

00346 1
24.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**ANALISIS DEL PROCESAMIENTO DE ANTIGENOS
SOLUBLES DE LA LARVA INFECTIVA L₁ DE
Trichinella spiralis POR DIFERENTES ESTIRPES
CELULARES.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)
P R E S E N T A
PATRICIA AMALIA / ALCANTARA PEREZ

MEXICO, D. F.

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.

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la M. en IBB Ma. Dolores Correa Beltrán en el Depto. de Inmunoparasitología del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Dr. Manuel Martínez Baez. (INDRE).

Agradecimientos:

A la Dra. Ma. Dolores Correa por asesorar este trabajo, por su ayuda y por haberme permitido trabajar en su Laboratorio.

A :

**Dr. Abraham Landa
Dra. Edda Sciutto
Dra. Cecilia Teresa
Dra. Lilian Yepez
Dra. Bertha Espinoza
Dra. Emma Isabel Melendro**

Por su ayuda, por todos sus comentarios y observaciones.

Al M en C. Sigifredo Pedraza por sus críticas, por todas sus aportaciones técnicas, por su amistad.

A la M en C. Nina Valadez por sus observaciones, por su gran compañerismo y por su valiosa amistad.

Al M en IBB. José Carmen Gudíño por sus aportaciones técnicas y académicas, por su compañerismo y ayuda.

A la QFB. Laura Adalid por sus sugerencias, críticas, por su amistad.

A la Biol. Erika Paz por sus observaciones y sugerencias, también por su amistad.

Al Dr. Francisco Alvarado por su apoyo en el escaneado de las fotografías.

Al QFB. Gilberto Voughan por su asesoría en el escaneado de las fotografías y por su amistad.

Al Dr. Luis Fabila del Depto. de Inmunología de la ENCB por su apoyo en la densitometría de las inmunoelectrotransferencias.

A la Dra. Carmen Soler por todo su apoyo en la terminación de este trabajo y por sus sugerencias y consejos.

A la Secretaria Ejecutiva Elvia Escalante por toda la ayuda que me brindó.

Al personal de la Unidad de Computo del INDRE.

Al personal del Bioterio del INDRE, por su valiosa ayuda.

A mis amigos:

**p. Biol. Cristina Becerril
Biol. Constantino Beltrán
p. Biol. Fernando Cásarez
QFB. Olga Mata
Sra. Hilda Zaragoza**

Por su apoyo en todo momento, por aceptarme tal cual soy y sobre todo por su amistad incondicional.

"GRACIAS GRUPO EGO"

A todos mis compañeros del Laboratorio de Inmunoparasitología por su ayuda, amistad y sucompañerismo, gracias a todos:

**Biol. Ma. Isabel Alcántara
QFB. Arzel Alvarado
p. Biol. Cristina Becerril
Biol. Constantino Beltrán
p. Biol. Fernando Cásarez
QFB. Mayra Cruz
p. QBP Alvaro Cuahutecatl
M en IBB. Jorge Luis de la Rosa
p. Dr. Ma. del Consuelo Gómez
M en IBB. Juan Antonio Ibarra
M en C. América Mandujano
MVZ Simón Martínez
QFB. Olga Mata
p. Biol. Inés Magadán**

**p. M en C. Edith Medina
p. M en C. Yolanda Medina
QFI. Antonio Meza
p. QFB. Gustavo Miramón
p. QFB. Jorge Mora
p. M en C. Zoila Morales
Sra. Teresa Negrete
p. Dr. Guillermo Pérez
est. Med. Cir. Hector Preciado
p. Biol. Maribel Puebla
MVZ Julián Reyes
QFB. Raquel Tapia
QFB. Gilberto Voughan
Sra. Hilda Zaragoza**

A mis compañeros y amigos de la Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos por su compañerismo, amistad y apoyo, muchas gracias:

**QFB. Laura Adalid
p. QFB. Hector Aguilar
p. M en C. Amalia Barquet
QFB. Ma. del Carmen Basualdo
p. Biol. Gabriela Carabeo
M en C. Octavio Díaz
Secretaria Ejec. Elvia Escalante
Tec. Luz María Espinoza
p. M en IBB. Claudia Gómez
p. M en C. Victor Raul Gómez
QBP. Elizabeth González
M en IBB. José Carmen Gudiño**

**Secretaria. Belem Hernández
Tec. Silvina López
p. M en IBB. Fernanda Martínez
QFB. Guillermo Nicolás
Biol. Erika Paz
p. Biol. Maribel Puebla
p. Biol. Abel Puente
Biol. Rita Rojas
Tec. Susana Serrano
p. QFB. Edgar Sevilla
p. M en C. Joel Armando Vázquez**

Dedicatoria:

A quien me ha dado todo, a ti Dios, muchas gracias.

A mis padres Antonio y Andrea, gracias por estar conmigo siempre, gracias por su amor.

A mis hermanos José Antonio, Araceli, Rodrigo, Guillermo, Alicia, Enrique y Gabriela que con su apoyo y comprensión me han ayudado todo el tiempo.

A mis sobrinos Daniela y Miguel a quienes amo profundamente.

A mi tía Antonia, a mi abuela Plácida y a toda mi familia por brindarme su cariño y apoyo.

Tanto tiempo buscando
sin saber como encontrarte
cuantas veces te sentí muy cerca
pero no quise entender
cuanto tiempo de errante
caminando por la vida
sin saber cuando ni como
encontrar la paz divina
pero ahora comprendo
que el dolor y la derrota
son el triunfo de mi vida
..... para llegar a ti.

ÍNDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
1. Triquinaeosis	3
2. Biología	6
2.1 Morfología	7
2.2 Ciclo de vida	13
3. Respuesta inmune	17
3.1 Respuesta humoral	17
3.2 Respuesta celular	18
3.3 Protección	21
4. Procesamiento y presentación de antígenos	24
4.1 Células presentadoras de antígeno	24
4.2 Procesamiento de antígenos restringido por moléculas clase II	27
4.3 Presentación restringida por moléculas clase II	33
4.4 Procesamiento de antígenos restringido por moléculas clase I	35
4.5 Presentación restringida por moléculas clase I	37
II. JUSTIFICACIÓN	40
III. OBJETIVO GENERAL	40
IV. OBJETIVOS PARTICULARES	40
V. METODOLOGÍA	41
1. Mantenimiento de la cepa de <i>Trichinella spiralis</i> in vivo	41
2. Purificación y obtención de larvas infectivas L. <i>T. spiralis</i>	41
3. Preparación del extracto total de la larva infectiva de <i>T. spiralis</i> (ET)	42
4. Obtención de anticuerpos específicos anti-<i>T. spiralis</i>	43
5. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 11% (PAGE-SDS)	43
6. Inmunoelctrotransferencia (IET)	44
7. Mantenimiento in vitro de macrófagos (Mφs) de la línea J774, U937 y THP1	45
8. Obtención de macrófagos de exudado peritoneal (CEF)	45
9. Densitometría de las IETs	46
10. Efecto del ET y deoxicolato de sodio (DOC) sobre los Mφs de la línea J774	48
11. Efecto de los lavados y cambio de tubo sobre los Mφs de la línea J774	50
12. Ensayos de Dosis/respuesta	50
13. Unión de antígenos	53
14. Pulso y seguimiento	55
VI. RESULTADOS	57
VII. DISCUSIÓN	80
VIII. CONCLUSIONES	88
IX. REFERENCIAS	89

RESUMEN

En la triquinelosis experimental los linfocitos Th₂ median la inmunidad protectora y esta protección está inducida principalmente por los antígenos de excreción-secreción de la larva infectiva L₁ de *Trichinella spiralis*. Sin embargo no se sabe qué antígenos del parásito son los que las células presentadoras de antígeno (CPAs) procesan y presentan a los linfocitos T para inducir esta protección. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue el hacer un análisis de la unión y procesamiento de un extracto total de la larva infectiva L₁ de *T. spiralis* por macrófagos de las líneas celulares J774, THP1 y U937 y por células de exudado peritoneal de ratón (CEP).

En los ensayos de unión, los macrófagos se incubaron con el extracto total durante diferentes tiempos a 4 ó a 37°C; se lavaron una vez, se verificó su viabilidad, se cuantificó la concentración de proteínas y se sometieron a inmunoelectrotransferencia (IET) empleando un suero de conejo hiperinmune anti-*T. spiralis*. Este análisis mostró que las diferentes células empleadas reconocen un patrón de bandas similar y que éstas unen sólo algunos de los antígenos presentes en el extracto total del parásito. Así, diferentes componentes con pesos moleculares entre 40 y 100 kDa fueron reconocidos desde los 2 min, sin embargo, los antígenos principalmente reconocidos a este tiempo, fueron uno de 18 y otro de 58 kDa. El reconocimiento de los otros antígenos se incrementó conforme aumentó el tiempo de incubación.

En los ensayos de pulso y seguimiento, las células se incubaron con el extracto total a 4°C, se lavaron y se incubaron con DMEM-1%SBF durante diferentes tiempos a 37°C. Posteriormente, los macrófagos se trataron como se mencionó en los ensayos de unión. En las diferentes IETs se observó, tanto la desaparición de bandas como la disminución en la intensidad de otras. También se observó la aparición de otras bandas, sugiriendo el procesamiento de algunos antígenos por parte de las diferentes CPAs. Los macrófagos de la línea celular J774 empezaron el procesamiento a los 60 min, mientras que las THP1 entre 1-2 h y las CEP y las U937 a las 4 h. En especial con las CEP y la línea U937 se evidenció en sus IETs una banda de 80 kDa (probablemente un producto del procesamiento) que aparece a las 4 h y permanece hasta las 24 h.

Además, fue evidente en las IETs de estos ensayos, la presencia de los antígenos de 18 y 58 kDa, los cuales permanecieron sin cambios en los diferentes tiempos de incubación,

sugiriendo que estos dos antígenos no son procesados por las CPAs. Es posible que el antígeno de 18 kDa, sea una mezcla de productos de procesamiento debido a que esta banda se observa con gran intensidad a través de los ensayos.

Por otro lado, con la metodología empleada en este trabajo no se puede saber si el antígeno de 80 kDa se procesa en la superficie de la célula o si es internalizado, por lo que es necesario realizar experimentos adicionales (p. ej. el uso de inhibidores enzimáticos) que indiquen el sitio en el que se lleva a cabo dicho procesamiento. Además se sugiere complementar el análisis del procesamiento del extracto total del parásito por las diferentes CPAs a tiempos de incubación más largos.

En este trabajo se identificaron algunos antígenos del extracto total de la larva infectiva L₁ de *T. spiralis* que son unidos y posiblemente procesados por diferentes tipos de CPAs. Se requiere hacer un análisis más completo sobre el procesamiento de estos antígenos utilizando otras metodologías como el marcaje radiactivo o no radiactivo del antígeno, el empleo de electroforesis en geles de tricina o la utilización de inhibidores enzimáticos que afecten la vía lisosomal, que permitan conocer el sitio en el que se lleva a cabo este proceso, así como la participación de cada uno de estos antígenos unidos y procesados por las CPAs en la generación de una respuesta celular.

I. INTRODUCCIÓN

1. Triquinelosis.

La Triquinelosis es un padecimiento causado por el parásito *Trichinella spiralis*. El hombre, al igual que los cerdos domésticos y los animales silvestres, se infecta por la ingestión de carne contaminada con las larvas infectivas L₁ (Despommier, 1983).

