos porcinos para el consumo humano [25]

Se puede hablar de dos tipos de control contra la triquinosis, uno antes y otro después del sacrificio del animal.

En el control antes del sacrificio, la identificación de animales de alto riesgo a ser infectados por *T. spiralis*, permitirá que dichos animales se les de un tratamiento profiláctico. Si se utilizan desechos de alimentos reciclados para el consumo se recomienda la cocción de los mismos. Se debe educar acerca de la existencia de triquinosis en animales silvestres; todos los productores, cazadores, tramperos podrian ser informados de el daño de consumir animales muertos silvestres sin previo tratamiento. La prevención de la entrada de desperdicios a animales silvestres; este control es particularmente necesario en áreas rurales, granjas, y en el habitat de estos animales [14]

Las medidas para el control después del sacrificio del animal en el cual se identifica al agente causal de la triquinosis se enuncian a continuación:

1. La irradiación se menciona como un medio posible para la destrucción de la larva de *T. spiralis* sin serios efectos adversos en los productos porcinos. Aproximadamente 19 Krads son necesarios para prevenir la maduración de la larva, mientras que 0.4-0.75 Mrad son eficaces para destruir la larva.
2. La carne de cerdo congelada a -30 °C durante más de 16 horas, es considerada libre de la larva infectiva de *T. spiralis*.
3. La eficacia de la curación en la destrucción de la larva de *T. spiralis* es dependiente de la concentración de sales, la temperatura y el tiempo.

4. La larva de *T. spiralis* en la carne de cerdo es destruida cuando es hervida a 55 °C (temperatura interna 77 °C) durante 15 minutos. Aunque esta temperatura y tiempo puede cambiar de acuerdo a varios autores. [51]

La educación de productores y consumidores es un importante elemento para prevenir la triquinosis porcina y humana, así como la regulación de preparaciones porcinas para el consumo interno y externo. [52]

INMUNOLOGÍA.

Los protozoarios y helmintos entericos causan un desorden interno que conduce a cambios en la estructura y función del tejido local. Estos cambios resultan de la respuesta del huésped, en términos de la capacidad y la facilidad de adaptación del parásito [53]

Mucho de lo que se conoce de la inmunidad contra parásitos intestinales se basan en trabajos de sistemas huésped-parásito a nivel experimental (tabla 3). [5]

Es característico que las infecciones por parásitos estimulen más de un mecanismo de defensa inmunológico. Se debe tener en cuenta que dicho parásito explota el medio ambiente del huésped, sin embargo el organismo puede responder de manera protectora a la infección en términos desfavorables para el parásito. La inmunidad actúa para limitar la sobrevivencia del parásito, pero también para evitar su desarrollo a estadios posteriores. [54-55]

La infección con *T. spiralis* se caracteriza por presentar dos fases de desarrollo: una entérica y otra parenteral, a las cuales el huésped monta una respuesta protectora. La respuesta inmune específica humoral y mediada por células se estudian extensamente en ratones y ratas. [56]

RESPUESTA INMUNE HUMORAL.

La respuesta inmune en humanos contra infecciones de *T. spiralis* se ha estudiado a nivel humoral, determinándose la presencia de diferentes clases de inmunoglobulinas dirigidas contra el

parásito (interfiriendo con su metabolismo) aunque parecen no causar la expulsión directa del gusano, su secuencia de aparición, así como el tipo de componentes reconocidos parece ser importante en el control de la enfermedad [2,5]

Tabla 3. Cura espontánea en infecciones de laboratorio contra helmintos.

Parásito	Timo dependiente	Huésped	Transferencia		Asociado con:	
			Suero	células	Ab	inflamación
<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	+	rata-ratón	+	+	+	+
<i>T. spiralis</i>	+	rata-ratón	+	+	+	+
<i>Trichurus muris</i>	+	ratón	+	+	-	-
<i>T. colubriformis</i>	+	conejiillo de indias	+	+	+	+
<i>A. tetraeptera</i>	+	ratón	?	?	-	-
<i>S. ratti</i>	+	rata	+	+	?	+
<i>H. diminuta</i>	+	ratón	-	-	-	-

Fuente: Referencia 5

Las inmunoglobulinas también participan en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos. Las células citotóxicas, como macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, se adhieren a los helmintos en presencia de anticuerpos por medio de receptores Fc y para C3. La actividad de anticuerpos es la causa directa del daño citopatológico observado en *N. brasiliensis* y *T. spiralis*, similar daño se observa *in vitro* [5,54]

Una pregunta importante es si de los distintos antígenos que se han identificado existe uno que sea inmunodominante para producir una respuesta inmune como resultado de la infección. En un análisis de inmunoblot utilizado para caracterizar un antígeno de Ts L1 reconocido por antisuero de ratones AKR/J infectados que se detectan 13 días después de la infección durante la fase intestinal y al día 35 durante la fase larvaria, este epitope está asociado a oligosacáridos y juega un papel importante en la interacción huésped-parásito; comparando con extracto del gusano, proteínas de excreción/secresión y proteínas de la cutícula de la larva L1. [2,33,57]

Las defensas del huésped humano contra *T. spiralis* puede ser un mecanismo complejo en el cual diferentes tipos de células pueden estar involucradas. El organismo monta una reacción citotóxica celular dependiente de anticuerpos en contra de la larva recién nacida (Ver tabla 4) [10]

Tabla 4. Esquema de los estadios involucrados en el ciclo de vida de *Trichinella spiralis* y la respuesta inflamatoria inmune iniciada en el ratón infectado.

Ciclo de vida del parásito	Respuesta del huésped
Entrada de la larva infectiva Invasión de enterocitos Liberación de antígenos del estiosoma Exposición a antígenos de superficie	Procesamiento y reconocimiento de antígenos
Maduración de adultos Liberación de larvas recién nacidas (NBL) Exposición del adulto y antígenos NBL	Respuesta de anticuerpos Respuesta de células cebadas Inflamación aguda
Expulsión de gusanos adultos Migración de NBL	Respuesta de Anticuerpos Respuesta de células cebadas Inflamación aguda

Fuente Referencia 55

En el ser humano, la infección con *T. spiralis* estimula durante los primeros 20 días una respuesta con inmunoglobulinas de la clase IgM, seguida por IgG. Al inicio de la infección se presenta IgG1 seguida de IgG3 y posteriormente IgG4. Se ha informado de anticuerpos de tipo IgA dado que se trata de la clase dominante de inmunoglobulina en la secreción intestinal, y niveles elevados de IgA se asocian a la inmunidad contra *H. contortus*, y esta involucrada en la expulsión de *T. spiralis*. [2,5,56,58]

RESPUESTA INMUNE CELULAR.

En la respuesta inmune celular que se produce en humanos durante la infección por *T. spiralis*, se involucra varias clases de células, tales como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células cebadas y linfocitos T en la ayuda al huésped frente a la infección y actúan para controlar la multiplicación y diseminación de los parásitos ya residentes [2,54]

La expulsión rápida de adultos de *T. spiralis* constituye el principal mecanismo de defensa en contra de la infección, es acompañada por un marcado cambio inflamatorio en el intestino del huésped, es posible que la expulsión del gusano pueda ser el resultado indirecto de la respuesta inmune iniciada, la cual es estimulada por células activadas por antígenos del estadio preadulto, adulto, así como los provenientes de la larva muscular [2,6,53,59-61]

En todos los casos es conocido que la expulsión del gusano del intestino delgado es mediada por una respuesta inmune timo-dependiente. La necesidad de células T puede demostrarse por el fracaso que experimentan ratones "desnudos" (atímicos), o carentes de células T, en superar infecciones que en otras circunstancias no serían letales. Lars utilizó antisuero anti-timocito para demostrar el papel central de las células T en la expulsión de *T. spiralis* [48,54,59,61]

Las células Th1 y Th2 aparecen secuencialmente durante la infección contra *T. spiralis*, y tales células son antígeno-específicas. La protección en la rata se confiere por la población de células T pero específicamente por la subpoblación de linfocitos T cooperadores del fenotipo OX8 OX22⁺, estas células confieren protección y se cree se generan en el intestino después de la exposición al antígeno [33,48,59,62]

La inmunidad local intestinal protectora del huésped contra *T. spiralis* es mediada por células T del fenotipo L3T4⁺ Ly2⁻ generadas del nódulo linfático mesentérico (MLN) durante el curso de la infección. La estimulación *in vitro* de células T del MLN con mitógenos contra el antígeno de secreción da como resultado altos niveles de interleucina-3 (IL-3), IL-4, IL-5 e IL-9 en comparación con controles. La cepa de ratones NIH (alta respuesta) produce más rápido IL-2 e IL-3 que ratones B10 (baja respuesta). Niveles negligibles de interferón gamma (IFN- γ) son secretados de igual manera. [7,48,59,63-64]

En respuesta a la liberación local de antígenos, las células T inducen un notable aumento en el número de células inflamatorias, incluidos monocitos, células cebadas y células caliciformes en la mucosa intestinal. [5,54]

La infección con *T. spiralis* y otros nematodos intestinales promueven la hiperplasia de células cebadas de la mucosa. En la reacción antígeno-anticuerpo, las células cebadas se

degranulan, liberan sustancias vasoactivas (histamina, serotonina) y factores quimiotácticos, que incrementan la permeabilidad del epitelio de la mucosa intestinal, promoviendo así el paso de moléculas al lumen. Estas moléculas causan cambios eléctricos en el epitelio intestinal, así como contracción del músculo liso, aumento en la permeabilidad muscular y la estimulación en la hipersecreción de moco que da como resultado la expulsión rápida de parásitos intestinales [2,53-54,59]

La administración in vivo de anticuerpos monoclonales específicos contra el receptor estimulante de la célula espumosa (SFC) previene completamente la generación de mastocitosis intestinal que se observa normalmente después de la infección con *T. spiralis*, esto se refleja por una marcada reducción en los niveles de proteasa en células cebadas en suero y tejido intestinal [9,59]

En las infecciones intestinales producidas por nemátodos, los gusanos quedan enterrados en el moco inmediatamente antes de su expulsión. Se han sugerido tres mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo este evento: (1) las aminas biogénicas afectan directamente al gusano, (2) el cambio de permeabilidad altera el medio ambiente en torno al gusano, y (3) el incremento de permeabilidad permite el paso de anticuerpos anti-gusano específicos (potenciación patológica). [5,54]

La eosinofilia y la producción de elevados niveles de IgE son consecuencia común de la infección por gusanos parásitos, y los eosinófilos parecen ser las principales células efectoras contra helmintos. Atacan la superficie del nemátodo intestinal cuando el anticuerpo esta presente. Estas células liberan una gran variedad de factores, como enzimas (peroxidasa y fosfolipasa) y prostaglandinas, se consideran como efectores en la expulsión del gusano, o indirectamente por alteración del medio ambiente intestinal. Otro nivel de acción en el mecanismo de defensa del huésped esta dirigido contra la larva recién nacida, hacia la cual se han determinado efectos citotóxicos mediado por anticuerpos. [2,5,54]

SUSCEPTIBILIDAD DEL HUÉSPED.