La triquinelosis aguda en el ser humano se diagnostica sin dificultad sobre todo cuando se presenta como brote epidémico. Sin embargo, debido a las numerosas y diversas manifestaciones clínicas producidas por *T. spiralis*, esta parasitosis puede confundirse con otros padecimientos si no se tiene la sospecha diagnóstica; más aun cuando se presenta en forma esporádica en zonas no endémicas.

La mayoría de los casos humanos son moderados o subclínicos; y por lo general, la gravedad de la enfermedad depende del número de larvas invasoras ingeridas, que cuando es grande se manifiesta con diarrea, fiebre, mialgias, edema facial, miositis, encefalitis y artritis, siendo la eosinofilia el hallazgo característico que orienta al diagnóstico (Pawlowski, 1983; Rojas-Ortega y cols., 1989).

Generalmente el diagnóstico se basa en la historia clínica, el examen físico, las pruebas serológicas o la demostración directa del parásito en el músculo ó intestino (Pawlowski, 1983). Se llega a sospechar de triquinelosis cuando un grupo de personas se presentan con síntomas después de haber estado expuestos a una fuente de carne común (Gould, 1970).

La triquinelosis es una enfermedad ampliamente distribuida en el mundo (Pozio y cols., 1989), aunque existen áreas donde no se ha reportado la presencia del parásito (Figura 1).

A principios del siglo XX, la triquinelosis se consideró como un problema importante de salud pública en Europa, Estados Unidos, Centro y Sudamérica (Murrell y cols., 1984). Años más tarde, el número de casos disminuyó en los países desarrollados gracias a la vigilancia y control de las fuentes de infección (MMWR, 1991). Sin embargo, siguió siendo un problema de salud pública en vías de desarrollo debido a los problemas socioeconómicos y de higiene que presentan (Kim, 1983; Kolata, 1985). Recientemente, se registró un incremento en el número de brotes de triquinelosis en diferentes partes del mundo debidos a la ingestión de carne de oso, cerdo silvestre, de caballo ó de cerdo doméstico (James, 1989; Pozio y Bruschi, 1994).



Figura 1. Distribución mundial de *Trichinella* ssp. T1. *T. spiralis*; T2. *T. nativa*; T3. *Trichinella* tipo 3; T4. *T. pseudospiralis*; T5. *Trichinella* tipo 5; T6. *Trichinella* tipo 6; T7. *T. nelsoni*. (Tomado de Pozio y cols., 1989)

En México, la triquinosis como enfermedad humana, probablemente existió desde que se introdujo el cerdo al país recién terminada la Conquista (Martínez-Marañón, 1985). Desde finales del siglo pasado, se reportaron casos de triquinosis (Olvera, 1896), descubriéndose en cadáveres (Barragán, 1981) y posteriormente en estudios sobre la frecuencia del parásito en series de autopsias (Tabla I) (Perrin, 1939; Mazzotti y Chavira, 1943; Mazzotti, 1944; Martínez-Marañón y cols., 1974).

Hasta la década de los 70's se presentaron reportes más frecuentes acerca de la aparición de brotes epidémicos, y desde entonces, se ha observado que éstos aumentaron (Tabla II) (revisado en: Martínez-Marañón, 1985 y Alcántara y cols., 1992). Así, durante el periodo de 1981 a 1990 se notificó a la Dirección General de Epidemiología, que de 363 brotes de enfermedades que ocurren en la República Mexicana cuya transmisión tiene una relación directa con el agua o los alimentos, la triquinosis humana ocupa el quinto lugar (Nakamura-López, 1991). Las zonas endémicas reconocidas en nuestro país son Chihuahua, Estado de México, Jalisco y Zacatecas (Figura 2). Sin embargo, se cree que es un padecimiento distribuido ampliamente en el resto del país, debido a que el consumo de carne de cerdo es general, las condiciones de su crianza son deficientes y la matanza

clandestina se da con mucha frecuencia (Aluja, 1982). Además, Martínez-Marañón en 1983 señaló que la prevalencia de esta parasitosis en el país probablemente es más elevada de lo que se piensa, pero que no ha establecido con precisión debido a que "no se incluye como posibilidad diagnóstica entre los cuadros febriles agudos". Por otro lado, no hay que descartar la posibilidad de que exista transmisión por la ingesta de otras especies silvestres de mamíferos (Campbell, 1983a).

Tabla I. Estudios sobre la frecuencia de *T. spiralis* en series de autopsias de 1939 a 1974.

Año	# de muestras	# de individuos infectados (%)	Tasa hombre/mujer	Rango de Edad	Referencia
1939	200	25 (12.5)	7.5/5.0	19-87	Perrin, 1939
1943	600	30 (5.0)	ND	ND	Mazzotti y Chavira, 1943
1944	400	46 (11.5)	ND	ND	Mazzotti, 1944
1974	1000	42 (4.2)	2.8/10.0	10->70	Martinez-Marañón, 1974

ND: No determinado. (Tomado de Correa y cols.) (en prensa)

Tabla II.- Brotes oficialmente reportados en México de 1978 a 1995.

Periodo	# de brotes	# Total de individuos	# de Casos clínicos	Diagnóstico serológico (%)	Casos confirmados (%)	Radio Hombre/ Mujer	Rango de Edad
1978-1980	1	7	4	ND	25%	1.00	niños y adultos
1981-1985	8	96	96	ND	25%	1.19	15-44
1986-1990	9	250	250	100% (realizado en 1 brote)	100% (realizado en 3 brotes)	0.86	<14-44
1991-1995	7	282	175	27% (realizado en 3 brotes)	47% (realizado en 4 brotes)	0.52	<9-44

ND: No determinado. (Tomado de Correa y cols.) (en prensa)



Figura 1. Distribución de la triquinelosis humana en México. En el mapa se muestran los Estados en los que se han reportado oficialmente (en negro) y no oficialmente (en líneas transversales) casos y brotes de triquinelosis de 1938 a 1995. Los Estados en donde hay más reportes sobre esta parasitosis están en negro e incluyen a Chihuahua, Estado de México, Jalisco y Zacatecas. Los estados con líneas transversales incluyen Durango, Distrito Federal, San Luis Potosí, Michoacán y Chiapas (Tomado de Correa y cols.) (en prensa).

2. Biología.

El nemátodo *T. spiralis* se describió por Owen en 1835 (Campbell, 1983b). Este organismo vive como parásito intracelular, excepto cuando migra por vía sanguínea y linfática como larva recién nacida. También se consideró como el único parásito helminto en el que todos sus estadios de desarrollo ocurren en un solo huésped y uno de los parásitos menos específico por su huésped en la naturaleza, ya que la mayoría de los mamíferos y algunas aves son susceptibles a él (Zimmermann, 1970).

Existen 7 grupos genéticos de *Trichinella* spp. distribuidos en zonas árticas y templadas del mundo, de los cuales 4 infectan al hombre y uno de éstos, sólo parasita al cerdo doméstico (Poizio y cols., 1989). Por otro lado, se reportó que existen más de 100 especies de mamíferos silvestres infectados en la naturaleza. Entre estos animales, el parásito circula intra e interespecíficamente por necrofagia y por depredación, desarrollando el ciclo básico en la naturaleza llamado "ciclo silvestre" (Figura 3). Habitualmente el hombre adquiere el helminto por vía indirecta a través del cerdo que se puede infectar con restos de estos animales ("ciclo doméstico") (Figura 4). El estado infectivo es la larva muscular enquistada (L₁) la cual puede permanecer viable en los músculos del huésped por años, lo cual permite su transmisión (Campbell, 1983).

2.1. Morfología.

Trichinella spiralis pasa por cambios morfológicos durante su ciclo de vida, los cuales permiten distinguir 5 estadios de desarrollo; pero únicamente 3 de éstos se pueden obtener con mayor facilidad de animales infectados. Dichos estadios son: el adulto, la larva muscular L₁ (LM) y la larva recién nacida (LRN). Estos organismos son dióicos, redondos, largos, no segmentados y su cuerpo está cubierto por una cutícula que se origina a partir de los productos de secreción de una capa celular ó sincicial subyacente denominada epidermis. La cutícula esta compuesta por tres capas de colágena; por encima de ésta, se encuentra la epicutícula, (distinta de una membrana celular) y a su vez encima de ésta se encuentra una capa adicional o cubierta de la superficie constituida por carbohidratos presente en la LRN y en los adultos. En la LM en lugar de esta capa adicional, se encuentra una capa accesoria trilaminada que se desarrolla durante su crecimiento en la célula nodriza. El empleo de ensayos de citolocalización demostraron que las moléculas antigénicas se localizan en la superficie de la cubierta y en la capa accesoria (Wright, 1987; Wright y Hong, 1988).

Los adultos tienen la parte posterior del cuerpo ligeramente más ancho que la parte anterior; los machos miden de 1.4 a 1.6 mm de largo por 40 µm de diámetro y presentan en el extremo posterior dos apéndices caudales lobulados. Las hembras presentan el extremo posterior romo y redondeado, y miden de 3 a 4 mm de longitud por 6 µm de diámetro. La larva muscular L₁ mide 400 µm por 260 µm y es sexualmente diferenciada y la LRN que es el estadio más pequeño y menos diferenciado, mide 100 µm de largo y 6 µm de diámetro (Figura 5) (Despommier, 1983).

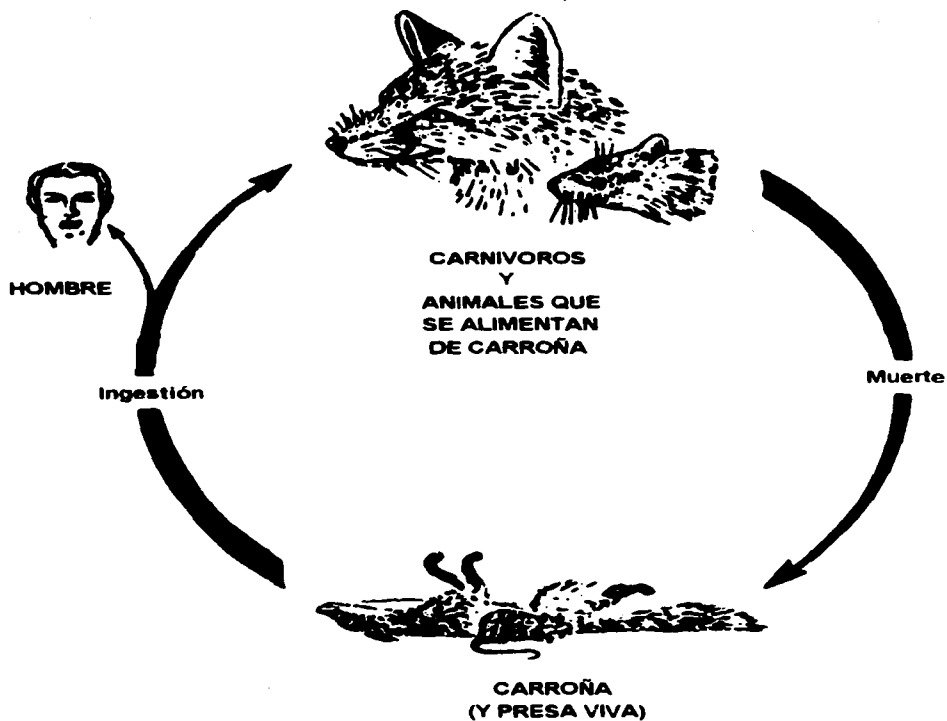


Figura 3. El ciclo silvestre representa la transmisión de la triquinosis en la naturaleza, independientemente del hombre. (Tomado de Campbell, 1983)

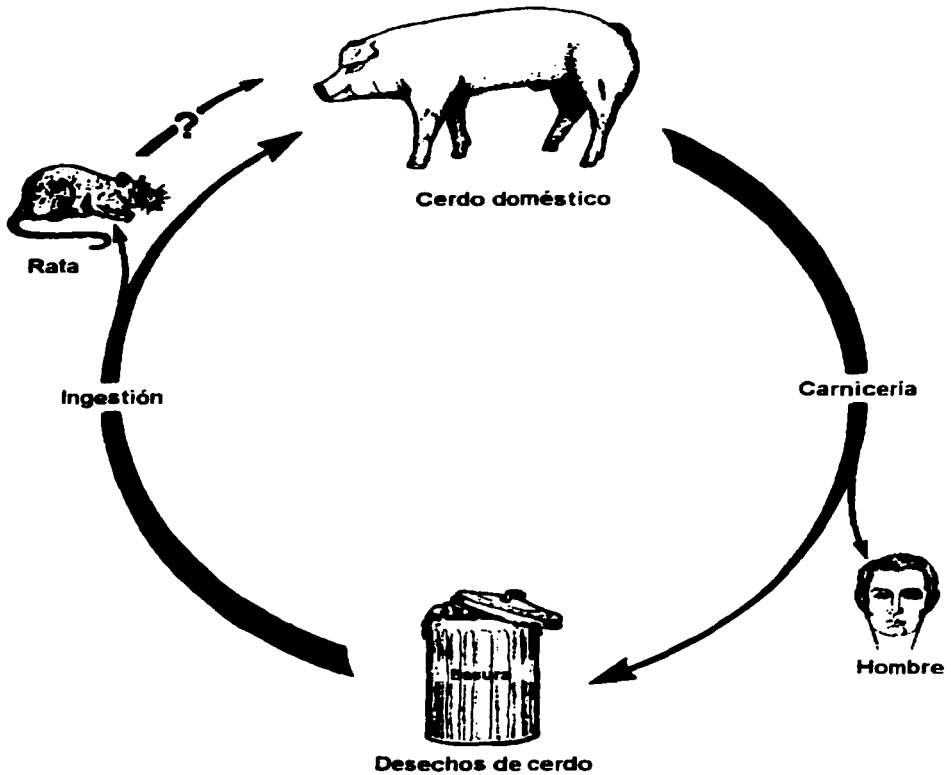


Figura 4. El ciclo doméstico, es la fuente predominante de la triquinelosis. El hombre no es elemento que participa en este ciclo, ya que es accidentalmente como se infecta; mientras que la rata puede ser un componente o no. (Tomado de Campbell, 1983)

Estos nemátodos presentan una cavidad en la que pueden encontrarse diversas estructuras que se organizan para funcionar como aparatos y sistemas (Levine, 1980).

El aparato reproductor del macho consta de un testículo (posee espermatozoides no flagelados), el vaso deferente, la vesícula seminal y el conducto eyaculador rodeado por la glándula prostática que termina en la cloaca, y como se mencionó anteriormente, presenta en el extremo caudal el órgano copulatorio y un apéndice que permite la copulación. El aparato reproductor de la hembra también es tubular y consta de un solo ovario localizado en la parte posterior y produce óvulos de ± 25 mm de diámetro; de un oviducto y un útero provisto de epitelio, vagina, ovoeyector y una vulva cerca del esticosoma. El útero abarca dos tercios de la longitud del parásito y en su interior se observan huevos en diferentes etapas de diferenciación y LRN.

El sistema nervioso está formado por ganglios que se conectan a la altura del esófago formando un anillo nervioso del que derivan troncos nerviosos que se ramifican y enervan los órganos y tejidos del cuerpo, así como papilas y células nerviosas que se pueden encontrar localizadas en el esófago y en algunos ganglios.

El tubo digestivo es largo y recto. El extremo anterior empieza en la boca y el extremo posterior termina en el ano. Se diferencia en esticosoma (glándula esofágica), esófago, válvula esófago-intestinal, el intestino y el recto (en la hembra) o la cloaca (en el macho) que terminan en el ano. El esticosoma presente en la larva muscular y en los adultos, está constituido por los esticocitos, que se acomodan en forma de hilera alrededor del esófago, los cuales presentan abundantes gránulos altamente antigénicos en el citoplasma y un árbol canalicular que conecta al esticosoma con el esófago, por donde son secretados hacia la luz del esófago (Despommier, 1977). La LM presenta dos tipos de gránulos en el citoplasma de los esticocitos, a los que denominaron α y β por sus diferencias morfológicas y su distribución, porque difieren antigénicamente y porque ambos tipos de gránulos contienen antígenos que están presentes en los productos de excreción y secreción (Despommier y Müller, 1976). Los adultos, presentan también dos clases de gránulos denominados I y II, cuya composición química es distinta de la de los gránulos α y β de la LM. Sin embargo, los gránulos tipo I y los gránulos β de la LM podrían estar relacionados antigénicamente (Takahashi y cols., 1992).

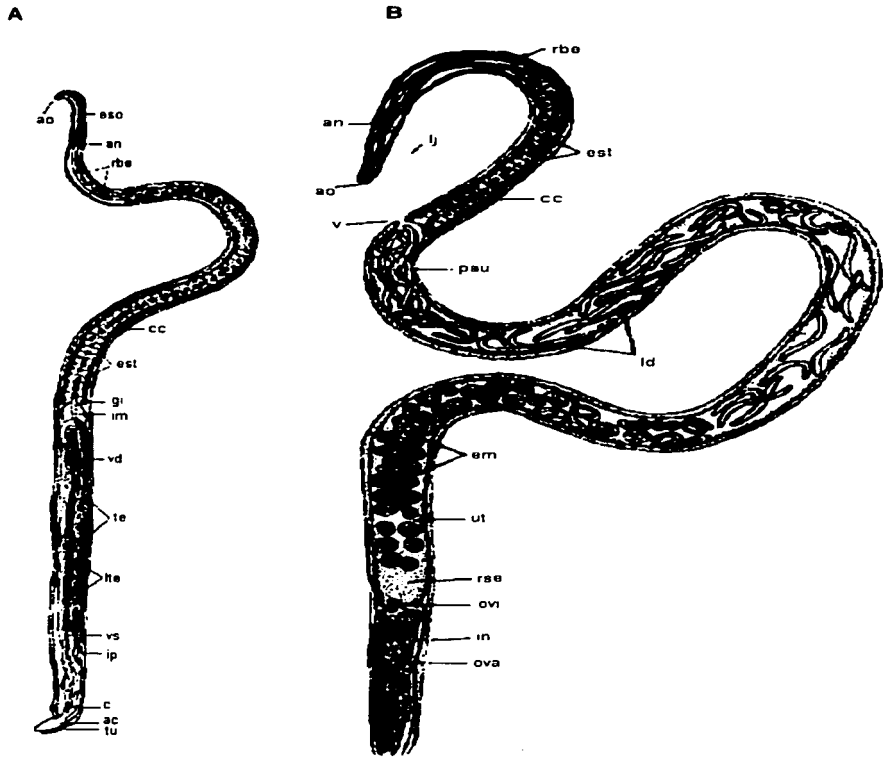


Figura 5. (A) Diagrama del macho adulto, (B) de la hembra adulto de *T. spiralis*. (ao) abertura oral; (eso) esófago; (an) anillo nervioso; (rbe) región bulbar del esófago; (cc) cuerpo celular; (est) esticocitos; (gi) glándula intestinal; (im) intestino medio; (vd) vaso deferente; (te) testículo; (lte) lumen del testículo con esperma; (vs) vesícula seminal; (ip) intestino posterior; (cl) cloaca; (ac) apéndice copulatorio; (tu) tubérculos; (lj) larva joven; (pau) parte anterior del útero; (ld) larvas desarrolladas; (em) embriones; (ut) útero; (rse) receptáculo seminal con esperma; (ovi) oviducto; (in) intestino; (ova) ovario (Tomado de Campbell, 1983).

C

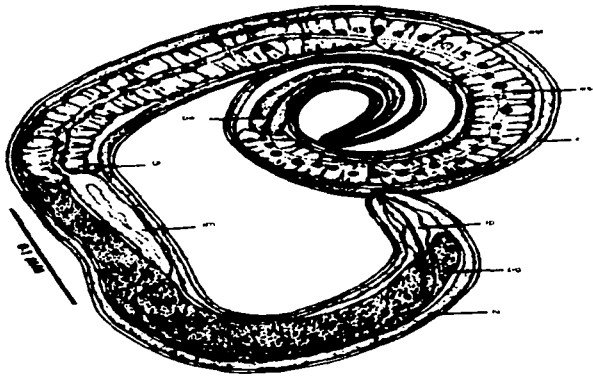


Figura 5. Continuación. (C) Diagrama de la larva infectiva L₁ de *T. spiralis*. (c) cutícula; (eso) esófago; (est) esticocitos; (be) bulbo del esófago; (gi) glándula intestinal; (im) intestino medio; (pg) primordio genital; (hi) hipodermis; (ip) intestino posterior (Tomado de Campbell, 1983)

El esófago está formado por una sola capa de células a manera de epitelio y está dividido en esófago anterior, medio y posterior con base en la composición del citoplasma de las células epiteliales. El esófago medio y anterior, está rodeado por el esticosoma. El intestino se divide en medio y posterior. El primero está compuesto por una sola capa de células a manera de epitelio, que contienen en su citoplasma gránulos, mitocondrias, retículo endoplásmico y múltiples proyecciones citoplásmicas o microvellosidades que por su morfología probablemente funcionan para absorber o para secretar.

El sistema muscular está formado por los músculos somáticos y los músculos especializados. Los primeros tienen una posición adyacente a la epidermis y el parásito los utiliza para la locomoción del cuerpo y los especializados realizan movimientos específicos de acuerdo a su localización.

2.2. Ciclo de vida.

El ciclo de vida de *T. spiralis* presenta dos fases: la enteral que incluye 4 estadios larvarios y el adulto; y la parenteral, que incluye la larva recién nacida y la larva infectiva L₁.

Fase Enteral

El hospedero se infecta cuando ingiere carne cruda o mal cocida contaminada con las larvas infectivas L₁ (Despommier, 1983). Al pasar por el estómago, las larvas son liberadas del músculo gracias a la acción de los jugos gástricos, sin tener cambios morfológicos. Posteriormente éstas migran durante aproximadamente 10 minutos, e invaden el epitelio columnar y la lámina propia del intestino delgado, normalmente el duodeno, aunque pueden invadir cualquier parte de dicho órgano (Dick y Silver, 1980). En este nicho intramulticelular, la larva L₁ pasa por 4 mudas en aproximadamente 36 h y se convierte en un gusano adulto (Figura 6). Durante este tiempo, la larva pasa por una morfogénesis extensa, remodelando la cutícula, las células glandulares hipodérmicas, los músculos, el sistema nervioso, el primordio genital, el tubo digestivo y el esticosoma. Dentro de los 5 días postinfección, la hembra ocupa alrededor de 140 a 152 células como hábitat y el macho ocupa de 140 a 152 células. Cuando alcanzan la madurez sexual ocurre la copulación (entre 37 y 40 h); los machos posteriormente mueren y las hembras aumentan de tamaño penetrando más profundamente en la mucosa intestinal, llegando incluso al peritoneo o penetrando en los ganglios linfáticos mesentéricos. Después de la fertilización, la hembra comienza a parir larvas recién nacidas del 4º al 7º día postinfección; el macho muere, y es expelido del intestino. La producción de larvas dura de 4 a 16 semanas o más dependiendo de la especie del hospedero.