Un número de factores actúan independientemente para afectar la distribución de adultos de *T. spiralis* en el intestino delgado de mamíferos, tales como: la forma de inoculación, fuente y cepa

del parásito, número de parásitos inoculados. Además, las condiciones propias del huésped (edad, sexo y tamaño) son factores que van a determinar esta distribución, como lo demostró R. O. McCracken, al trabajar con ratones CF-1, observando los siguientes resultados: (1) los gusanos adultos se concentran en la mitad anterior de el intestino delgado durante la primera semana de la infección, y que (2) no existía diferencia significativa en el número o distribución de gusanos en ratones jóvenes y adultos. [63,65]

Estudios realizados con ratones de las cepas NIH (resistentes) y C3H (susceptibles) demostraron una respuesta diferencial hacia componentes de superficie de *T. spiralis*. Los primeros responden rápidamente con producción de anticuerpos hacia las moléculas de superficie, tanto del organismo adulto como de la larva muscular de *T. spiralis*, a diferencia de los ratones C3H que lo hacen de manera más lenta [2,63,66-67]

Los factores genéticos también determinan la velocidad de expulsión de los gusanos adultos desde el intestino delgado. Tanto el complejo máximo de histocompatibilidad (MHC) de tipo II como genes no ligados al mismo contribuyen a estas variaciones. Por ejemplo, el haplotipo H-2^d de la cepa NIH expulsa a los gusanos adultos aproximadamente entre 6-8 días, mientras que la cepa B10.G con haplotipo H-2^k lo hace varios días después. Similarmente, la respuesta de ratones B10 Q (H-2^d) es más rápida que en ratones B10.BR (H-2^k). [2,63,66]

PROTECCIÓN

Los helmintos intestinales pueden ser potentes estimuladores de la respuesta inmune. La infección de 10 o menos gusanos provoca protección; en la propagación de la infección primaria y resistencia a la reinfección. [5]

Los antígenos y productos de secreción liberados (posiblemente enzimas) provocan protección inmune; estos se encuentran en los espicocitos de *T. spiralis*. El aislamiento de este antígeno es difícil y es uno de los mayores impedimentos en el desarrollo de una vacuna. [5,25]

Recientemente los antígenos de superficie-estococito han sido obtenidos eficientemente en sistemas bacterianos empleando técnicas de biología molecular [2,57,68,69]

DIAGNOSTICO

El diagnóstico definitivo casi siempre se basa en diferentes pruebas de laboratorio. Ninguna de ellas son 100% exactas y, aún cuando sea negativa, no se descarta el diagnóstico clínico. Los pacientes con síntomas de triquinosis tienen antecedentes de haber comido carne, por lo general de cerdo, poco cocida o insuficientemente preparada. La enfermedad se presenta con frecuencia en forma epidémica entre varios miembros de un mismo grupo. El hallazgo más constante y de importancia al principio de la enfermedad es la leucocitosis con eosinofilia llegando a ser de un 20 a un 30% en la primera semana, alcanzando un máximo de un 90% al cabo de la segunda semana. La orina puede mostrar proteínas elevadas, la creatinina fosfoquinasa (CPK) y aldolasa musculares, están elevadas, el electromiograma muestra disfunción miopática. La presión de líquido cefalorraquídeo en algunas ocasiones está elevada, con número normal o ligeramente alto en la cuenta celular (linfocitos), la glucosa es normal, así como las proteínas también pueden estar un poco elevadas. La velocidad de sedimentación casi siempre es normal, lo que resulta una clave útil para el diagnóstico. Se observan anomalías electrocardiográficas en cerca del 20 % de los casos. [38,40,47]

Métodos no serológicos de diagnóstico

El diagnóstico definitivo es solamente por la demostración del parásito en el paciente infectado, por ejemplo, por el descubrimiento de la larva L1 en el tejido muscular. Es más frecuente encontrarla cuando un individuo es infectado de forma moderada o grave, y el tejido se examina después del crecimiento máximo del desarrollo larvario (por ejemplo, después de 30 días de la ingesta de carne infectada) [1]

El examen triquinoscópico del músculo diafragmático es uno de los métodos más utilizados en los rastros. Otra posibilidad es hacer cortes histológicos de los sitios de posible infección; las desventajas de estos métodos es que la infección no sería detectada cuando existan bajos niveles de

larvas enquistadas. El procedimiento de digestión artificial para detectar la larva en el músculo diafragmático fue desarrollado por Zimmermann en 1968 y utilizado por Andrews y col. en 1969; este involucra la digestión del tejido en una solución pepsina-HCl a 37°C durante 6-8 horas; aunque la larva es capaz de sobrevivir a los efectos de la solución digestora, se tamiza la muestra y el botón se examina en el microscopio estereoscópico [1,51]

Beck en 1953 practicó el xenodiagnóstico con cien diafragnus humanos. Primero examinaba las muestras al microscopio y después se las administraba a ratas blancas no infectadas, las cuales sacrificaba a cabo de un mes o más. [31]

Métodos serológicos de diagnóstico

Pruebas de laboratorio, son empleadas comúnmente para evidenciar de manera indirecta la infección con *T. spiralis*. Las pruebas serológicas son de mucha utilidad pero no se vuelven positivas hasta la tercera semana. Estas pruebas incluyen intradermoreacciones, la hemaglutinación indirecta, fijación de complemento, floculación de bentonita, contraelectroforesis, inmunofluorescencia indirecta, aglutinación de látex, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), y la radioinmunolectroforesis. [1]

La prueba intradérmica de Bachman con antígeno preparado de larva de triquina (1:5000 y 1:10000) produce una reacción inmediata en 30 minutos con un alto porcentaje de pacientes infectados. En las reacciones positivas, cualquiera que sea la intensidad de la parasitosis, aparece una pequeña tumefacción blanca alrededor del lugar de la inyección, rodeada de una zona eritematosa de contorno irregular y de unos 5 cm de diámetro. Se limita por la falta de estandarización del antígeno y su inestabilidad para distinguir entre infecciones presentes y pasadas, el antígeno no se encuentra disponible en forma comercial. [31,38,40,47]

Prince y Weiner en 1956 son los primeros en aplicar la hemaglutinación indirecta en casos humanos de triquinosis. Es más sensible que otras como lo son la fijación de complemento o de la precipitina. Una comparación de la hemaglutinación indirecta con la de floculación de bentonita utilizando el mismo antígeno no revela correlación entre los títulos obtenidos por los dos métodos

con el mismo suero problema, sugiriendo que cada prueba mide la presencia directa de anticuerpos contra diferentes antígenos. Una desventaja de esta prueba fue que los eritrocitos sensibilizados deben ser preparados recientemente. Sin embargo, la falta de seguridad de las preparaciones comerciales hace que esta técnica no sea recomendada [1].

La prueba de floculación de bentonita (Božicevič y col. 1951) que emplea el antígeno Melcher es solo un conducto, y la titulación 1:5 o a cuatro veces es prácticamente diagnóstico. Aunque es menos específica y sensible que ELISA, o la hemaglutinación indirecta, es probable detectar el 95% de las infecciones graves que pueden ser sintomáticas, y tal vez unas cuantas en infecciones de cepas árticas [1,38].

Jackson en 1959 fue el primero en utilizar anticuerpos fluorescentes contra antígenos de la larva L1 de *T. spiralis*. Métodos de inmunofluorescencia indirecta en los cuales anticuerpos específicos contra antígenos de la superficie e internos de la larva L1 fueron utilizados por vez primera por Sadun y cols. en 1962. Aunque se trata de una prueba sensible, las reacciones cruzadas entre *T. spiralis* y otras infecciones parasitarias se presentan.

La contraelectroforesis fue primero aplicada por Despomnier y col. en 1974 para el diagnóstico de triquinosis. Los antígenos utilizados son derivados de la larva L1 por fraccionamiento celular, se obtiene una fracción enriquecida en granulos secretores del esticocitos. Esta prueba es sensible y específica. Sin embargo, comparado con el ELISA, esta técnica utiliza una gran cantidad de antígeno y suero.

La prueba ELISA fue aplicada para el serodiagnóstico de *T. spiralis* en infecciones en humanos por Engvall y Ljungstrom en 1975. El antígeno utilizado fue un extracto salino de la larva L1. En este caso, los tubos se ponen en contacto con el antígeno para ser absorbido, cuando reaccionan con el suero anti-triquina, se lava el exceso de anticuerpos, y finalmente reacciona con una inmunoglobulina de conejo anti-Ig humana. La inmunoglobulina de conejo fue acoplada con la enzima fosfatasa alcalina antes del ensayo. La actividad enzimática fue estimada con *p*-nitrofenil fosfato en un buffer de dietanolamina. Tiene un alto grado de sensibilidad, pero tiene reactividad cruzada con otros nemátodos. Sus ventajas son su rapidez, su alto grado de sensibilidad, y utiliza

pequeñas cantidades de reactivos, también es económico. La especificidad depende de la fuente del antígeno tanto como la clase de inmunoglobulinas para el ensayo [1]

La aplicación de antígenos purificados y anticuerpos monoclonales conducen avances importantes en el inmunodiagnóstico de triquinosis. Con la introducción de un antígeno purificado en una columna de afinidad obteniendo 20 antígenos diferentes, preparados de gránulos secretores del esticocito, comparado con el antígeno crudo este fue más sensible y específico al inicio de la infección. El antígeno es preparado de larvas cultivadas in vitro también revelan altos títulos de sensibilidad y especificidad en triquinosis porcina mediante un ensayo de ELISA.

Una modificación del ELISA tan sensible es el dot-ELISA y es casi tan específica pero más sencilla que una inmunoelectrotransferencia utilizando antígenos purificados por cromatografía de afinidad para la detección de triquinosis porcina [33]

INMUNOESTIMULACION

El conocimiento de la relación entre microorganismos y el sistema inmune ha desarrollado estrategias simples que pueden ser adecuadas, para el control de enfermedades infecciosas emergentes y las ya existentes. La estimulación inespecífica por sustancias derivadas de microorganismos tienen un efecto selectivo sobre diferentes componentes del sistema inmune.[11,70]

La inmunomodulación puede definirse esencialmente como la regulación global de las respuestas inmunitarias, incluyendo la inmunopotenciación ("aumento de regulación") y la inmunosupresión ("disminución de regulación"). El uso potencial de inmunomoduladores en medicina clínica son la reconstitución de la deficiencia inmunitaria (por ejemplo, en el tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)), y la supresión de la función inmunitaria normal o excesiva (por ejemplo, tratamiento de rechazo de injerto o enfermedad autoinmune).[58,71]

La inmunopotenciación es el incremento específico o inespecífico de la capacidad de la respuesta inmune. Este aumento puede ser intrínseco, es decir, originado en el propio huésped, o extrínseco y secundario a influencias exógenas, en relación con el aumento en la respuesta contra tumores y agentes infecciosos. Los compuestos capaces de aumentar la reactividad inmunitaria pueden dividirse en dos clases: 1) Estimulantes inmunitarios inespecíficos o generales que aumentan la respuesta humoral y celular para una multitud de antígenos muy diferentes; y 2) potenciadores específicos que aumentan un grupo limitado de respuestas inmunitarias para un grupo igualmente limitado de antígenos. [58-71]

a) Inmunoestimulantes inespecíficos

El uso de inmunoestimulantes en el tratamiento de enfermedades humanas se inició a principios de siglo en Estados Unidos (USA) desde el experimento donde utilizaron toxinas de bacterias en el tratamiento contra el cáncer descrito por William B. Coley. Tales sustancias derivadas de microorganismos se probaron clínicamente en el tratamiento de cáncer de vejiga, gástrico y otros, además de infecciones recurrentes. Antes de la disponibilidad de compuestos purificados producidos con tecnología del DNA recombinante, se utilizaron inmunomoduladores inespecíficos para incrementar la respuesta del huésped en ciertas situaciones clínicas. Estos se pueden dividir en tres clases: productos de origen microbiano, productos de origen mamífero y productos sintéticos. [58-70]

Las fuentes microbianas provienen de cuatro categorías de productos clínicos en relación a su actividad estructura-función:

1. Glicanos fúngicos con enlaces 1,3 β -glicosídicos con actividad clínica, parcialmente puros pero se trata de sustancias complejas como "Lectinan" (Japón) y glucan (USA). Estos materiales incrementan la actividad microbicida de macrófagos y antitumoral, inducen la liberación de monocinas (por ejemplo IL-1, TNF y CFS) [70]

2. Endotoxinas lipopolisacáridas bacterianas, estas poseen diversas acciones en componentes del sistema inmune, especialmente linfocitos B y macrófagos. Las endotoxinas de bacterias gram negativas son un poderoso estimulante, pero poseen una toxicidad inaceptable. Sin

embargo, un derivado como lo es el monofosfóforo lipídico A es aislado con una menor toxicidad [14,70]

3 Componentes activos de la pared celular de micobacterias como el BCG en el adyuvante completo de Freund (FCA) Otra bacteria con actividad biológica similar al BCG es el *Corynebacterium parvum*. El MDP (muramilo dipéptido) es un análogo sintético del componente activo de la pared celular de la micobacteria. Cuando el BCG se inyecta directamente en lesiones de melanoma cutáneo, puede observarse regresión de las lesiones inyectadas y distantes.