Fase Parenteral

La larva recién nacida (LRN) (100 µm x 6 µm) penetra en la lámina propia y entra a la circulación arterial vía el ducto torácico; puede invadir otros tejidos, sin embargo únicamente sobrevive en las células del músculo esquelético (diafragma, laringe, lengua, intercostales, bíceps, pectorales, etc.) (Olsen y cols., 1964).



Figura 4. Micrografía de microscopía electrónica de barrido. Adulto de *T. spiralis* que aparentemente emerge de una célula y entra a otra (Tomado de Campbell, 1983)

La invasión de la célula muscular, que probablemente ocurre por medio de un proceso mecánico (presencia de un estilete) (Despommier, 1983), induce cambios que dan como resultado la formación de una nueva unidad hospedera llamada "célula nodriza", de la cual obtiene nutrientes para el crecimiento larvario, desarrollo y homeostasis durante la fase muscular y exporta desechos. En este período, la larva comienza a enrollarse y la célula nodriza completa la formación del quiste alrededor de la larva del día 17 al 21 después de la infección. Pasa por un desarrollo postembrionario creciendo exponencialmente y desarrollándose sin mudas, la máxima diferenciación se alcanza entre los días 4 y 20 después de la penetración. En este período se desarrolla el esticosoma y los sexos ya se pueden diferenciar a pesar de que no se han

desarrollado completamente, dando como resultado a la larva madura (L₁) que ha crecido de aproximadamente 83 a 900 µm de largo y que es infectiva para los mamíferos si se consume carne cruda o mal cocida. Los cambios del músculo de mamífero se han documentado a nivel morfológico, ultraestructural y bioquímico. Morfológicamente, la célula infectada pierde la apariencia estriada característica de una célula muscular esquelética, con disminución de estriaciones. Ultraestructuralmente, hay una disolución y pérdida completa de miofibrillas, aumenta el número de organelos, incluyendo el retículo endoplásmico liso y rugoso, las mitocondrias que aparecen vacuoladas, el núcleo que se hipertrofia y se desplaza, y los lisosomas, y producción de una cápsula que envuelve el complejo célula hospedera/larva. Bioquímicamente, los niveles de mioglobina, creatina, fosfocreatina, fotocreatina y ATP disminuyen de un 30-40% en las células infectadas, mientras que se incrementa la síntesis de DNA y RNA, de polirribosomas, y de proteínas; aumenta el contenido del glucógeno y la actividad de enzimas lisosomales (Stewart y Giannini, 1982; Jasmer, 1990). El complejo larva L₁-célula nodriza puede permanecer estable durante toda la vida del hospedero y no calcificarse (Despommier, 1983).

El ciclo se inicia nuevamente cuando la larva L₁ se transmite a otro hospedero de la misma ó de otra especie (Figura 7).

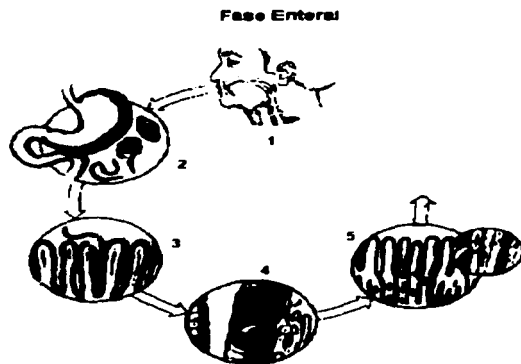
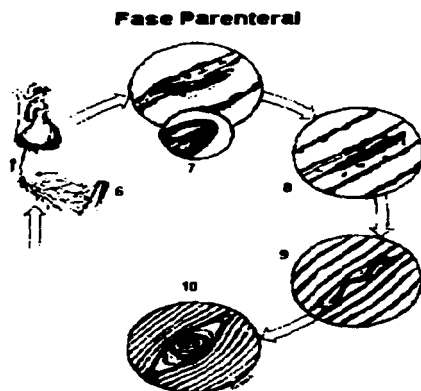
A**B**

Figura 7. Ciclo de vida de *T. spiralis*. (A) Fase enteral y (B) Fase parenteral. (Tomado de Campbell, 1983)

3. Respuesta Inmune.

Trichinella spiralis es un parásito que puede establecerse, desarrollarse y reproducirse en un amplio rango de huéspedes vertebrados (Despommier, 1983); lo que implica que este nemátodo tiene la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones ambientales y variados mecanismos de inmunidad. Debido a que presenta antígenos (ags) específicos en cada uno de sus estadios, constituye un estímulo antigénico complejo para el huésped. Así, durante la infección, el parásito provoca la estimulación de la respuesta inmunológica humoral y celular específica del huésped (Wakelin y Denham, 1983).

La respuesta inmunológica que desarrolla el huésped en contra de este parásito es timo-dependiente y el grado de resistencia provocada por la infección (en ratones) es influenciada por genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y por genes que se encuentran fuera del mismo (Grencis y cols., 1985; Wakelin y cols., 1985).

3.1. Respuesta humoral

Se ha observado que durante la infección los anticuerpos (acs) específicos presentes en suero pertenecen a las clases IgG, IgM, IgA y en pocos casos IgE; además de un nivel alto de IgE total (Au y cols., 1983; Van Knappen y cols., 1982b). A nivel intestinal se ha encontrado IgA específica, niveles altos de eosinófilos y de células cebadas de la mucosa intestinal (Kelly y cols., 1991).

La aparición de las subclases de IgG durante la infección, es en forma secuencial; primero la IgG1, después la IgG3 y finalmente la IgG4. La IgG1 está presente durante toda la infección y la IgG4 aumenta en la fase crónica de la enfermedad. Por otro lado, se ha sugerido que la producción de IgG4 se debe a una estimulación antigénica crónica o repetitiva y que los niveles totales de IgE aumentan únicamente en la etapa temprana (Ljungstrom y cols., 1988). La IgM y la IgG específicas aparecen entre la 4a y la 6a semana después de la infección y al parecer se pueden encontrar hasta después de nueve meses después de la infección (Dupouy-Camet y cols., 1988). La IgA específica aparece principalmente en el segundo mes y la IgE específica durante el cuarto mes (Dupouy-Camet y cols., 1988).

El perfil antigénico que reconocen los acs de todas las especies estudiadas (seres humanos, cerdos, conejos, ratas y ratones) es altamente homogéneo; estos organismos, reconocen principalmente ags de peso molecular intermedio, que al parecer corresponden a

ags de superficie-esticosoma, como lo demuestran los estudios realizados por varios autores quienes han empleado tanto acs policlonales como acs monoclonales, los cuales reconocen dicho perfil antigénico (Alcántara y Correa, 1993; Appleton y cols., 1988, 1991; Arriaga y cols., 1989; Denkers y cols., 1990a y b; Gamble, 1985a; Gold y cols., 1990; Ortega-Pierres y cols., 1984, 1989; Silberstein y Despommier, 1984; Van Knapen y cols., 1982a; Zhu y Bell, 1990a).

Por otro lado, se ha observado en ratones y seres humanos la aparición de complejos inmunes en suero, debido a la presencia de acs específicos así como de ags secretados por la larva infectiva L₁ por periodos largos. Golinska y cols., en 1986, detectaron complejos ag-ac en la quinta semana después de la infección en ratones de la cepa CFW infectados con *T. spiralis*, y en pacientes con triquinosis clínica entre los días 30 y 40 después de la infección (Geniteau y cols., 1977).

3.2. Respuesta celular

La inducción eficiente de inmunidad mediada por células hacia este nemátodo intracelular es crucial en el desarrollo de la resistencia del huésped. En la triquinosis experimental (en el ratón), el estudio de la respuesta celular se ha enfocado principalmente hacia los estadios de la fase entérica, debido a que el intestino delgado es el primer sitio de contacto con el parásito. La expresión de esta respuesta se caracteriza por la expulsión acelerada de los parásitos adultos o preadultos, por la disminución de la fecundidad de la hembra, por la prevención del crecimiento de los estadios entéricos y por el bloqueo de la LRN para sobrevivir y establecerse en el tejido muscular (Despommier y cols., 1977; Wakelin y Wilson, 1980).

El papel preciso de los linfocitos T (LT) en la inmunidad hacia *T. spiralis* no está completamente definido. Sin embargo existen evidencias, en el ratón y la rata, que sugieren que los LT CD4⁺ generados en los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) median la inmunidad protectora hacia este parásito (Grencis y cols., 1985; Riedlinger y cols., 1986; Korenaga y cols., 1989).

Después de la infección con *T. spiralis*, las células linfoides del huésped responden a los ags del parásito *in vitro* y se ha mostrado que las células del bazo, de los GLM ó los linfocitos intraepiteliales de ratones infectados, secretan IL-2, bajo reestimulación por ags específicos. Además, se ha observado que la producción de IL-2 *in vitro*, varía entre cepas de ratones con fenotipos diferentes para la expulsión del parásito (buenos respondedores,

medianamente respondedores y bajos respondedores), la cual al parecer no se relaciona directamente con el haplotipo de H-2 ni con el fenotipo de expulsión del parásito de una cepa individual, sugiriendo que los genes que regulan la producción de IL-2 no se relacionan con aquellos que regulan la expulsión del parásito adulto (Zhu y Bell, 1989; 1990b).

Al responder a los ags parasitarios, los LT proliferan (Grencis y cols., 1987) y migran (Riedlinger y cols., 1986) al tejido intestinal donde regulan los cambios inflamatorios responsables de la expulsión de los parásitos adultos o preadultos del intestino vía la liberación de citocinas (Grencis y cols., 1985; Wakelin y Denham 1983).

Pond y cols., en 1989, estudiaron la producción de citocinas por LT de GLM en dos cepas de ratones H-2 compatibles que diferían en el fenotipo de expulsión después de la infección con *T. spiralis* y sugirieron que la expulsión rápida de los parásitos estaba asociada con una respuesta de tipo Th₁, predominante y la expulsión más lenta con una respuesta de tipo Th₂. Tres años más tarde, los mismos autores (Pond y cols., 1992) correlacionaron el fenotipo de expulsión de los parásitos con el tipo de LT producidos, ya que encontraron que la resistencia a la infección parece estar asociada con la producción incrementada de LTh₁ (entre el día 3 y el 6 postinfección), mientras que la susceptibilidad parece estar asociada con la producción de LTh₂ (entre el día 6 y el 9 postinfección). También encontraron que el microambiente del órgano linfóide y la IL-1 α tienen influencia sobre la activación de LTh₁, productores de IFN- γ .