Entre los mecanismos de potenciación se incluyen: 1) activación del sistema reticuloendotelial, 2) inducción de producción de linfocinas por células mononucleares, resultando en la atracción y activación de células linfoides inmunocompetentes, 3) estimulación de células NK; 4) reactividad cruzada entre antígenos tumorales y BCG, provocando una respuesta inmunitaria contra los determinantes antigénicos comunes, y 5) aumento de susceptibilidad de células tumorales a la destrucción [14,58,70-71]

4. Agentes derivados de microorganismos, particularmente polímeros, estimulan la inducción de interferón (IFN), la resistencia inespecífica (células natural killer y macrófagos), incluyendo el éter vinil maleico y polinucleótidos sintéticos como el ácido polinosínico-policitídico (poli I C) y el ácido poliadenílico-poliuridílico (poli A U), estos se utilizaron en el tratamiento del cáncer de mama en Francia y USA.[70-71]

Los inmunomoduladores inespecíficos de origen mamario incluyen timosinas, sustancias similares a hormonas producidas por el timo, las cuales tienen diversas actividades biológicas como el aumento de las respuestas inmunitarias en animales normales y timectomizados. En Europa, particularmente en Alemania e Italia se prepararon un número considerable de hormonas al año. En general, estos péptidos no inducen nuevos linfocitos T dependientes del timo pero aumentan las funciones de los ya existentes. Esta acción incrementa la resistencia contra microorganismos o tumores y retarda la respuesta inmune celular en animales. Los usos clínicos en humanos se enfocan a infecciones crónicas, recurrentes y cáncer. Entre estos agentes se encuentran Timosina 1, Timosina, fracción 5, Timomodulina y el factor de transferencia [58-71]

Los compuestos sintéticos como el levamisol, medicamento antihelmíntico capaz de inhibir la actividad de células T supresoras, activa macrófagos y neutrófilos in vitro de manera similar al imidazol, y tiene efectos colaterales con cambios a nivel celular en GMPc. Estimula la función de la célula T in vivo, particularmente en individuos inmunodeficientes, mediante la acción de inducir un factor semejante al de la hormona tímica. [58-70]

b) Inmunoestimulantes específicos

Las vacunas más utilizadas son de patógenos vivos atenuados, pero la ingeniería genética tiene la ventaja de purificar antígenos del parásito que confieren protección inmune. Sin embargo al aislar antígenos estos pierden inmunogenicidad y potencia.

Los inoadyuvantes presentan un sin número de compuestos con una larga variedad de conformaciones y diferentes mecanismos de acción. La función del adyuvante es incrementar la respuesta inmune específica contra antígenos, en donde se pueden seleccionar diferentes componentes de la respuesta inmune con un isotipo particular de anticuerpos o mediada por células (CMI). Sus propiedades biológicas dependen de su capacidad de activar selectivamente una de las dos subpoblaciones de células T CD4, Th1 o Th2, que controlan la mayoría de las propiedades de la respuesta inmune específica. Por ejemplo en dos diferentes adyuvantes, con el mismo antígeno en ratón, el FCA activa células Th1 y el Alum Th2. [14-15]

Algunas de las vacunas humanas más utilizadas se componen de patógenos vivos atenuados sin adyuvantes, siendo las vacunas antiparasitarias un ejemplo de estas. La ventaja de estas vacunas es que contiene únicamente los componentes del parásito capaces de generar protección inmune. Sin embargo, los antígenos aislados son menos inmunogénicos como cuando forman parte del parásito vivo. [14]

Los inoadyuvantes más representativos son de origen vegetal, químico y bacteriano. Estos compuestos son estructuralmente diferentes y muestran interacción directa con células del sistema inmune para modular la producción de citocinas.

Cuatro grupos de inmunoadyuvantes se describen: Saponinas (de origen vegetal), un polímero surfactante de bloqueo no iónico (artificial), monofosforil lipido A y muramil dipeptido (bacteriano) y finalmente citocinas (inmunomoduladores exógenos) [15-58]

La saponina es el triterpeno glicosido extraído de la corteza de un árbol de América del Sur denominado *Quillaia saponaria*. Esta estructura incrementa la respuesta de hipersensibilidad de tipo tardío y humoral contra un gran número de antígenos. En la modulación de moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y puede actuar en la inducción para la liberación de interferón-gamma (IFN- γ). Al menos existen dos rutas distintas para la degradación de antígenos extraños: la vía lisosomal, la cual conduce al disparo de células T CD4 y la citosólica, con la presencia de células T CD8.

Los polímeros surfactantes de bloqueo no iónico (NBIP) son copolímeros que consisten de polioxipropileno hidrofóbico y polietileno hidrofílico. Los más estudiados son las emulsiones aceite en agua, con actividad estimulante humoral contra péptidos, proteínas y polisacáridos. La unión de NBIP a proteínas en la superficie de la gota de aceite, este complejo actúa incrementando la actividad de macrófagos en presencia de moléculas de clase II del MHC para presentar antígenos a células T [14-15]

El monofosforil lipido A (MLA) es el menos tóxico adyuvante activo derivado del lipopolisacárido (LPS). Promueve la producción de IFN- γ por células T e indirectamente auxilia en la producción de anticuerpos. También es un estimulante del factor de necrosis tumoral por células NK para producir IFN- γ , en asociación con macrófagos pueden inducir la diferenciación y selección de células Th1, además se demostró que inhibe la proliferación de células Th2.

La subunidad más pequeña de la pared celular de la micobacteria que posee actividad inmunoadyuvante es el N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina, denominado muramil dipeptido (MDP). Cuando se administran en solución salina, MDPs inducen respuesta humoral y, en emulsiones agua en aceite se incrementa la inmunidad celular y la producción de anticuerpos.

La primera citocina utilizada como adyuvante, IL-1, incrementa la respuesta de anticuerpos contra albúmina de suero bovino. Sin embargo la IL-1 incrementa la producción de IL-2, pero la

actividad adyuvante de IL-1 es independiente de la producción de IL-2. El interferón-gamma administrado con antígenos activa las células T cooperadoras con una respuesta por anticuerpos e hipersensibilidad de tipo tardío. El IFN-gamma también incrementa la liberación de IL-1 y la presencia de moléculas de clase II del MHC en células presentadoras de antígenos [15]

LACTOBACILOS.

Los lactobacilos son habitantes comunes de la cavidad oral, del tracto gastrointestinal y genital femenino del ser humano. Raramente se encuentran como agentes etiológicos de infecciones severas. Los lactobacilos han sido aislados de sangre, LCR, materiales de abscesos, líquido amniótico y pleural. [72]

Los lactobacilos son microorganismos gram positivos, catalasa negativos, inmóviles, que no forman esporas; son anaerobios facultativos o estrictos, generalmente prefieren desarrollarse como microaerófilos; las cepas se identifican usualmente usando medios y métodos para anaerobios. Crecen lentamente en condiciones aerobias, producen pequeñas colonias superficiales. Algunas especies crecen mejor entre 37 y 45°C, otras son termófilas, otras crecen mejor alrededor de 30 °C. Los lactobacilos son intensamente sacarolíticos. Se distinguen dos subdivisiones principales: lactobacilos homofermentativos que producen ácido láctico a partir de glucosa, y solamente indicios de otros compuestos, las especies heterofermentativas producen alcohol etílico, CO₂, ácido acético, además del láctico. Algunas especies producen ácido suficiente para disminuir el pH del cultivo hasta 2. [72-73]

Las colonias pueden tener cualquier morfología en agar sangre, y varían desde colonias puntiformes, alfa-hemolíticas, semejantes a las de estreptococos, hasta colonias grandes, rugosas y grises. El aspecto microscópico también es muy variable, observándose a los bacilos posiblemente en forma de cadenas, así como cocobacilos, formas espiradas, etc. La diferenciación con los estreptococos puede ser difícil, pero la formación de cadenas de bacilos en caldo tioglicolato y la moderada resistencia a la vancomicina contribuye a caracterizar un aislamiento como lactobacilo. [72]

Entre los efectos benéficos de los alimentos fermentados sobresalen: disminución de la intolerancia a la lactosa, la reducción del colesterol sérico y la actividad antitumoral. [74]

Parece ser que la primera observación de la actividad antitumoral de las bacterias acidolácticas fue la de I.G. Bogdanov y colaboradores en la Unión Soviética en el año de 1962, quienes demostraron su efecto frente a un sarcoma y frente a un carcinoma. En modelos animales, han sido puestas de manifiesto actividades antitumoral por un gran número de investigadores quienes emplearon indistintamente yoghurt y extractos de yoghurt, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* y *L. casei*, además de extractos de estos microorganismos. Las especificaciones de estos hallazgos han sido revisadas por Shahani y Ayeba y por Friend y Shahani. [74]

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Con un aumento en los casos de triquinosis en los últimos años debido a un deficiente control sanitario, consumo de carne mal cocida de animales infectados, se buscan agentes profilácticos eficaces para su control.

Algunos inmunoadyuvantes mostraron ser eficaces contra infecciones parasitarias ocasionadas por protozoarios y helmintos; sin embargo, presentan desventajas como su toxicidad y su uso restringido al ser humano

Se ha observado que *Lactobacillus casei* actúa como un inmunoestimulante en contra de infecciones entericas provocadas por bacterias mediante un mecanismo de inflamación localizada. Sin embargo se desconocen los mecanismos mediante los cuales se genera esta respuesta inmune inespecífica a nivel intestinal contra *Trichinella spiralis*; por lo cual se evaluará la participación de las células involucradas a ese nivel en la expulsión del gusano y la reducción en el número de larvas instaladas en músculo esquelético.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta inespecífica que induce *Lactobacillus casei* contra *Trichinella spiralis* en ratones NIH.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto protector que induce *Lactobacillus casei* inoculado intraperitonealmente contra *Trichinella spiralis* en su fase adulta.
2. Determinar el efecto protector que induce *Lactobacillus casei* inoculado intraperitonealmente contra *Trichinella spiralis* en su fase larvaria.
3. Evaluar los cambios histológicos en intestino delgado en grupos testigo y problema al tercer y quinto día después de la infección.
4. Comparar niveles de interferón gamma en ratones tratados y no con *Lactobacillus casei* e infectados con *Trichinella spiralis*.

HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Si el *Lactobacillus casei* posee un efecto estimulante inespecífico a nivel intestinal con un incremento en el número de células inmunocompetentes (eosinófilos, células cebadas y linfocitos) y como consecuencia la generación de una reacción inflamatoria localizada, entonces esto provocará una disminución en el número de adultos y larvas de *Trichinella spiralis* en ratones de la cepa NIH.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Material biológico.

- Ratones hembra cepa NIH 6-8 semanas de edad con peso promedio 25 ± 2 gramos.
- Cepa de *Lactobacillus casei* ATCC 7469.
- Cepa de *Trichinella spiralis* provista por el Departamento de Parasitología de la ENCB del IPN.

Reactivos.

- Triptona Difco Laboratories No. 485996.
- Extracto de levadura Bioxon de México, S.A. No. 155-3.
- Gelatina Merck No. 53485.
- Dextrosa Productos químicos Monterrey S.A. No. 0840.
- Lactosa Merck No. 7657.
- Cloruro de sodio Productos químicos Monterrey S.A. No 2490.
- Acetato de sodio Productos químicos Monterrey S.A. No 1190.
- Ácido ascórbico Eastman Organic Chemicals No. E-A-4.
- Agua destilada.
- Ácido clorhídrico Productos químicos Monterrey S.A. No 1241.
- Pepsina 1:10000 Sigma Chemical Company No P 7000.
- Ácido acético glacial T.J. Baker No. 9507-60.
- Alcohol etílico absoluto Merck No. 15853.
- Cloroformo Merck.
- Formaldehído Sigma No. 7936.
- Tolueno Productos químicos Monterrey S.A.
- Parafinas (pf. 54,56,58 °C) Laboratorios del Río paraMex.

- Eosina.
- Hematxilina Hartman-Leddon Co. No. 236.
- Gelatina casera.
- Xilol Productos quimicos Monterrey No. 670.
- Alcohol metílico Productos quimicos Monterrey No. 21583.
- Azul de Toluidina No. 464.
- Safranina "O" No. 450.
- Azar Eosina Azul de Metileno (Giemsa) Merck No. 9203.
- Kit ELISA IFN- γ de ratón (código 80-3842-01).

Material de uso común en el laboratorio.

- Matraces Erlen Meyer (50,125,250,500 y 1000 mL) Pyrex.
- Tubos de ensayo (13X100, 15X150, etc.) Pyrex.
- Vasos de precipitados (50,100,250,500 y 1000 mL) Pyrex.
- Tubos de tapon esmerilado (13X100 y 15X150) Pyrex.
- Pipetas graduadas (1,5,10 mL) Pyrex.
- Cajas de petri (Distintos tamaños) Pyrex.
- Estuche de disección.
- Tabla de disección.
- Mangueras (Distinto grosor).
- Mechero Bunsen.
- Rejilla para portaobjetos.
- Portaobjetos, cubreobjetos, etc.
- Cámara cuenta nemátodos de acrílico.
- Tubos Eppendorf.
- Gradillas.

Equipo

- Baño de agua Scientific Products.

- Parrilla de agitación y calentamiento PMC.
- Vortex Lab-Line Modelo No. 1195.
- Microscopio Carl Zeiss.
- Estereoscopio Carl Zeiss.
- Refrigerador casero Mabe.
- Estufa/de cultivo No 181932.
- Cuchilla de acero inoxidable.
- Microtomo Rotatorio 820 American Optical.
- Lector de ELISA Labsystem Multiskan filtro 450 nm.

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.

El diseño de investigación que se aplicó al presente trabajo fue, un estudio de tipo prospectivo, comparativo, longitudinal y experimental.

Población

Ratones hembra cepa NIH de 6-8 semanas de edad con peso promedio de 25 ± 2 gramos.

Criterios de inclusión.

1. Animales sanos.
2. Cepa de *Trichinella spiralis*.
3. Cepa de *Lactobacillus casei*.
4. Los animales deben estar libres de cualquier parasitosis.

Diseño estadístico.

Las diferencias significativas entre los grupos experimentales se calculan utilizando la prueba-U de Mann-Whitney⁷⁹. Un valor mayor que $p=0.05$ se considera no significativo.

Para calcular U_1 y U_2 se utilizan las siguientes fórmulas:

$$U_1 = n_1 n_2 + 1/2 n_1 (n_1 + 1) - R_1$$

$$U_2 = n_1 n_2 + 1/2 n_2 (n_2 + 1) - R_2$$

U_{calc} = Valor obtenido de tablas.

MÉTODOS.

1. Inmunoestimulación.

Se inoculan por vía intraperitoneal 0.1 mL de una suspensión de 1.8×10^9 bacterias de *Lactobacillus casei*, a ratones hembras de la cepa NIH de 6-8 semanas de edad y peso medio de 25 ± 2 gramos. Se aplica una sola dosis 7 días antes de la infección con larvas de *Trichinella spiralis*.

2. Infección de grupos experimentales.

La infección se hace a partir de larvas infectivas L1 que se obtienen de la masa muscular de animales previamente infectados, la cual es sometida a un proceso de digestión artificial (Pepsina HCl en solución salina isotónica) durante 24 horas a 37°C y a una serie de tamizados.

El inóculo infeccioso se hace por vía oral, mediante sonda y con una dosis única de 150 larvas de *Trichinella spiralis*.

3. Determinación de la carga parasitaria.

A. Adultos.

Se hace la necropsia de animales testigo y problema al 5 día después de la infección; se obtiene el intestino delgado y de esta muestra se hace el conteo de gusanos adultos mediante la técnica del embudo de Baerman.

B. Larvas enquistadas.

A los 30 días se obtiene el diafragma, se toma una muestra mediante un pequeño corte, se pesa y se observa al microscopio para contar el número de larvas totales, en caso necesario se somete a digestión artificial, una cantidad conocida y constante de masa muscular y se tamiza para hacer la cuenta total de larvas.

4. Preparación de muestras histológicas.

Los tejidos intestinales de ratones estimulados con *Lactobacillus casei* y retados con larvas de *Trichinella spiralis* al 3 y 5 día postinfección y testigos son fijados en formalina y líquido de Carnoy, deshidratados e incluidos en parafina por métodos estándar. El intestino delgado de cada animal es dividido en segmentos y secciones seriadas de 7 μm y teñidas por las siguientes técnicas.

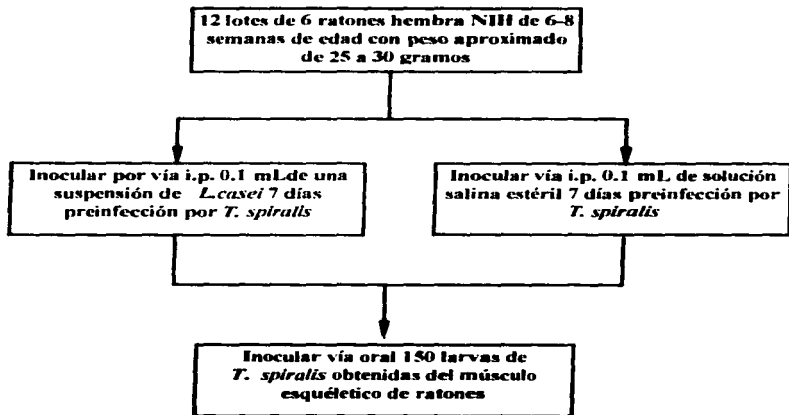
1. Hematoxilina-eosina y 2. Azul de toluidina.

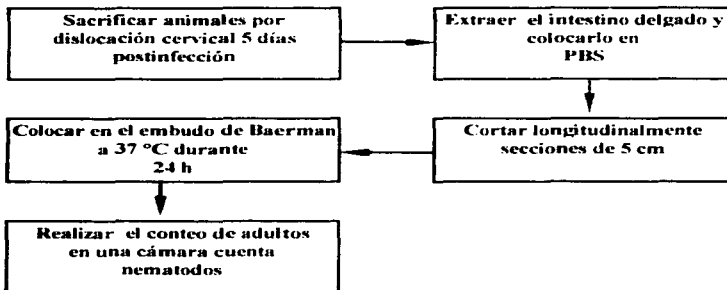
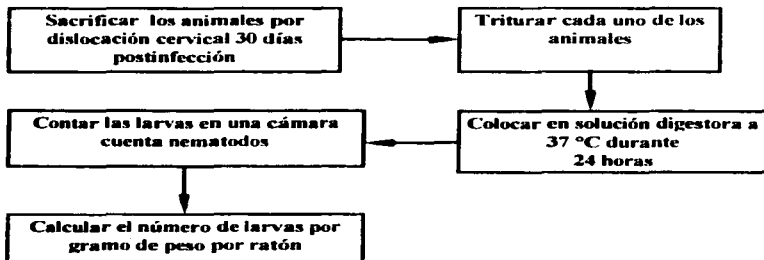
5. Determinación de niveles de interferón gamma.

Se hace la determinación mediante el uso de anticuerpos monoclonales y de acuerdo al instructivo del equipo comercial.

METODOLOGÍA GENERAL

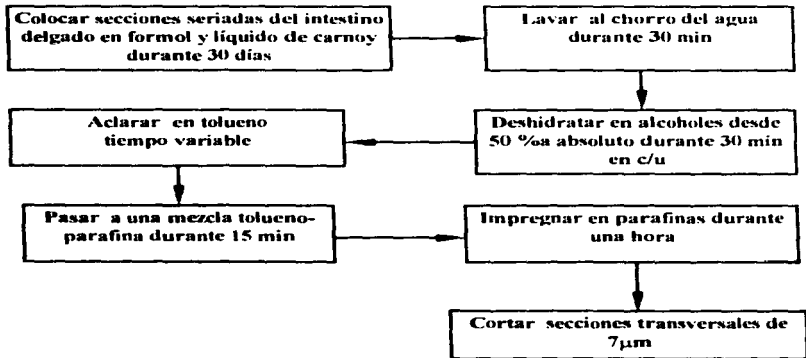
ESTIMULACION E INFECCION DE GRUPOS EXPERIMENTALES



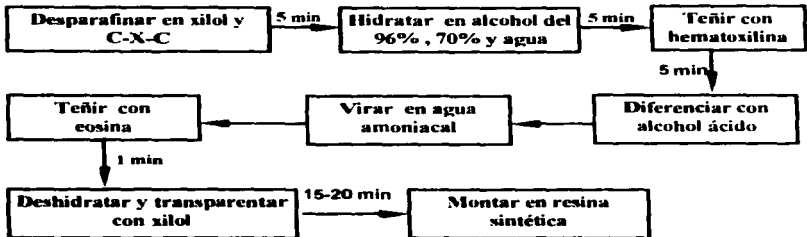
DETERMINACIÓN DE LA CARGA PARASITARIA**CUENTA DE ADULTOS****CUENTA DE LARVAS**

PREPARACION DE MUESTRAS HISTOLOGICAS

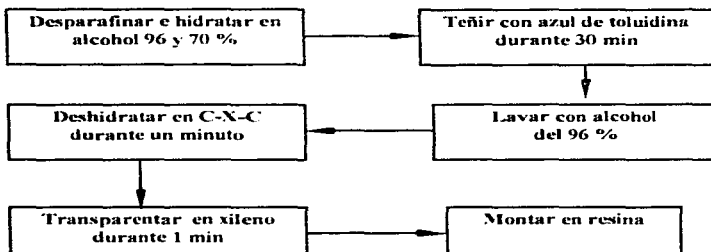
a) Método estándar



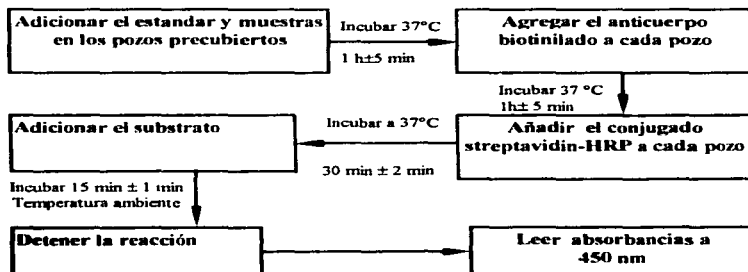
b) Tinción con Hematoxilina-Eosina



c) Tinción con azul de toluidina



EVALUACIÓN DE NIVELES DE INTERFERÓN-GAMMA



RESULTADOS

Recolección de gusanos adultos. Seis lotes de ratones NIH hembra fueron infectados con 150 larvas L1 de *Trichinella spiralis*. Antes de la infección tres lotes fueron tratados intraperitonealmente con *Lactobacillus casei* (equivalente a 1.8×10^9 bacterias). La cuenta de gusanos adultos se realizó al quinto día postinfección. Los resultados individuales por ratón de cada experimento se muestran en la tabla 5, 6, 7 y gráfica 1, existe en diferencias significativas entre grupos tratados en comparación a testigos ($p < 0.05$) del 89.71% con 6 ratones, se repitió el experimento con 3 y 9 ratones respectivamente, encontrando una reducción de la carga parasitaria del 80 y 68.67 %.