Grencis y cols., en 1991 encontraron resultados opuestos al estimular *in vitro* LT de GLM de dos cepas de ratones infectados con *T. spiralis* H2-compatibles (con el fenotipo de rápidos y lentos respondedores) con una preparación de ag protector del parásito. Estos autores observaron que los niveles de IL-3, IL-4, IL-5 e IL-9 se encontraban elevados, en comparación con los testigos; mientras que los niveles de IFN- γ eran bajos. Por otro lado, no encontraron relación entre la cantidad de citocinas secretadas y las diferencias en la velocidad de expulsión del parásito en las dos cepas estudiadas. Estos resultados, apoyan la hipótesis de que la inmunidad protectora a la infección con *T. spiralis*, está asociada con la activación de LTh₂ dentro de los GLM en ausencia relativa de LTh₁. La predominancia de citocinas producidas por LTh₂ correlaciona bien con los cambios mediados por inmunidad que ocurren en el intestino, como la mastocitosis controlada por la IL-3, IL-4, IL-9 e IL-10, eosinofilia en sangre por IL-5, y niveles altos de IgE en suero por IL-4 (Dillon y Macdonald, 1986).

Kelly y cols., en 1991, mostraron después, que las respuestas Th₁ y Th₂ pueden ocurrir al mismo tiempo pero en diferentes órganos linfoides, es decir que existe una compartimentalización anatómica de los LT respondedores a los ags del parásito y que por tanto, también, el microambiente del órgano linfoide puede influir sobre la secreción de citocinas. Los LTh₁ productores de IFN- γ e IL-2 predominan en el bazo, mientras que los LTh₂ productores de IL-4 e IL-5 predominan en los GLM.

Goyal y Wakelin en 1993 estudiando las respuestas tempranas de IgG a la infección con tres aislados de *T. spiralis*, encontraron los isotipos IgG1 (dependiente de LTh₂) e IgG2a (dependiente de LTh₁), sugiriendo de nuevo que los LTh₁ y LTh₂ se encontraban funcionalmente activos.

Por otro lado, Goyal y cols., en 1994, sugirieron que el nivel de activación de cada subpoblación de Th está influido también por las características antigénicas de cada aislado. Estos autores estudiaron la respuesta proliferativa y la producción de citocinas *in vitro* de LT de GLM de ratones NIH infectados con diferentes aislados de *T. spiralis* hacia ags homólogos ó heterólogos y encontraron que había una reactividad cruzada considerable, aunque variable, entre los ags de los aislados y que existían diferencias en los niveles de producción de citocinas entre las células tomadas de los ratones infectados con los diferentes aislados. También observaron la activación secuencial de LTh₁ (día 2 al 6 postinfección) y LTh₂ (día 6 al 8 postinfección) durante la infección con los aislados.

Se ha sugerido que los resultados que han reportado los autores mencionados (aparentemente contradictorios), podrían estar relacionados con diversas variables experimentales, entre ellas, el empleo de diferentes cepas de ratón y probablemente al aislado de *T. spiralis* utilizado en los estudios (Wakelin, 1993; Pozio y Bruchi, 1994). No obstante, una serie de estudios apoyan los resultados de Grecnis y cols., (1991). Por ejemplo, se ha encontrado que la expulsión de otros nemátodos intestinales como *Trichuris muris*, *Nippostrongylus brasiliensis* y *Heligmosomoides polygyrus*, está asociada a una respuesta LTh₂ (Street y cols., 1990; Else y Grecnis, 1991; Else y cols., 1992). En otros estudios, se ha observado que cuando se tratan ratones BALB/c con rIFN- γ o cuando se mantienen ratones B10.BR (susceptibles) deficientes en vitamina A, se genera tanto en bazo como en GLM de estos animales una respuesta LTh₁ que no los hace resistentes a la infección (Neifer y cols., 1991; Carman y cols., 1992).

3.3. Protección

Durante el curso de la infección, se desarrolla una amplia variedad de respuestas inmunológicas. Sin embargo, los mecanismos efectores de inmunidad no están completamente entendidos (Silberstein y Despommier, 1984). Los estudios sobre protección se han realizado principalmente en ratas y ratones a nivel experimental. En una infección primaria, los animales infectados con *T. spiralis*, montan una fuerte respuesta inmune protectora en contra de una reinfección con la larva muscular, expresada en el fenómeno de expulsión rápida donde el hospedero elimina a los adultos o preadultos del intestino (Grencis y cols., 1985; 1987; Riedlinger y cols., 1986; Wakelin y Denham, 1983; Zhu y Bell, 1989); aunque antes de ésta ocurren otras manifestaciones de inmunidad. Estas incluyen la reducción de la fecundidad en las hembras adultas, el desarrollo de cambios citopatológicos en los gusanos adultos y la redistribución de la población de parásitos dentro del intestino de animales infectados, etc. A pesar de que el mecanismo exacto que lleva a la expulsión de los gusanos no ha sido completamente dilucidado, ésta se ha asociado con una respuesta inflamatoria que se desarrolla durante la fase inicial de la infección; teniendo como componente principal a una población de células cebadas funcionalmente activa durante la expulsión (Ortega-Pierres y cols, 1987; Gamble, 1985b).

Los primeros estudios sobre protección fueron realizados mediante la transferencia pasiva de linfocitos B (LB) y/o LT específicos. En una infección primaria, los LT son capaces de transferir inmunidad. Se ha visto que la transferencia de al menos 3×10^6 LT produce protección en animales a los que se les dio una infección de reto (Despommier, 1977).

Aunque los LT son los que principalmente se encuentran involucrados en la protección, se ha visto que algunas fracciones enriquecidas con LB son capaces de transferir inmunidad, la cual se refleja en la disminución de la fecundidad de la hembra (Crum y cols., 1977; Despommier, 1977; Grecnis y Wakelin, 1982; Larsh y cols., 1964; Love y cols., 1976; Wakelin y Wilson, 1977; Wakelin y cols., 1982).

Se ha sugerido también que la inmunidad mediada por acs tiene un papel importante en la protección en contra *T. spiralis*, ya que se ha observado que la transferencia de suero inmune, de suero y células inmunes y células solas, provee protección, (al menos en parte) dependiente de acs, (Silberstein y Despommier, 1984). La respuesta humoral que monta el huésped, es marcadamente estadio-específica. Así pues se ha observado que las respuestas de acs anti-adultos contribuye a la reducción de la fecundidad de las hembras y de manera indirecta también sugiere que esta respuesta juega un papel importante en la

expulsión de los parásitos adultos. En el caso de las LRN que se encuentran migrando, se ha demostrado que el suero inmune de ratones infectados es capaz de inducir protección cuando se transfiere pasivamente a animales sanos antes del reto con LRN migrantes (Ortega-Pierres y cols., 1987).

Para tener un panorama más completo de como realmente esta participando la inmunidad celular y humoral, se hace necesario el estudio e identificación más precisa de las subclases de acs y las subclases de células linfoides involucradas directamente en la resistencia, ó de moléculas del parásito que sean blancos de la respuesta protectora.

Un aspecto relevante en el estudio de la inmunidad protectora hacia *T. spiralis*, es la caracterización de ags que inducen protección. Los estudios de protección dirigidos a vacunar contra *T. spiralis*, datan de los años 50's, donde se usaron como ags, extractos crudos provenientes de la larva muscular. El desarrollo de más técnicas para la purificación de ags ha permitido la identificación más precisa de moléculas responsables de una actividad protectora.

A través de los años, varios grupos han abordado el estudio de la protección, empleando varias metodologías que incluyen entre otras, técnicas de radiomarcaje, cromatografía por filtración en gel y de intercambio iónico y cromatografía de afinidad, técnicas de biología molecular, etc. Estos estudios, se han enfocado a caracterizar ags cuticulares ó de superficie, somáticos y de secreción-excreción de los diferentes estadios del ciclo de vida del parásito que confieran protección a infecciones de reto (Despommier y Müller, 1970; Despommier, 1981).

Los ags de la larva muscular L₁ son los más empleados en estos ensayos debido probablemente a la facilidad de obtener un gran número de parásitos y a que este estadio es el más inmunogénico (Bell y cols., 1979; Silberstein, 1983).

Las técnicas de radiomarcaje han mostrado que los componentes cuticulares accesibles a la iodinación para cada estadio del parásito son muy pocos, de 1 a 5. Estos ags generalmente son glicosilados y diferentes para cada estadio. Los componentes de superficie purificados de la larva infectiva L₁ son capaces de inducir protección en ratones, ya que el establecimiento de las larvas musculares se reduce hasta en un 65%, debido en parte a la expulsión acelerada de los gusanos adultos del intestino (reducción en el número de adultos recuperados de un 82%) (Grencis y cols., 1986; Ortega-Pierres y cols., 1987, 1989; Gamble, 1985a, 1985b).

Los ags aislados del esticosoma de la larva infectiva por medios bioquímicos, a través del uso de columnas de afinidad que emplean acs monoclonales ó ags recombinantes también han mostrado conferir protección después de una infección de reto. Se ha observado que los ags de excreción-secreción de 48 y 50/55 kDa son predominantemente responsables de la inducción de inmunidad en ensayos de protección, ya que son capaces de provocar una reducción significativa en la fecundidad de las hembras; la expulsión acelerada de los adultos (más del 90% son expulsados del día 8 al 10 postinfección) y una reducción en el establecimiento de las L₁ (de un 60 a un 80% de reducción) (Silbersein y Despommier, 1984; Gamble, 1985a, 1985b, Su y cols., 1991).

Como se ha observado, los efectos de la respuesta inmune aparentemente se ejercen sobre los adultos; sin embargo, estos ags (48 y 50/55) se expresan únicamente en las larvas en desarrollo. Esto sugiere que los mecanismos efectores inmunes actúan sobre las larvas intestinales, de tal manera que estas se convierten en adultos defectuosos (Gamble, 1985b; Silbersein y Despommier, 1984; 1985).

La respuesta inmune generada hacia la infección con *T. spiralis* varía considerablemente, en la resistencia y en el fenómeno inmunológico y patológico que le acompañan, entre cepas puras y entre individuos de cepas no puras de ratones, por lo que se ha sugerido que está influida fuertemente no sólo por la estadio-especificidad de los ags presentados al huésped a la vez, sino también por el fondo genético del huésped. Algunos estudios con diferentes cepas de ratones, han mostrado que tanto los genes ligados al MHC (H-2) como otros no ligados, pueden influir en el desarrollo de la inmunidad protectora hacia *Trichinella* (Wakelin, 1978, 1980, 1983; Wakelin y Lloyd, 1976).

Algunos estudios en ratones de cepas puras mostraron que los genes localizados dentro del H-2 regulan la respuesta y reconocimiento inmunológico a ags liberados por los parásitos, mientras que los genes no ligados al H-2 parecen afectar principalmente el comportamiento de las células mieloides que contribuyen a la inflamación intestinal por medio de la cual se remueve a los parásitos del intestino (Wassom y cols., 1984).