Tabla 5. Gusanos adultos de *Trichinella spiralis* recuperados en ratones NIH tratados o no con *Lactobacillus casei*.

Ratón	<i>T. spiralis</i>	<i>L. casei</i> + <i>T. spiralis</i>
1	140	25
2	120	16
3	118	18
4	118	9
5	98	5
6	49	3
n = 6	R1 = 57	R = 21

Prueba U de Mann Whiley para el experimento 1.

$$U1 = (6 \times 6) + \frac{1}{2} 6(6+1) - 21 = 36$$

$$U2 = (6 \times 6) + \frac{1}{2} 6(6+1) - 57 = 0$$

$$U \text{ calculada} = 7 \quad \% \text{ Reducción} = 89.71$$

Por lo tanto con $p < 0.05$ existe diferencia significativa entre grupos testigo en comparación con los tratados.

Tabla 6. Experimentación con 3 ratones.

Ratón	<i>T. spiralis</i>	<i>L. casei</i> + <i>T. spiralis</i>
1	68	17
2	60	11
3	52	8
n = 3	R1 = 15	R2 = 6

Prueba U de Mann Whiley para el experimento 2.

$$U1 = (3 \times 3) + \frac{1}{2} 3 (3+1) - 6 = 9$$

$$U2 = (3 \times 3) - \frac{1}{2} 3 (3+1) - 15 = 0$$

$$U \text{ calculada} = 0 \quad \% \text{ Reducción} = 80$$

Por lo tanto con $p < 0.05$ existe diferencia significativa entre grupos testigo en comparación con los tratados.

Tabla 7. Experimentación con 9 ratones.

Ratón	<i>T. spiralis</i>	<i>L. casei</i> + <i>T. spiralis</i>
1	113	36
2	109	29
3	87	28
4	82	26
5	80	23
6	73	22
7	72	20
8	68	17
9	66	17
n = 9	R1 = 126	R2 = 45

Prueba U de Mann Whiley para el experimento 3.

$$U1 = (9 \times 9) + \frac{1}{2} 9 (9+1) - 45 = 81$$

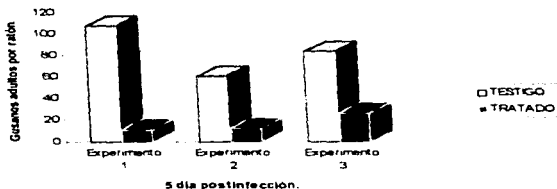
$$U2 = (9 \times 9) + \frac{1}{2} 9 (9+1) - 126 = 0$$

U calculada = 21

% Reducción = 68.67

Por lo tanto con $p < 0.05$ existe diferencia significativa entre grupos testigo en comparación con los tratados.

Gráfica 1. Gusanos adultos de *Trichinella spiralis* recuperados en ratones NIH tratados o no con *Lactobacillus casei*.



Los resultados de los tres experimentos se resumen en la tabla 8 y gráfica 2.

Tabla 8. Promedio de gusanos adultos de *Trichinella spiralis* recuperados en ratones NIH tratados o no con *Lactobacillus casei*.

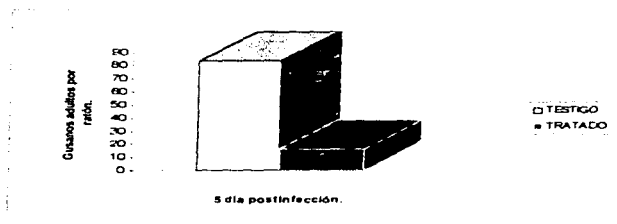
Tratamiento	Experimento			xTotal + Sx *	% de reducción de la carga parasitana **
	1	2	3		
<i>T. spiralis</i>	107	60	83	83.3 ± 20.72	
n	6	3	9	18 a***	
<i>T. spiralis</i> + <i>L. casei</i>	11	12	26	16.3 ± 6.20	
n	6	3	9	20 b***	79.45

* x = media, Sx = desviación estándar del promedio.

** En relación al grupo testigo (infectado con larvas de *Trichinella spiralis*).

*** Literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Gráfica 2. Promedio de gusanos adultos de *Trichinella spiralis* recuperados en ratones NIH tratados o no con *Lactobacillus casei*.



Larvas por gramo de tejido muscular (LPGTM^a). Treinta días después de la infección los ratones testigo y tratados son sacrificados para realizar el conteo de larvas por gramo de tejido muscular por ratón. los resultados individuales de cada experimento se muestran en la tabla 9, 10 y 11 y gráfica 3, existen diferencias significativas entre los grupos tratados en comparación a los testigo con una reducción en la carga larvaria en el músculo esquelético del 63, 49.49 y 58.8 % para cada experimento respectivamente

Prueba U de Mann Whiley para el experimento 1.

$$U1 = (8 \times 9) + \frac{1}{2} 9 (9+1) - 50 = 102$$

$$U2 = (9 \times 8) + \frac{1}{2} 8 (8+1) - 103 = 49$$

$$U \text{ calculada} = 18$$

$$\% \text{ Reducción} = 63$$

Por lo tanto con $p < 0.05$ existe diferencia significativa entre grupos testigo en comparación con los tratados.

Tabla 9. LPGTM de *Trichinella spiralis* recuperadas en ratones NIH tratados o no con *Lactobacillus casei*.

Raton	<i>T. spiralis</i>	<i>L. casei</i> + <i>T. spiralis</i>
1	667	256
2	655	202
3	428	184
4	327	178
5	327	155
6	321	119
7	208	83
8	173	59
9		42
n = 9	R1 = 103	R2 = 50

Tabla 10. LPGTM en el experimento 2.

Ratón	<i>T. spiralis</i>	<i>L. casei</i> + <i>T. spiralis</i>
1	375	182
2	329	178
3	300	176
n = 3	R1 = 15	R2 = 6

Prueba U de Mann Whiley para el experimento 2.

$$U1 = (3 \times 3) + \frac{1}{2} 3 (3+1) - 6 = 9$$

$$U2 = (3 \times 3) + \frac{1}{2} 3 (3+1) - 15 = 0$$

U calculada = 0

$$\% \text{ Reducción} = 46.49$$

Por lo tanto con $p < 0.05$ existe diferencia significativa entre grupos testigo en comparación con los tratados.

Tabla 11. LPGFM en el experimento 3.

Ratón	<i>T. spiralis</i>	<i>L. casei</i> + <i>T. spiralis</i>
1	1560	736
2	1486	638
3	1442	604
4	1440	598
5	1368	504
6	1320	468
n = 6	R1 = 57	R2 = 21

Prueba U de Mann Wiley para el experimento 3

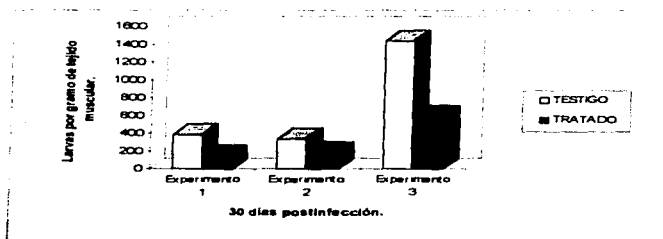
$$U1 = (6 \times 6) + \frac{1}{2} 6 (6+1) - 21 = 36$$

$$U2 = (6 \times 6) + \frac{1}{2} 6 (6+1) - 56 = 0$$

$$U \text{ calculada} = 7 \quad \% \text{ Reducción} = 58.81$$

Por lo tanto con $p < 0.05$ existe diferencia significativa entre grupos testigo en comparación con los tratados.

Gráfica 3. Larvas por gramo de tejido muscular en ratones NIH infectados por *Trichinella spiralis* y tratados o no con *Lactobacillus casei*.



Los resultados de los tres experimentos se resumen en la tabla 12 y gráfica 4.

Tabla 12. Promedio de LPGTM de *Trichinella spiralis* en ratones NIH tratados o no con *Lactobacillus casei*.

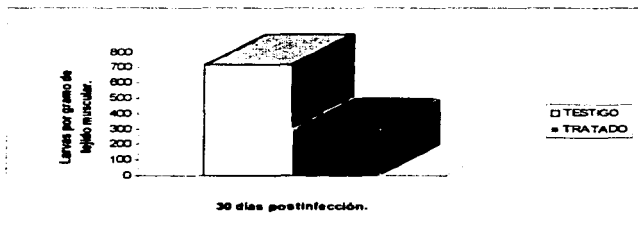
Tratamiento	Experimento			xTotal - Sx *	% de reducción de la carga parasitaria **
	1	2	3		
<i>T. spiralis</i>	388	355	1436	719.6 ± 620.9	
n	8	3	6	17 a***	
<i>T. spiralis</i> - <i>L. casei</i>	142	179	591	304 ± 249	
n	9	3	6	18 b***	56.1

* x = media, Sx = desviación estándar del promedio.

** En relación al grupo testigo (infectado con larvas de *Trichinella spiralis*).

*** Literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa (p<0.05)

Gráfica 4. Promedio de LPGTM en ratones NIH infectados por *Trichinella spiralis* y tratados o no con *Lactobacillus casei*.



Determinación de cambios histológicos. Se evaluaron tres parámetros para determinar cambios en relación a los grupos testigo en comparación a los tratados. En todas las determinaciones se examinaron un número de cortes que corresponden a tres ratones por cada lote, con cuatro lotes por cada parámetro, solamente para el primer experimento.

El primer parámetro a considerar fue la atrofia en las vellosidades por el acortamiento o no de las mismas. Se observaron 15 cortes al tercer y quinto día. En el caso del tratamiento con *Lactobacillus casei* y de la infección con *Trichinella spiralis* se encontraron diferencias estadísticas significativas en esos días (Ver tabla 13 y gráfica 5). Cuando se compara el grupo control en relación a los demás existe diferencia significativa al tercer y quinto día postinfección. En cambio cuando se compara con *L. casei* existe diferencia significativa en el grupo de *T. spiralis* al tercer día y quinto en relación al grupo Lc + Ts. Sin embargo existe diferencia únicamente en el grupo Lc + Ts al 5 día en comparación cuando se infecta con *T. spiralis*.

Tabla 13. Longitud de las vellosidades intestinales en micras de ratones NIH problemas y testigos al tercer y quinto día postinfección

Corte	Control 3 día	Control 5 día	<i>L. casei</i> 3 día	<i>L. casei</i> 5 día	<i>T. spiralis</i> 3 día	<i>T. spiralis</i> 5 día	Lc + Ts 3 día	Lc + Ts 5 día
1	80	80	70	80	60	60	80	70
2	80	80	70	80	60	60	70	70
3	80	80	60	80	60	60	70	70
4	80	80	60	80	60	60	70	70
5	70	70	60	80	60	60	70	60
6	70	70	60	80	60	60	60	60
7	70	70	60	80	60	60	60	60
8	70	70	60	80	60	60	60	60
9	70	70	80	80	60	60	60	60
10	70	70	80	80	60	60	60	60
11	70	60	60	80	60	60	60	60
12	70	60	60	80	60	60	60	60
13	60	60	60	80	60	60	60	60
14	60	60	60	80	60	60	60	60
15	60	60	60	80	60	60	60	60

Gráfica 5. Longitud de velocidades intestinales en micras de ratones NIH problemas y testigos al tercer y quinto día postinfección.



El segundo parámetro considerado fue determinar el número de glándulas de Lieberkuhn por velocidad, se observaron 15 cortes al tercer y quinto día. Comparando todos los grupos al tercer y quinto día se encontró que únicamente el grupo control no presentaba diferencia en esos días (Ver tabla 14 y gráfica 6). Cuando se comparó al tercer día el grupo control con todos los grupos restantes se observó que el único grupo que no existe diferencia significativa en el grupo Lc + Ts; mientras que al quinto y tercer día existe diferencia en todos los grupos. En los grupos Ts y Lc al tercer y quinto día en comparación con los otros grupos existe diferencia significativa.

El último parámetro a considerar fue la presencia o no de células cebadas mediante una tinción con azul de toluidina, se observaron 5 cortes de cada grupo. Al quinto día después de la infección existe diferencia significativa entre el grupo control en relación con los otros grupos; y también el grupo Ts y Lc con el Lc + Ts (ver tabla 15 y gráfica 7).

Determinación de niveles de interferon gamma. Se colectó el suero de cada grupo de animales cada semana hasta concluir el experimento, conservandolos a -70 °C antes de su uso. Se prepararon dos curvas patrón para determinar la concentración en pg/mL de IFN gamma (Ver tabla 16 y gráfica 8), de las cuales se sacó un promedio de ambas.

Tabla 14. Glándulas de Lieberhuhn por velosidad intestinal en el intestino de ratones NIH al 3 y 5 día postinfección por *Trichinella spiralis* y tratados o no con *Lactobacillus casei*.

Cote	Control 3 día	Control 5 día	<i>T. spiralis</i> 3 día	<i>T. spiralis</i> 5 día	<i>T. spiralis</i> 3 día	<i>T. spiralis</i> 5 día	Lc + Tc 3 día	Lc + Tc 5 día
1	7	11	19	17	19	6	19	19
2	6	11	19	14	19	5	19	19
3	6	9.5	19	14	15	5	15	15
4	6	9	19	13	13	4	15	15
5	5	9	11	11	13	4	15	15
6	5	8	11	11	13	4	15	15
7	5	8	11	11	13	4	15	15
8	5	8	11	11	13	4	13	13
9	5	8	10	11	11	4	13	13
10	4	7	10	11	11	3	13	13
11	4	7	9	11	11	3	13	13
12	4	7	9	9	11	3	11	11
13	3	6	9	9	10	3	11	11
14	2.5	6	9	9	9	3	11	11
15	2.5	6	5	6	9	3	11	11

Gráfica 6. Glándulas de Lieberhuhn por velosidad intestinal en el intestino de ratones NIH al 3 y 5 día postinfección por *Trichinella spiralis* y tratados o no con *Lactobacillus casei*.

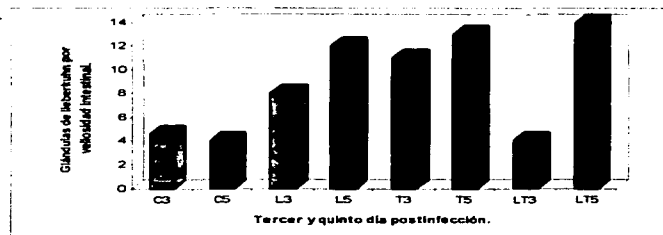


Tabla 15. Promedio de células cebadas /campo (40x) en el intestino de ratones NIH 5 días postinfección con *Trichinella spiralis*.

Corte	Control	<i>L. casei</i>	<i>T. spiralis</i>	Lc + Ts
1	0.5	1.0	1.5	1
2	0	0.5	1.5	1
3	0	0.5	1.5	0.5
4	0	0.5	1.0	0.5
5	0	0	1.0	0.5

Gráfica 7. Promedio de células cebadas /campo (40x) en el intestino de ratones NIH 5 días postinfección con *Trichinella spiralis*.

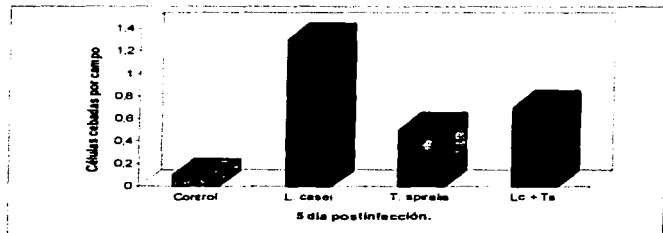
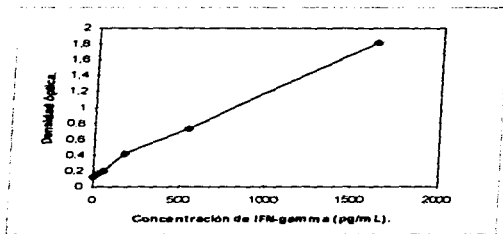


Tabla 16. Densidad óptica obtenida en relación a la concentración de IFN- γ a una longitud de onda de 450 nm.

Concentración pg/ml. IFN- γ	Densidad optica
1620	1.8215
540	0.735
180	0.417
60	0.1995
20	0.1535
0	0.1275

Gráfica 8. Curva patrón de IFN- γ .

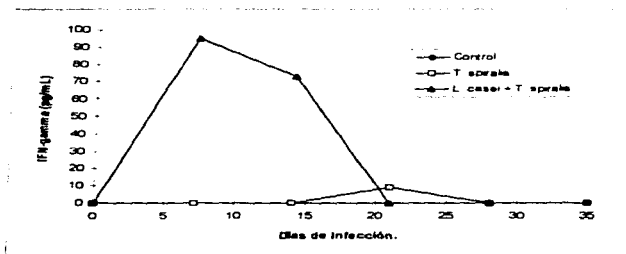


La concentración de IFN-gamma obtenida de cada grupo de ratones durante cada semana hasta que concluyó el experimento, los resultados obtenidos se obtuvieron durante el último ensayo y se muestran en la tabla 17 y gráfica 9. Se observa en la gráfica que el grupo Lc + Ts en las tres primeras semanas alcanzan niveles de IFN-gamma superiores al de los grupos control e infectados con *Trichinella spiralis*, con un pico máximo al día 7.

Tabla 17. Picogramos (pg/ml) de IFN-gamma en la mezcla de sueros de ratones tratados o no con *Lactobacillus casei* e infectados con *Trichinella spiralis*.

Tratamiento	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	Día 35
Control	0	0	0	0	0	0
<i>T. spiralis</i>	0	0	0	9.30	0	0
<i>L. casei</i> + <i>T. spiralis</i>	0	95.32	73.09	0	0	0

Gráfica 9. Picogramos (pg/ml) de IFN-gamma en la mezcla de sueros de ratones tratados o no con *Lactobacillus casei* e infectados con *Trichinella spiralis*.



DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

La expulsión de gusanos adultos del intestino del huésped es mediada por una respuesta timodependiente con un marcado cambio inflamatorio para impedir el establecimiento del parásito a ese nivel. Los resultados obtenidos muestran una reducción en el número de gusanos adultos de *Trichinella spiralis* del 79.45 % cuando se inoculan intraperitonealmente *Lactobacillus casei* vivo 7 días antes de la infección con este nemátodo.

Grencis y col. en 1986 observaron el efecto de la inmunización intraperitoneal de FCA seguida de 2 inyecciones de antígenos de superficie (200 µg) cada semana obteniendo una reducción del 42 % al octavo día postinfección.[69]

Por otro lado Robinson y col. en 1995 utilizando el suero de ratones inmunizados con 100 µg del antígeno de excreción/secreción en FCA e infectados con 300 larvas de *Trichinella spiralis* obtuvieron una protección del 56% en ratones NIH al octavo día y del 44% en ratones B10 al décimo día. Por último Bautista y col. en 1995 observaron el efecto de tres inmunostimulantes contra la infección con *Trichinella spiralis* en ratones obteniendo los siguientes porcentajes de reducción: FCA 15.5%, Concanavalina A 76% y Equimune 95.3 %.[16,67]

Aunque el establecimiento de larvas de *Trichinella spiralis* está supeditado al grado de la infección, al número de hembras que logran establecerse, madurar y a la fecundidad de las mismas; además del grado de respuesta inmune que presenta el huésped, el cual es importante para que no se establezca el parásito, algunos agentes antihelmínticos como el tiabendazol destruye algunas larvas enquistadas en el músculo esquelético. Los resultados de los tres experimentos realizados se promedian con un porcentaje de reducción del 56.1%. Froylán y col. en 1985 realizaron un estudio para determinar si con la ayuda de inmanomoduladores, es posible aumentar la actividad antihelmíntica de compuestos dirigidos contra las larvas de *Trichinella spiralis* obteniendo que BCG y Levamisol mostraron el más alto grado de interacción positiva con mebendazol.[71]

La infección por *Trichinella spiralis* en el intestino delgado de el ratón es acompañada por una atrofia parcial de las vellosidades e hiperplasia en las criptas, además esto coincide con la

expulsión de gusanos adultos (Manson-Smith y col, 1979) Se ha establecido que los linfoblastos presentes en el ducto linfático torácico o mesentéricos de nódulos linfáticos aumentan durante las infecciones con nematodos. Los resultados muestran cambios en la longitud de las vellosidades cuando se trata los grupos con *Lactobacillus casei* y son infectados por *Trichinella spiralis* en comparación a los grupos control [80]

La regulación inmune va a la par con la morfología intestinal en cuanto a las respectivas alteraciones bioquímicas y fisiológicas. Un ejemplo del cambio estructural y funcional se relacionan con el tamaño de las vellosidades intestinales a nivel membranar por cambios bioquímicos durante la infección por *Trichinella spiralis*. [53]

Durante la inflamación ocurren tres acontecimientos principales 1) Aumento del suministro sanguíneo del área infectada, 2) Aumento de la permeabilidad capilar, por retracción de las células endoteliales; esto permite que atraviesen al endotelio moléculas de mayor tamaño que las que ordinariamente lo hacen, y de este modo es posible que los mediadores solubles de la inmunidad lleguen al lugar de la infección y 3) Los leucocitos, sobre todo los polimorfonucleares neutrófilos y en menor grado los macrófagos, migran desde los capilares hacia el tejido adyacente. Una vez en ese tejido, mediante el proceso denominado quimiotaxis, se dirigen hacia el lugar de la infección. [40]

En las infecciones helmínticas de la piel, hígado, cerebro y del tracto gastrointestinal dan como resultado la proliferación o hiperplasia local de células cebadas. Los factores derivados de estos mastocitos tienen importancia para controlar la permeabilidad de los vasos sanguíneos y la inflamación en el lugar de la infección, también se acumulan en la mucosa yeyunal durante la infección y secretan factores que aceleran la expulsión; no obstante, los ratones con déficit de mastocitos pueden también eliminar los gusanos. Aunque en los resultados obtenidos se observa que el número de células cebadas aumenta ligeramente en los grupos *T. spiralis* y *Le+Ts* en comparación de los otros grupos, existen dudas relacionadas con el método de fijación y tinción de las muestras dado que algunas de estas células parecían destruidas o degranuladas esto tal vez se deba un proceso inmunológico temprano. [40,81]

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

La detección de eosinófilos y células cebadas en tejidos puede ser problemático, dado que con los fijadores y colorantes convencionales es imposible la tinción de los gránulos de los eosinófilos, teniendo que sujetarse a un pH extremadamente bajo, el cual se requiere para una adecuada tinción de células cebadas. Para posteriores ensayos se sugiere que se adecuen estos métodos de fijación y tinción, dado que para demostrar las células cebadas de tejido conectivo lleva fijación con formalina de los cortes y tinción con azul de toluidina y no muestran adecuadamente las células cebadas de mucosas, que sólo es posible estudiarlas con fijadores y colorantes especiales, además de determinarse algunos factores séricos de las células cebadas como lo son las proteinasas o el contenido de los gránulos. [40,78]