Se ha propuesto en estudios experimentales con ratones de cepas puras, que dos genes denominados Ts-1 y Ts-2 determinan la resistencia o susceptibilidad a la infección. El gen Ts-1 se encuentra localizado en la región I-A beta y el gen Ts-2 entre la región S y D del MHC (Wassom y cols., 1983); mientras que la expulsión rápida está controlada por un gen dominante y autosómico denominado Ihe-1 localizado fuera del MHC (Bell y cols., 1984). Se ha pensado en la posibilidad de que estos genes podrían estar regulando la

respuesta en forma coordinada o independiente a nivel de reconocimiento y presentación antigénica y regulando la respuesta de los precursores de las células que participan en la reacción inflamatoria hacia los estímulos producidos por LT. Sin embargo, aun se desconocen el/los mecanismo(s) a través de(los) cual(es), estos genes controlan la respuesta inmune protectora (Alizadeh y Wakelin, 1982; Wassom y cols., 1984)

A pesar de que se han empleado extractos crudos y ags de excreción-secreción y de superficie de la larva infectiva purificados, se ha observado que únicamente inducen una protección parcial (Silberstein y Despommier, 1984). Esto puede deberse sin duda a que el fenómeno de protección, muy probablemente, es el resultado de la inducción de respuestas inmunes múltiples y mecanismos efectores que están bajo el control de genes ligados al H-2 y genes no relacionados (Ortega-Pierres y cols., 1987). Como puede observarse, el estudio de la protección contra *T. spiralis*, con fines de obtener una vacuna resulta complejo, por lo que si se emplean los ags que son potencialmente protectores en el desarrollo de vacunas polivalentes, éstos podrían ser útiles para la prevención de la infección, la transmisión ó la enfermedad.

4. Procesamiento y presentación de antígenos.

4.1. Células presentadoras de antígeno.

Para la activación eficiente de una respuesta inmune celular contra un ag exógeno, los LT deben reconocer el ag asociado a una glicoproteína clase II del MHC en la superficie de las células presentadoras de antígenos (CPAs) (Michalek y cols., 1989).

Originalmente, se pensaba que los LT y LB mediaban la mayoría de las respuestas inmunes. Actualmente, se conoce que la cooperación de otros tipos celulares diferentes, son importantes en la generación de una respuesta inmune efectiva (Davidson y Watts, 1989). A este grupo de células se les conoce como "células accesorias" ó CPAs, las cuales contribuyen de manera importante al proceso de reconocimiento del ag por los LT y la activación de estas células (Rosenwasser y Gurka, 1987). Las CPAs son capaces de endocitar ag con ó sin ayuda de receptores Fc y presentar ags a los LT en el contexto de moléculas clase I ó clase II de MHC (Stewart y cols., 1994).

La mayoría de las células del cuerpo expresan moléculas clase I y por lo tanto, pueden funcionar como CPAs para los LT restringidos por moléculas clase I. Este fenómeno resulta ser de suma importancia, ya que el papel principal de los LT restringidos por moléculas clase I, está en el reconocimiento y destrucción de células infectadas por virus,

células transformadas o células anormales. Sin embargo, el término CPA normalmente se refiere a un grupo más limitado de células capaces de presentar ag en asociación con moléculas clase II. Los tipos principales de CPAs conocidas como "profesionales" son los LB, los LT, las células de Langerhans, las células dendríticas, las células endoteliales, las células epiteliales, los fibroblastos y las células presentadoras por excelencia: los macrófagos (Mφs) (Male y cols., 1991; Rosenwasser y Gurka, 1987; Stewart y cols., 1994).

Los Mφs se distribuyen ampliamente en todo el cuerpo y presentan una gran heterogeneidad estructural y funcional. Se encuentran en órganos linfoides, hígado, pulmones, tracto gastrointestinal, sistema nervioso central, cavidades serosas, huesos y piel; por lo que frecuentemente son las primeras células del sistema inmune en encontrar a los patógenos invasores (Stewart y cols., 1994). Son células activamente fagocíticas que poseen un armamento de enzimas degradativas, por lo que son particularmente efectivas para procesar y presentar ags particulados, tales como bacterias y ciertos parásitos intracelulares (Male y cols., 1991). Así pues, estas células tienen como principal función, la de presentar ags (derivados de bacterias y parásitos) al resto del sistema inmune en asociación con moléculas clase II del MHC (Stewart y cols., 1994).

Los LB pueden reconocer ags solubles directamente, pero los LT requieren la presencia de una población de células accesorias para ser activadas por los ags. Los LT reconocen ags casi siempre de naturaleza proteica por medio de un receptor heterodimérico (TCR) expresado en su superficie (constituido por dos cadenas denominadas α y β). El receptor de estas células es incapaz de unirse directamente a un ag libre, únicamente lo reconoce asociado con moléculas propias del MHC (clase I o II) presentes sobre su superficie, lo que involucra la unión del ag procesado en una hendidura de la molécula del MHC. Los LT CD4⁺ reconocen al ag asociado a moléculas clase II, mientras que los LT CD8⁺ reconocen al ag asociado a moléculas clase I (Male y cols., 1991).

Diversos estudios han demostrado que las CPAs constituyen poblaciones heterogéneas que difieren entre sí en su capacidad para procesar y por tanto presentar ags y se ha mencionado que estas diferencias pueden deberse a la tasa de internalización del ag, a la presencia de señales coestimulatorias que podrían intervenir en este proceso, a la maquinaria proteolítica de cada CPA y al sitio de procesamiento del ag (McCoy y cols., 1993; Jacquier-Sarlin y cols., 1995; Lah y cols., 1995; Hockett y cols., 1996; Takahashi y cols., 1989).

Así, McCoy y cols. (1993), observaron que todas las CPAs empleadas para determinar su capacidad de procesamiento, internalizaban el ag a través de receptores para transferrina en 5 min; mientras que Jacquier-Sarlin y cols. (1995) encontraron que la unión no covalente de complejos toxoide tetánico-C3b al receptor del complemento C3b aumenta la internalización de este ag por la CPA por un lado, y la unión covalente de ag a C3b optimiza el procesamiento y presentación de éste.

Con respecto a la presencia de señales coestimulatorias, por ejemplo, existen evidencias de que ligandos como la IgG, la α 2-macroglobulina y los fragmentos C3 y C4, además de su papel establecido en la internalización y destino endosomal del ag, parece que influyen el procesamiento del ag y consecuentemente en la unión de los péptidos resultantes a las moléculas clase II antes de su presentación a los LT (Jacquier-Sarlin y cols., 1995). Por otro lado Lah y cols. (1995) reportaron que la exposición de líneas de monocitos de ratón y de humanos a interferón- γ (IFN- γ) causa además del aumento selectivo de la expresión de moléculas clase II, el aumento de la expresión de y actividades de las catepsinas B y L, sugiriendo que el IFN- γ regula la proteólisis necesaria para la digestión parcial de las proteínas endocitadas a los tipos de péptidos que pueden ser presentados en el contexto de moléculas clase II. Hockett y cols. (1996) encontraron que una línea celular de M ϕ s murinos (RAW:K) transfectada para expresar constitutivamente la molécula I-A^K era capaz de procesar el péptido 46-61 de la HEL, la RNAsa y hemoglobina pero no a la HEL intacta. Sin embargo, cuando se incubaron en presencia de IFN- γ , estas células si fueron capaces de procesarla. Estos resultados sugirieron la presencia de un defecto en el procesamiento de la HEL intacta, indicando que el IFN- γ había inducido la expresión de una proteína o grupo de proteínas involucradas en el procesamiento de ags.

Desde hace tiempo se ha reportado que las CPAs difieren en su maquinaria proteolítica y con el empleo de algunos inhibidores de enzimas se sabe que las cistein-proteasas (catepsinas B, H, L, J, S y N) y otras proteasas juegan un papel central en el procesamiento de muchos ags (Guidos y cols., 1984).

Takahashi y cols. (1989) estudiando el procesamiento de la mioglobina y utilizando un panel de 10 inhibidores de proteasas encontraron que solamente las tiol proteasas catepsinas B y L son necesarias para producir 3 diferentes epítopes que son presentados a los LT para originar una respuesta. En el mismo año, Walker tratando de investigar si la base del procesamiento y presentación diferencial de un ag por poblaciones clonadas de M ϕ s de bazo de ratón se debía a la síntesis de moléculas que pudieran interferir con la

actividad o de los LT o de las células indicadoras usadas para un bioensayo de IL-2, encontró que no había correlación entre la actividad de presentación de ag y la secreción de factores supresores y sugirió que las clonas difieren en la forma en la que procesan ag asociado a la membrana .

McCoy y cols. (1993), midiendo la tasa de aparición del ag (citocromo C-transferina) iodinado en el medio después de pulsar con éste a Mφs y fibroblastos transfectados que no inducen respuesta de LT específicos, encontraron que estas células presentaban heterogeneidad en el catabolismo del ag, ya que encontraron diferentes cantidades de éste degradado. Estos hallazgos los llevaron a sugerir que estas células no tienen las enzimas necesarias para procesar el citocromo C-transferina, en comparación con las CPAs que si inducen respuesta de LT hacia este ag.

4.2. Procesamiento de antígenos restringido por moléculas clase II.

Ziegler y Unanue en 1981, propusieron el término "procesamiento de ag" para definir las actividades que realiza una CPA para convertir una proteína nativa (mediante proteólisis) no estimuladora a una forma inmunogénica para que pueda ser reconocida por los LT (Michalek y cols., 1989) Ziegler y Unanue (1981), estudiando la presentación de *L. monocytogenes* a LT, encontraron que el procesamiento de ags requería de un periodo de 45-60 min (dependiendo de la concentración del ag y la temperatura) antes de ser presentados a los LT, cuando se le daba un pulso con ag a Mφs y se fijaban posteriormente con p-formaldehído. A este periodo de tiempo le denominaron tiempo de procesamiento, y propusieron que durante éste, el ag es endocitado por medio de pinocitosis si es soluble ó fagocitosis si se trata de un ag particulado; es llevado a los lisosomas, donde la mayor parte de las moléculas son degradadas hasta aminoácidos, y una pequeña porción es degradada parcialmente, generándose péptidos, que se reciclan a la membrana junto con la molécula del MHC adecuada para ser reconocidos por el TCR (Figura 6). Durante el trayecto hacia la membrana, cada péptido se une a una molécula del MHC y ambos son reconocidos por el TCR (Figura 7). De esta interacción, la CPA libera IL-1 y el LT libera IL-2, proliferando y produciendo además receptores para IL-2 (Unanue, 1984).