En el caso de infección parasitaria, hay un aumento notable de células cebadas de la mucosa en el intestino. Es evidente que la proliferación de estas células después de tal infección depende de las linfocinas derivadas de las células T, incluidas IL-3, IL-4, IL-9 e IL-10 [9,40]

La citocina considerada para este estudio fue el interferón gamma dada su importancia en la presentación de antígenos por los macrófagos o células que posean moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad como respuesta inmediata a la infección por *Trichinella spiralis*, posteriormente este interferón puede inducir la síntesis de IgE e IgG1 y proliferación de células cebadas. Los resultados muestran un incremento en la producción de IFN- γ al séptimo día después de la infección en el grupo tratado e infectado en comparación a los demás grupos, se debe considerar que la respuesta inmune entérica ocurre entre esos días de manera marcada. Durante la infección con *Trichinella spiralis* los niveles de IFN- γ se elevan el día 7 hasta 6 ng/mL. [68] En 1994 Goyal y col. observaron un aumento de 130 U/mL al día 4 [82], mientras Robinson y cols. en 1995 utilizando el antígeno de expresión/secreción observaron valores negligibles de IFN- γ durante todo el ensayo. [66]

Las células T juegan un papel importante en la regulación inmune y en la respuesta inflamatoria mediante su capacidad para secretar citocinas [83]. En el ratón, están claramente definidas las diferentes citocinas involucradas por subclases de Th1 y Th2 [82]. Pond y col. en 1989 sugieren que el incremento de la resistencia a la infección con *T. spiralis* está asociada con la producción de citocinas por parte de Th1, como IFN- γ e IL-2. [68]. Por otro lado, Grecnis y col. 1991 observaron la activación de Th1 y Th2 durante la infección por *Trichinella sp* [7]. Kelly y cols.

en 1991, demostraron que está respuesta ocurre al mismo tiempo pero en diferentes órganos linfoides. [84]

¿ Como es entonces que el *Lactobacillus casei* inoculado intraperitonealmente participa en la respuesta contra la infección ocasionada por *Trichinella spiralis* ? Se ha reportado que el *Lactobacillus casei* ATCC 9018 puede activar macrófagos in vitro o in vivo, determinado por el incremento en la actividad fagocítica o secreción de enzimas lisosomales, o por la capacidad para producir radicales oxígeno [20] Además de poseer un efecto adyuvante en la reacciones de hipersensibilidad de tipo tardía y formación de anticuerpos. [85] Se ha observado un efecto positivo en infecciones ocasionadas por: *Pseudomonas aeruginosa* [20], *Escherichia coli* [18-19] y *Salmonella typhimurium*. [19]

CONCLUSIONES.

- La inoculación de *Lactobacillus casei* vía intraperitoneal posee un efecto protector contra *Trichinella spiralis* en su fase adulta; desconociéndose si esta respuesta es en contra del mismo parásito o disminuyendo su capacidad invasora
- La inoculación de *Lactobacillus casei* vía intraperitoneal posee un efecto protector contra *Trichinella spiralis* en su fase larvaria; desconociéndose si este mecanismo va en contra de la fecundidad de las hembras, la larva recién nacida, o la larva enquistada en músculo esquelético, o solamente se deba a la disminución del número de adultos.
- Al parecer no existen cambios importantes a nivel intestinal que nos indiquen que el *Lactobacillus casei* produzca una alteración que induzca la expulsión del gusano adulto a ese nivel.
- Los niveles de interferón-gamma poseen un pico máximo al séptimo día postinfección cuando se trata a los ratones siete días antes con *Lactobacillus casei* que se relaciona con una disminución importante de gusanos adultos a nivel intestinal.
- Son necesarios más estudios para determinar la naturaleza de los componentes del *Lactobacillus casei* que inducen esta protección.

APÉNDICE.

1. Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2

Na_2HPO_4 0.15 M 21.3g/L de agua destilada

K_2HPO_4 0.15 M 20.4g/L de agua destilada

NaCl 0.15 M 8.8g /L de agua destilada

Fuente: Referencia 86

2. Solución salina isotónica (SSI).

NaCl 8.5 g

Agua destilada 100 mL

Fuente: Referencia 86

3. Preparación de alcoholes de diferente grado

Partiendo de alcohol etílico 96%

Adicionar 52.08 mL completar a 100 mL de agua destilada. Alcohol al 50%

Adicionar 62.5 mL completar a 100 mL de agua destilada. Alcohol 60%

Adicionar 72.91 mL completar a 100 mL de agua destilada. Alcohol al 70%

Adicionar 83.3 mL completar a 100 mL de agua destilada. Alcohol al 80%

4. Líquido de Carnoy.

Etanol absoluto 6 volúmenes

Cloroformo 3 volúmenes

Ácido acético 1 volumen

Fuente: Referencia 87

5. Formol 10%.

De una solución comercial del 40% tomar 25 mL y completar a 100 mL. con SSI.

Fuente: Referencia 88

6. Hematoxilina.

En un matraz Erlen Meyer disolver 100 g de alum de potasio con 1000 mL de agua destilada por agitación y calentamiento. Mantener a 60 °C; adicionar una solución de 5 g de Hematoxilina en 50 mL de alcohol etílico absoluto; y retirar del calentamiento para adicionar 2.5 g de óxido de mercurio. La solución inmediatamente cambia a púrpura. Filtrar la solución antes de ser usada, esta es estable durante aproximadamente seis meses.

7. Eosina .

Las soluciones acuosas se hacen generalmente a concentración al 1 % p/v; se puede añadir un cristal grande de timol ó 0.25 mL de formaldehído al 40 % a cada 100 mL de solución para prevenir el crecimiento de hongos. La solución alcohólica (1 % p/v) se hace disolviendo un gramo en 20 mL de agua destilada y añadiendo 80 mL de etanol absoluto.

Fuente: Referencia 89

8. Azul de Toluidina.

Azul de toluidina	0.5 g
Etanol 96%	20 mL.
Agua destilada	80 mL.

Disolver en alcohol y adicionar el agua. Filtrar y colocar en un frasco seco en el refrigerador.

Fuente: Referencia 90

9. Colorante de Wright

Colorante de Giemsa	1 g
Metanol	500 mL

Disolver el colorante en metanol, filtrar y guardar hasta su uso.

10. Solución digestora .

Solución salina isotónica	1000 mL
Ácido clorhídrico concentrado	7.0 mL
Pepsina 1:10,000	3.0 g
Fuente: Referencia 91	

11. Medio EHefer Broth

Triptona	20 g
Extracto de levadura	5.0 g
Gelatina	2.5 g
Dextrosa	5.0 g
Sacarosa	5.0 g
Lactosa	5.0 g
Cloruro de sodio	4.0 g
Acetato de sodio	1.5 g
Ácido ascórbico	0.5 g

1. Rehidratar el medio en un litro de agua destilada.
2. Esterilizar a 15 libras de presión durante 15 minutos.

REFERENCIAS.

1. Despommier D D (1986) Trichinellosis. In: Immunodiagnosis of Parasitic Diseases Vol. 1 Helminthic (Academic Press, Inc), pp.163-181. Plenum Orlando USA.
2. Yopez M L y Ortega P M. Actualidades sobre la respuesta inmune hacia *Trichinella spiralis*. Ciencia y desarrollo 1994. (7):44-51.
3. Martínez M R. ¿Está aumentando la triquinosis en México? ¿Podría esto ser una consecuencia inesperada de nuestro "desarrollo"? Sal Pub Mex 1985. 2(1):40-50
4. Dirección General de Epidemiología /SSA Clave SS-EPI-1-85. Desde 1988-1994. Impreso en México, D.F.
5. Wakelin D. Immunity to intestinal parasites. Nature 1978. 273 (6) : 617-620.
6. Wakelin D and Wilson M M. *Trichinella spiralis* : Immunity and Inflammation in the expulsion of transplanted adult worm from mice. Experimental Parasitol 1979. 48: 305-312.
7. Grecis K R, Hultner L. and Else K J. Host protective immunity to *Trichinella spiralis* in mice : activation of Th cell subsets and lymphokine secretion in mice expressing different response phenotypes. Immunol 1991. 74 : 329-332.
8. Despommier D D, Mc Gregor D D, Crum E D and Carter P B. Immunity to *Trichinella spiralis* II. Expression of immunity against adult worms. Immunol 1977 b. 33: 797.
9. Grecis R K, Else K J, Huntley J F and Nishikawa S I. The in vivo role of stem cell factor (c-kit ligand) on mastocytosis and host protective immunity to the intestinal nematode *Trichinella spiralis* in mice. Parasite Immunol 1993. 15 : 35-39.
10. Venturiello M S , Giambartolomei H G and Constantino N S. Immune Killing of newborn *Trichinella* larvae by Human leucocytes. Parasite immunol 1993. 15 : 359-364.
11. Masahi K N. Cytokines and Immunomodulators: Promising Therapeutic Agents. Parasitol Today 1994. 10 (1) : 1-2.
12. Bautista G C, Flores H O and Quiroz R H. Non-specific resistance of sheep against *Haemonchus contortus* with Freund's complete adjuvant. Parasite Immunol 1991. 13 :565
13. Bautista G C, Gomez A A, Morilla G A, Vera M e Ibarra U F. Inducción por *Fasciola hepatica* en ovinos con adyuvante completo de Freund. Rev Mex Parasitol 1992. 3 :22
14. Bomford R. Adjuvants for anti-parasite vaccines. Parasitol Today 1989. 5 (2) :41-6
15. Bautista G C, Daza F H; Ixta R O y Martínez G F. Inducción de resistencia contra *Toxoplasma gondii* en ratones NIH tratados con concavalina A. Vet Mex 1995 b. 26 : 2

16. Bautista G C, Zeron B F, De la Jara A F, and Flores C R. Effect of Three Immunostimulants on the Resistance Against *Trichinella spiralis* Infection in Mice (Preliminary Report). Arch Med Res. 26: 91-93.
17. Ibarra V F. Modulación de la respuesta inmune para posiblemente potenciar la actividad antihelmíntica de compuestos contra *N. dubius* adultos o larvas de *T. spiralis* en ratones 1985 1:327-340.
18. Perdígón G, Alvarez S, Pesce de Ruiz H A and col. Immunoadjuvant activity of oral *Lactobacillus casei*. Influence of on the secretory immune response and protective capacity in intestinal infections. J Dairy Resear 1991. 58: 485-496.
19. Nomoto K, Yokokura T, Mitsuyama M, Yoshikai and Nomoto K. Prevention of Indigenous Infection of Mice with *Escherichia coli* by nonspecific Immunostimulation. Antimicrobial Agents Chemotherapy 1992. 36 (2): 361-367.
20. Miaske S, Nomoto K, Yokokura T, Yoshikai Y, Mutai M and Nomoto K. Proctetive Effect of *Lactobacillus casei* on *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Mice. Infect immunity 1985. 48 (2):480-485.
21. Isolauri E, Joensuu J, Suomalainen H, Luomala M and Vesikari T. Improved immunogenicity of oral DX RRRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. Vaccine 1995. 13 (3):310-312.
22. Bognanov I G, Gurevich I A, Velich U T and col. Antitumor action of glycopeptides from the cell wall of *Lactobacillus bulgaricus*. Oncology 1978. 17:50-1753.
23. Despommier D D (1987). *Trichinella spiralis*. In: Parasitic life cycles (Slingler-Verlag), Plenum New York USA. 100-103.
24. Despommier D D. *Trichinella spiralis* and the concep of niche. J Parasitol 1993. 79 (4):472-482.
25. Murrell K D. Strategies for the control of Human Trichinosis Transmitted by Pork. Food Technol 1985. (3):110-111.
26. Fragoso U R, Villicaña F H, Tavizón G P y Campos R J. Informe de un brote de triquinosis en Laguna del Carretero, Zacatecas. Infectologia 1985. 5(6):169-173.
27. Martínez O B, Viguera R A, Carvajal G A, Flores P A y Jalil A A. Triquinosis. Bol Med Hosp Infant 1996. 43(3):181-183.
28. Quiroz R R y Landeros R R. Valoración del tiempo de sobrevivencia de larvas de *Trichinella spiralis* en chorizo de cerdo. Rev Mex Parasitol 1988 1(1):22-24.
29. Alvarez C R, Riega C R, García R J, Wong C M y Cob S C. Triquinosis en el niño. Informe de 8 casos. Bol Med Hosp Infant Mex 1992. 49(5):286-290
30. Domínguez A J, Ramírez C G y Cob G L. Búsqueda de *Trichinella spiralis* en tres centros de engorda porcina ejidal de Yucatan. Rev Mex Parasitol 1992 3(1):32.