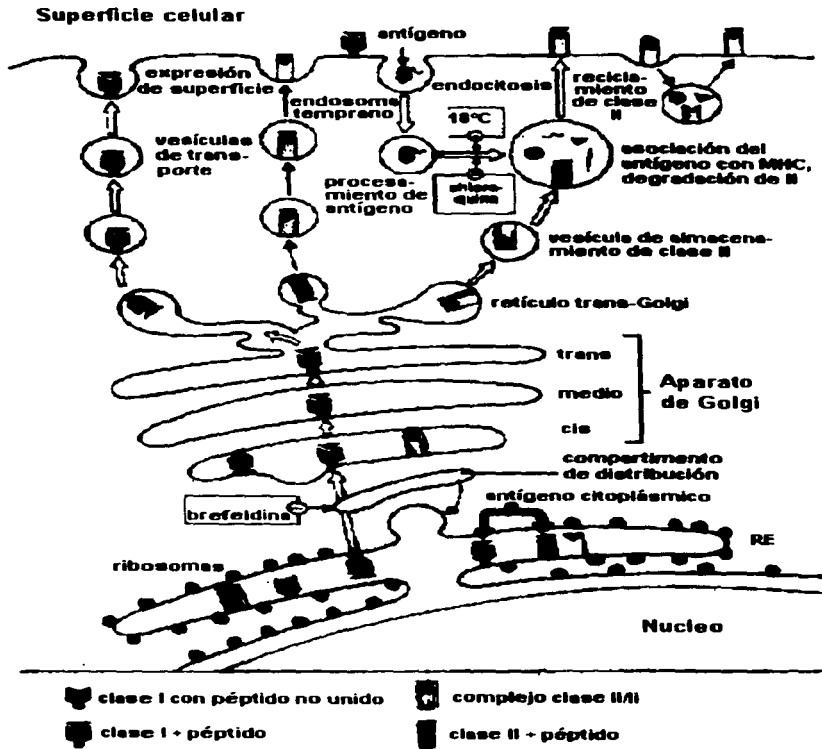


Figura 8. Principales rutas de tráfico intracelular de moléculas MHC involucradas en la presentación de antígenos. (Tomado de Male y cols., 1991)

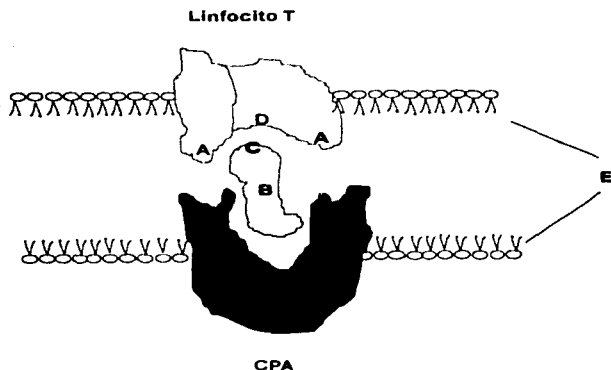


Figura 9. Reconocimiento e interacción entre el TCR y el complejo MHC II-Ag. (A). histotopo; (B). agretopo; (C). epitopo antigénico; (D). Paratopo y (E). Membranas plasmáticas. Receptor □; Péptido antigénico □ y Proteína del MHC ■

Estudios subsiguientes realizados por otros investigadores empleando otros sistemas, han obtenido resultados similares y se ha visto que el tiempo de procesamiento varía según el sistema (Scala y Oppenheim, 1983; Delovitch y cols., 1986; Lombardi y cols., 1987).

La primera evidencia directa de que la porción antigénica reconocida por los LT es un fragmento proteolítico del ag proviene de los estudios hechos por Shimonkevitz y cols. (1983). Estos autores trabajaron con hibridomas de LT específicos para ovalbúmina (OVA), las cuales reconocían a OVA cuando era presentada por CPAs sin fijar, sin embargo, cuando éstas se fijaban, los LT no respondían; y si usaban péptidos de OVA generados por digestión con tripsina o por corte con bromuro de cianógeno en residuos de metionina, la mayoría de los hibridomas respondían independientemente de si las CPAs se fijaban o no. Por otro lado, el uso de péptidos sintéticos ha demostrado que en general, son de 7-10 aminoácidos los que estimulan a los LT.

El estudio del efecto de agentes lisosomotrópicos ó inhibidores de proteasas específicas, ha dado evidencias directas que apoyan la idea de que la proteólisis de los ags

mediada por proteasas juega un papel importante en el procesamiento y por tanto en la presentación de ags (Scala y Oppenheim, 1983; Unanue, 1984; Allen y Unanue, 1984; Casten y cols., 1985; Kim y cols., 1985; Yoshikawa y cols., 1987; Lombardi y cols., 1987).

Así pues, con el empleo de algunos inhibidores de enzimas se sabe que las cistein-proteasas (catepsinas B, H, L, J, S y N) y otras proteasas juegan un papel central en el procesamiento de muchos ags. Se ha observado que cuando se tratan Mφs con cloroquina, monensina o NH₄Cl, antes del periodo de procesamiento, éstos son incapaces de presentar ags proteicos o bacterianos; mientras que cuando los Mφs se tratan después del periodo de procesamiento, éstos son capaces de presentar ags, permitiendo que el procesamiento ocurra (Guidos y cols., 1984).

Büüs y Werdelin (1986), utilizando un inhibidor de proteasas más específico, demostraron que las cistein-proteasas están involucradas en el procesamiento del ag sintético dinitrofenil pollisina (DNP-PLL). Cuando incubaban a las CPAs en presencia del inhibidor bencil-oxicarbonil-fenilalanil-alanina-diazometil-cetona (ZPADK), el procesamiento y presentación del DNP-PLL se inhibía marcadamente, pero aumentaba la del copolímero ácido glutámico-alanina (GA). De acuerdo con estos resultados, se sugirió que la inhibición de la presentación de ciertos epitopes podría deberse al corte hecho por una proteasa particular, lo cual se explica si el sitio de corte específico estuviera dentro de un epitope de LT o si la actividad enzimática previniera los pasos esenciales de procesamiento. Por otro lado, el aumento del procesamiento de GA provocado por el inhibidor ZPADK, se debe probablemente a que como este copolímero presenta una secuencia heterogénea y es más complejo que DNP-PLL, necesita de varias enzimas para su degradación. Dado que los diferentes procedimientos de corte llevan a la producción de determinantes reconocidos por diferentes LT, se ha sugerido que existen diferentes mecanismos de procesamiento en las CPAs que podrían influir en cualquiera de los epitopes potenciales de un ag para ser presentado a la población de LT.

Takahashi y cols. (1989) estudiando el procesamiento de la mioglobina y utilizando un panel de 10 inhibidores de proteasas encontraron que solamente las tiol proteasas catepsinas B y L son necesarias para producir 3 diferentes epitopes que son presentados a los linfocitos T para originar una respuesta.

Matsunaga y cols. en 1993, al estudiar el procesamiento y presentación de la vacuna de la rabia y del virus de la hepatitis B y utilizando inhibidores específicos para catepsina B y para cistein-proteasas, encontraron que la catepsina B es la enzima responsable del

procesamiento de ags. Además encontraron que uno de los sitios activos de ésta, presenta homología con una parte del desotopo (sitio de unión del péptido) de la molécula clase II, por lo que plantearon la hipótesis de que las secuencias del dominio carboxilo terminal de los péptidos antigénicos que muestran afinidad común por las moléculas clase II son seleccionadas debido a su especificidad como sustrato de la catepsina B. Aparentemente, las secuencias de los péptidos antigénicos que se han aislado de las moléculas clase II que se han reportado, en su mayoría contienen secuencias de afinidad para la catepsina B, aunque algunos de ellos no las contienen; debido, según esta hipótesis, probablemente a que ocurren algunas modificaciones proteolíticas adicionales durante la presentación de ag o a que otras proteasas lisosomales participan en algún otro procesamiento de ag, como se ha visto en otros sistemas estudiados.

Varias evidencias han mostrado que el sitio de procesamiento y degradación proteolítica de proteínas internalizadas ocurre en un compartimento lisosomal y/o endosomal (Michalek y cols., 1989). En ambos organelos se han detectado fragmentos peptídicos, demostrando que éstos funcionan como sitios de procesamiento y que éste puede en parte, ser determinado por la estructura molecular propia del ag. (Davidson y Watts, 1989; Walker, 1989; Vidard y cols., 1992; McCoy y cols., 1993).

Dado que la reducción de los puentes disulfuro en el ag representa un paso importante en el procesamiento, ya que permite el desdoblamiento de los ags proteicos para permitir que las proteasas lisosomales tengan acceso a más sitios de corte potenciales y por tanto aumentar la proteólisis y la producción de una variedad de péptidos potencialmente inmunogénicos, Collins y cols. en 1991, utilizando conjugados reducibles de transferrina y α_2 macroglobulina (α_2M), estudiaron el sitio en el cual se lleva cabo la reducción de los puentes disulfuro. Estos autores encontraron que la reducción de los puentes disulfuro de la α_2M ocurría en los lisosomas, y no en los endosomas tempranos; de esta forma estos resultados apoyan la idea de que los lisosomas son los compartimentos en donde se lleva a cabo el procesamiento de ags.

Harding y cols., en el mismo año, también presentaron evidencias directas de que los ags son procesados en los lisosomas. Empleando liposomas con diferente composición de lípidos, determinaron que los ags encapsulados en liposomas ácido-susceptibles eran liberados dentro de endosomas tempranos acidificados con actividad de procesamiento de ags potencial; mientras que los ags encapsulados en liposomas ácido-resistentes, eran secuestrados dentro de la membrana liposomal durante el tránsito endosomal y fueron

entonces liberados a los lisosomas, donde la membrana liposomal fue degradada y los ags que contenían fueron procesados, demostrando que la producción de péptidos inmunogénicos son producto del catabolismo lisosomal.

También los resultados que obtuvieron Harding y Geuze en 1992 estudiando el procesamiento de *L. monocytogenes*, apoyan el papel central de los lisosomas y fagolisosomas. Estos autores emplearon microscopía electrónica para evaluar los compartimentos involucrados en el procesamiento de esta bacteria y encontraron que después de la toma de la bacteria, ésta se encontraban en los fagosomas, los cuales se fusionaban rápidamente con lisosomas y endosomas, presentando marcadores característicos de los lisosomas.

El procesamiento de ags es un paso primordial para la presentación de ags ya que permite la disminución de interacciones entre el ag, la molécula del MHC y el TCR debido a los cortes enzimáticos del ag en sitios importantes para la unión, por lo que la falta de procesamiento puede tener efectos importantes sobre la presentación.

A pesar de la importancia del procesamiento para la presentación de ags, el concepto original sobre este proceso así como la necesidad de que el ag se procese ha sido discutido por algunos autores.

Así, Mills y cols. (1986) al caracterizar unas clonas de LT específicas para la hemaglutinina del virus de la influenza, encontraron que éstas reconocían epitopes conformacionales; mientras que Naquet y cols. (1987) estudiando el procesamiento de la insulina, encontraron que clonas de LT específicas para este ag, reconocían a la insulina cuando sus cadenas A y B se encontraban unidas pero no reconocían cada una de ellas por separado.

Por otro lado, Lee y cols. (1988) mostraron que el fibrinógeno, una proteína larga de 340 kDa, no necesita ser procesado debido a que el sitio inmunodominante de la molécula se localiza en el extremo carboxilo terminal de la cadena A que se encuentra libre, que es flexible y que casi no presenta una estructura secundaria. Regnier-Vigouroux y cols. (1988) encontraron que de 16 clonas de LT específicas para la apamina, un péptido de 18 aminoácidos, únicamente 8 de ellas reconocían este péptido si éste era hidrolizado, mientras que las clonas restantes, reconocieron solamente al péptido desdoblado sin ningún procesamiento. También se ha observado que las enterotoxinas del *Staphylococcus aureus* no requieren ser procesadas para ser presentadas (Yagi y cols., 1990).

Otro aspecto que ha sido cuestionado es que la endocitosis sea necesaria para el procesamiento, por lo que varios autores han propuesto que puede haber procesamiento a nivel de la membrana plasmática de las células apoyados en la incapacidad de inhibir la presentación del ag con drogas lisosomotrópicas o fijando a las células. Kim y cols. (1985) encontraron que la línea de linfocitos B A20 procesaba al PPD mediante un mecanismo unido a la membrana y que no necesitaba ser internalizado para ser procesado y presentado a hibridomas de LT, mientras que cuando la CPA era la línea de Mφs P388, el PPD si se procesaba en los lisosomas. Büüs y Werdelin (1986), al utilizar LT específicas para el péptido AIII de la angiotensina, mostraron que para que las CPAs fijadas con formol puedan estimular la respuesta, éstas necesitan ser incubadas con una mezcla de varios inhibidores de enzimas proteolíticas, lo que sugirió que el péptido es degradado en la superficie.