31. Carroll F E, Farr R P y Clifton J R. (1984). Nematodos afásquidos parásitos en el hombre. En Craig y Faust Parasitología Clínica (Salvat Editores), pp.263-272. Impreso en Barcelona España
32. Tay-Lara y Velasco-Gutierrez (1993). Triquinosis. En Parasitología médica (Mendez Editores), pp.365-372. Impreso en México D.F.
33. Willian C C, Pozio E and Bruschi F. Trichinellosis. Proceedings of the Eighth International Conference on Trichinellosis. Instituto Superiore di Sanità p. 35-47. Press in Rome, Italy 1994
34. Murrell K D. Preslaughter control of trichinosis. Food Technol 1983. (3):87-90
35. Pozio E, La Rosa G, Murrell K D and Ralph I. J. Taxonomic Revision of the genus *Trichinella*. J Parasitol 1992. 78(4):654-659
36. Piedrola A G. Nematodos tisulares. En Microbiología y Parasitología Médica (Salvat Editores) pp.840-841. Impreso en Barcelona España.
37. Bauer J 1986. Análisis clínicos. Métodos e interpretación (Editorial Reverté) p.873-878. Impreso en Barcelona España.
38. Goldsmith M D y Heyneman M A (1995). Enfermedades granulomatosas larvianas. En Parasitología y Medicina Tropical (El Manual Moderno) 546-554. Impreso en México D.F.
39. Lambert R A (1975). Identificación de nematodos En Parasitología. Identificación de Helminthos (El Manual Moderno) 67-68. Impreso en México D.F.
40. Brow W H (1985) Parasitología Clínica (Nueva Editorial Interamericana) 113-120. Impreso en México, D.F.
41. Soule C., J. Dupovy-Camet avec la collaboration de t. Ancelle, P. Borréé et. L. Touratier (1993) La trichinellose: Une zoonose en évolution. Office International des Epizooties, Centre National d'Etudes, Vétérinaires et Alimentaires.
42. Despommiere D D . *Trichinella spiralis*: The worm That Would Be Virus. Parasitol Today 1990. 6(6) 193-196
43. Hernandez M, Ramos M E, Casco S J, Morales G J, Perez M E. Triquinosis aguda. Epidemia de 166 casos en Ciudad Delicias Chihuahua. Diagnóstico por compresión tisular y tinción. Gac Med Mex 1992. 128(1):
44. Contreras A A , Herrera E R. Triquinosis porcina en el Estado de Zacatecas. Rev Mex Parasitol 1992. 3(1):25-27.
45. Villicaña F H, Escobar L M y Diaz C G. Nuevos brotes de triquinosis en el Estado de Zacatecas. Sal Pub Mex 1984. 26 (3):260-262.
46. Jack C L. Regulatory action to control *Trichinella spiralis*. Food Technol 1983. (3):95-97.

47. Plorde J J (1986). Triquinosis. En Harrison Principios de Medicina Interna vol 1 v(Mc Graw-Hill) 1690-1692. Impreso en México D.F.
48. Pozio E and Bruschi F. Updating on Trichinellosis. *Parasitol Today* 1994. 10 (2): 44-45.
49. Macrocken R O, García A and Robin E E. Mebendazole therapy of enteral Trichinellosis. *J Parasitol* 1982. 68 (2) : 259-262.
50. Markell K E y Voge M. Otros nématodos de los tejidos. En *Parasitología Diagnóstico, Prevención y Tratamiento (El Manual Moderno)* 289-299. Impreso en México, D.F.
51. Kotula W A. Postslaughter control of *Trichinella spiralis*. *F Technol* 1983. (3) 91-94.
52. Leighty C. Action Regulatory of control on *Trichinella spiralis*. *F Technol* 1983. (3): 95-97.
53. Castro A G. Immunophysiology of Enteric Parasitism. *Parasitol today* 1989. 5 (1) : 11-19.
54. Roitt I. Inmunidad frente a protozoos y helmintos. En *Inmunología*
55. Wakelin D. *Trichinella spiralis*: Immunity, ecology and evolution. *J Parasitol* 1993. 79 (4) :488-494.
56. Sinski E, Jeska I. E and Bezubik B. Enteral and parenteral responses in mice after primary infection with *Trichinella spiralis* (Nematoda). *J Parasitol* 1983. 69 (4) : 645-653.
57. Denkers I E, Wassom L D and Hayes E C. The mouse antibody responses to *Trichinella spiralis* defines a single, immunodominant epitope shared by multiple antigens. *J Immunol* 1990. 14 (8) : 3152-3159.
58. Jaffe S H y Sherwin A S. Inmunomoduladores. En *Inmunología básica (El Manual Moderno)* 81, 927-933. Impreso en México, D.F.
59. Wakelin D. Allergic Inflammation as a Hypothesis for the expulsion of worm from Tissues. *Parasitol Today* 1993. 9 (4) : 115-116.
60. Pestka J J and Witt M F. An Overview of Immune function. *F Technol* 1985. (2) :83-90.
61. Perrudet D A and Boussac A Y. Preliminary studies of course of a *Trichinella spiralis* infection in athymic Nude rats. *J Parasitol* 1980. 66 (4) : 671-673.
62. Korenasa H, Wang C H, Bell R G, Zhu D and Ahman A. Intestinal Immunity to *Trichinella spiralis* is a property of OX8 -OX22- T Helper cells that are generated in the intestine. *Immunol* 1989. 66 : 588-594.
63. Crook K and Wakelin D. Induction of T lymphocyte subsets and levels of interleukin-2 and interleukin-3 after infection with *Trichinella spiralis* are similar in mice of High- and low- responder phenotypes. *International J Parasitol* 1994. 24 (1) : 119-126.

64. Grencis R K and Wakelin D. Antigen-specific T-cell lines transfer protection immunity against *Trichinella spiralis* in vivo. *Immunol* 1986. 58 : 57-61
65. Mc Cracken R O. Lack of effect of Host Age on the Distribution of *Trichinella spiralis* within the small intestine of Laboratory Mice. *J Parasitol* 1982. 68 (1) : 159-162.
66. Robinson K, Bellaby T and Wakelin D. Immune response profiles in vaccinated and non-vaccinated high- and low- responder mice during infection with the intestinal nematode *Trichinella spiralis*. *Parasitol* 1995. 110 : 71-78.
67. Robinson K, Bellaby T and Wakelin D. Immunity to *Trichinella spiralis* transferred by serum from vaccinated mice not protected by immunization. *Parasite Immunol* 1986. 8 : 587-596
68. Pond L, Wasson I. D and Hayes E. C. Evidence for differential induction of Helper T cell subsets during *Trichinella spiralis* infection. *J Immunol* 1986. 143 (42) : 4232-4237.
69. Grencis R K, Crawford C, Pritchard D I, Behnke J M and Wakelin D. Immunization of mice with surface antigens from the muscle larvae of *Trichinella spiralis*. *Parasite Immunol* 1986. 8 : 587-596.
70. Hadden J W. Immunostimulants. *Immunol Today* 1993. 14 (6) : 273-280.
71. Katz P (1987). Inmunomodulación. Inmunopotenciadores, tolerancia e inmunosupresión. En *Inmunología (Nueva editorial Interamericana)*, 209-212. Impreso en México, D. F.
72. Finegold M S and Baron J E (1992). Lactobacilos. En Bailey Scott, *Diagnóstico microbiológico (Editorial Médica panamericana)*, 459. Impreso en Buenos Aires, Argentina.
73. Carpenter I. P (1984). Lactobacilos. En *Microbiología (Nueva Editorial Interamericana)*, p 332. Impreso en México, D. F.
74. Jayes H J. Efectos benéficos de los lactobacilos. En *Microbiología moderna de los alimentos (ACRIBIA)*, 86, 475, 478. Impreso en Zaragoza, España.
75. Marquez D M (1992). Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas (McGraw-Hill), p 503-506. Impreso en México, D F.
76. Lennette H E (1987). *Manual de Microbiología clínica (Editorial médica panamericana)*, 1356. Impreso en Buenos Aires Argentina.
77. Wakelin D and Wilson M M. Transfer of immunity to *Trichinella spiralis* in the mouse with mesenteric lymph node cells in donors and expression of immunity in recipients. *Parasitol* 1977. 74 :215.
78. Kermanizadeh P, Hagan P and Croptom D. W. A Differential staining Method for Mast cells and Eosinophils in Murine Intestine, Liver and Spleen. *Parasitol Today* 1995. 11 (5): 194-196.
79. Genzyme (1995). InterTest- γ ELISA kit. Manufactured by Genzyme corporation, 1-20. Press in Cambridge.

80. Mason S D, Bruce R G and Parrott M V. Villous Atrophy and Expulsion of Intestinal *Trichinella spiralis* Are Mediated by T cells. *Cell Immunol* 1979, 47 : 285-292.
81. Lee D G, Swiete M and Befus A D. Mast Cell Responses to Helminth Infection. *Parasitol Today* 1986, 2 (7) : 186-191.
82. Goyal P K, Hermanek J and Wakelin D. Lymphocyte proliferation and cytokine production in mice infected with different geographical isolates of *Trichinella spiralis*. *Parasite Immunol* 1994 16:105-110.
83. Scott P Kaufmann H E. The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of infection *Immunol Today*; 1991; 12: 346-8
84. Kelly B E, Cruz S E, Hauda M K and Wassom L D. IFN- γ and IL-5 producing cells compartmentalize to different lymphoid organs in *Trichinella spiralis*-infected Mice. *Immunol* 1991, 147 (1): 306-11.
85. Perdigón G, Nader M, Alvarez S and col. Effect of perionally administered Lactobacilli on macrophages activation in Mice. *Infect Immun* 1986, 53 : 404-410.
86. Soria C S (1995). Estandarización de la técnica inmunoensayo en capa delgada (ICD) en comparación con la técnica inmunofluorescencia indirecta (IFI), para el diagnóstico de triquinosis murina. Tesis de QBP de la ENCB, 72-73. Impreso en México, D. F.
87. Lacquin M y Langeron M (1985). Manual de Microscopia (Editorial Labor, S.A.). Impreso en Barcelona España.
88. Flores E E, Zamora P L y Manzano R P. Manual de Técnicas Histológicas (AGT Editor, S. A) Impreso en México D. F.
89. Stanley S R (1976). Lynch's Medical Laboratory Technology vol. II (Editorial W B Saunders Company), 922-923. Impreso en USA.
90. Koss L G. (1979). Diagnostics cytology and its histopathologic bases vol. II (J: B Lippincott Company), 1242-1243. Impreso en USA.
91. De Nova R M y Rojas R J (1997). Evaluación del antígeno de excreción-secreción de larvas infectivas de *T. spiralis* mediante la técnica de Dot-ELISA en comparación con la inmunotransferencia (IET) para el serodiagnóstico de la triquinosis porcina. Tesis de QFB de la FES Zaragoza de la UNAM, 86. Impreso en México, D. F.