Como puede observarse, existen algunas controversias entre diferentes grupos de investigación con relación al procesamiento de ags, lo cual se puede deber a la gran diversidad de los sistemas de ags y de los métodos utilizados para analizarlo.

4.3. Presentación de antígenos restringida por moléculas clase II.

Después del procesamiento, el ag es expresado sobre la superficie de la CPA donde interactúa físicamente con una molécula clase II.

El estudio de la presentación de ags restringida por moléculas clase II se ha enfocado principalmente a conocer el sitio en el que las moléculas clase II se asocian con los péptidos antigénicos generados por el procesamiento y a conocer las vías de tráfico intracelular de estas moléculas. Se ha propuesto que la vía biosintética de moléculas clase II se intercepta con un compartimento que contiene el ag procesado y que el reciclamiento de moléculas clase II hacia la superficie celular con intercambio de péptido ocurre en un compartimento endosomal (Unanue, 1992).

Las subunidades α y β de las moléculas clase II sintetizadas *de novo* no se coensamblan solas sino que lo hacen cuando se asocian con una cadena invariante no polimórfica (Ii) dentro de la célula. La Ii forma trimeros asociados no covalentemente en el retículo endoplásmico (RE) y los dímeros $\alpha\beta$ clase II se asocian rápidamente con estos trimeros (Germain, 1993; Viville y cols., 1993); de tal forma que Ii en este periodo temprano de la biosíntesis de las moléculas clase II, actúa como una chaperona especializada para facilitar el exporte de las moléculas clase II al RE, evitando la retención de estas moléculas

por proteínas residentes. Además, inhibe la unión estable del péptido a la molécula clase II probablemente porque se asocia con la hendidura de unión al péptido (Cresswell, 1992). En apoyo a esto, se ha observado que el péptido del virus de la influenza, es incapaz de asociarse con moléculas HLA-DR5 unidas con Ii, pero cuando se encuentran separadas de la Ii, el péptido puede unirse a estas moléculas clase II (Roche y Cresswell, 1990).

Después del ensamblaje de los complejos $\alpha\beta Ii$, éstos salen del RE y entran al aparato de Golgi donde se glicosilan. Cuando los complejos $\alpha\beta Ii$ alcanzan el trans-Golgi, se mueven hacia la vía endocítica, gracias a que la Ii contiene una señal en la cola citoplásmica del residuo 30 del extremo amino-terminal que dirige a esta proteína a un compartimento endocítico (Romagnoli y cols., 1993; Neefjes y Ploegh, 1992). Algunos estudios morfológicos han mostrado que las moléculas clase II pasan a través de un compartimento vesicular post-Golgi y morfológicamente diferente del Golgi, RE o lisosomas. Se ha sugerido que este compartimento es el sitio probable de intersección con la vía endocítica, donde pueden asociarse los péptidos antigénicos y las moléculas clase II. Sin embargo, no se ha establecido el sitio exacto y se ha sugerido que puede ser diferente entre los tipos celulares. En el camino por alcanzar al endosoma, el complejo clase II/Ii puede ser cortado por proteasas antes de que las moléculas clase II se expresen en la superficie celular, para permitir la unión de péptidos antigénicos presentes en el mismo compartimento (Germain, 1993).

Por otro lado, Guagliardi y cols. en 1990, utilizando microscopía electrónica y una línea de LB, encontraron que la vía de exporte para moléculas clase II y la vía de importe del Ag, se unen en un compartimento endocítico periférico que contiene toda la maquinaria molecular requerida para el procesamiento y presentación de Ag, incluyendo inmunoglobulinas de superficie internalizadas y enzimas proteolíticas, como las catepsinas B y D, y cadenas Ii.

Los estudios realizados con líneas de linfoma de LB han dado evidencia de que los complejos péptido/clase II pueden disociarse en los endosomas, permitiendo la unión de otro péptido a la molécula clase II vacante y el reciclamiento de regreso subsecuente a la superficie de la célula. El mecanismo del reciclamiento de Ag procesado de los lisosomas a la membrana plasmática no es aún claro, sin embargo, se ha demostrado el reciclamiento de constituyentes de la membrana entre lisosomas y membrana plasmática (Harding y Unanue, 1990).

4.4. Procesamiento de antígenos restringido por moléculas clase I.

Los péptidos que interactúan con las moléculas clase I son generados predominantemente en el citoplasma de las CPAs.

Mediante el uso de péptidos sintéticos y de mutantes de la nucleoproteína (Np) del virus de la influenza, se han identificado pequeñas secuencias de Np como epitopes procesados intracelularmente reconocidos por LT. Algunos estudios posteriores han confirmado que para el reconocimiento de ag por LT citotóxicos restringidos por clase I, también se requiere que éste sea procesado a una forma peptídica para que pueda asociarse a las moléculas del MHC. Aunque el sitio preciso de procesamiento de ags y el sitio de generación de complejos moléculas clase I-péptido no ha sido claramente definido, parece ser que el primero ocurre en el citoplasma de la célula en un compartimento no sensible a los agentes lisosomotrópicos. Sin embargo, el procesamiento de ags por clase I puede ser inhibido por la brefeldina A, la cual bloquea el movimiento de proteínas de membrana del RE al Golgi (Nuchtern y cols., 1989), y por un producto del gen E3/19k del adenovirus, el cual se une específicamente a moléculas clase I y las retiene en el RE (Yewdell y Bennink, 1989; Cox y cols., 1990). Se ha sugerido que los proteosomas y el complejo polipeptídico de bajo peso molecular (LMP) se encuentran involucrados en el procesamiento de ags por clase I (Monaco, 1992a).

Los proteosomas son estructuras relativamente abundantes en células eucariontes, donde se lleva a cabo la mayor parte de la actividad proteolítica del citoplasma, y están evolutivamente bien conservados. Es un sistema proteolítico extralisosomal que funciona como una proteasa extralisosomal dependiente de ATP para degradar selectivamente proteínas que contienen ubiquitina; presenta varias actividades de peptidasas diferentes, siendo capaz de cortar en el extremo carboxilo de aminoácidos básicos, ácidos y neutros, sugiriendo que puede generar una amplia variedad de péptidos para diversas proteínas substratos. Después de la generación de los péptidos antigénicos intracelulares, éstos son transportados hacia adentro del RE a través de un transportador peptídico heterodimérico llamado TAP1/2 (de acuerdo a la reunión del Comité de Nomenclatura de HLA de noviembre de 1991, Japón; anteriormente nombrados Ham1/2 para el ratón, mtp1/2 para la rata y Y3/1; PSF1/2 ó RING4/11 para el ser humano) para ser ensamblados con las moléculas clase I para la presentación sobre la superficie de la célula (Mónaco, 1992a y b).

La actividad enzimática de los proteosomas es regulada por componentes diferentes incluyendo nucleótidos y policationes. Se ha visto que el IFN- γ puede funcionar como

inmunoregulador del proteosoma en el procesamiento/presentación de ags, ya que cambia la especificidad de éstos para la degradación de los péptidos, aumentando su actividad de corte endoproteolítico de enlaces peptídicos sobre el extremo carboxilo de aminoácidos básicos y neutros de las proteínas, o disminuyendo la actividad para los péptidos que contienen aminoácidos ácidos. Estos hallazgos han sugerido que los ags intracelulares pueden ser procesados por proteosomas modificados por IFN- γ . Todas estas observaciones hacen de los proteosomas candidatos atractivos como generadores proteolíticos de péptidos antigénicos de origen citoplásmico que pueden unirse a moléculas clase I (Yang y cols., 1992; Akiyama y cols., 1994).

El complejo polipeptídico de bajo peso molecular (LMP) es una estructura que está relacionada bioquímicamente y antigénicamente al proteosoma, que también posee actividad proteolítica, aunque no se conoce si presenta diferencias en especificidad. Ambos presentan un gran número de subunidades comunes, aunque no son estructuras idénticas, pero la relación bioquímica exacta entre las dos estructuras se desconoce, aunque se ha propuesto la hipótesis de que las dos estructuras difieren únicamente en la presencia o ausencia de dos subunidades que se encuentran ligadas al MHC.

Dadas todas estas evidencias de participación del complejo LMP en el procesamiento de ags por moléculas clase I, se ha propuesto un modelo que propone que una subpoblación diferente de la mezcla celular de proteosomas, el complejo LMP, contiene múltiples sitios catalíticos para facilitar la producción preferencial de péptidos de 9 aminoácidos y que puede producir péptidos múltiples simultáneamente del mismo sustrato. Así pues, este complejo degrada las proteínas citoplásmicas a péptidos antigénicos, los cuales son transportados por el heterodímero TAP1/2 (transportador de péptidos antigénicos) asociado a la membrana del RE, dentro del lumen del mismo. Los péptidos transportados dentro del lumen del RE así como algunos péptidos raros producidos dentro del RE por otros mecanismos, se unen a las moléculas clase I, induciendo un cambio conformacional que puede facilitar su exportación a la superficie celular y que además le da estabilidad a la molécula (Figura 6) (Mónaco , 1992b).

Existen evidencias provenientes de estudios con células mutantes que apoyan dicho modelo. Entre las líneas celulares estudiadas, está la línea linfoblástide B, T2 (721.174.T2), la cual contiene una deleción homocigota en la región que contiene los dos genes que codifican para los transportadores, y le falta la secuencia de la señal de translocación (SRP) hacia el RE, la que precede al péptido de la influenza. Aunque en T2

se produce el péptido en el citoplasma al igual que en las células de tipo silvestre (T1), solo T1 presenta el péptido a LT citotóxicos, lo que sugiere, que el transporte es dependiente de genes que residen en la región eliminada en T2. Por otro lado, cuando se transfectan células T2 con el gen de la proteína de la matriz del virus de la influenza (presenta una secuencia líder clásica inmediatamente upstream del péptido de la influenza), ambas líneas celulares presentan el péptido de la influenza a LT citotóxicos restringidos por clase I. De esto se puede concluir que ambas líneas celulares poseen toda la maquinaria necesaria para presentar este péptido cuando es introducido directamente en el lumen del RE, lo que indica que los péptidos citoplásmicos pueden ser transportados dentro de la vía secretoria en células normales, independientemente de la SRP y que este transporte es dependiente de los genes en la región clase II del MHC (Mónaco, 1992a).

Henderson y cols. en el mismo año (1992), encontraron que las células T2 expresaban en su superficie un tipo de moléculas clase I conocida como HLA.A21 en niveles cercanos a los normales, lo cual no concuerda con el modelo propuesto por Mónaco. Basándose en estos hallazgos, Hoffman en 1992 propuso un modelo alternativo para el procesamiento de ags restringido por moléculas clase I, el cual supone que la proteína sintetizada *de novo*, es insertada en el RE directamente de la maquinaria sintética del ribosoma, y que los 9 a 12 aminoácidos de la secuencia señal son cortados probablemente por la peptidasa de la señal, para quedar entonces libre y poder unirse con las moléculas del MHC que forman el complejo entero en la superficie celular. Sin embargo, Henderson y cols. en 1992, también encontraron que los péptidos de la secuencia de la señal eran presentados sobre la superficie de células normales, por lo que estos autores sugirieron que la mayoría de los péptidos son procesados por la vía propuesta por Mónaco, y que esta vía de procesamiento alterna solo es utilizada por agentes invasores específicos.

4.5. Presentación de antígenos restringida por moléculas clase I.

La presentación de péptidos mediada por clase I de la mayoría de las proteínas celulares, permite al sistema inmune, vía LT citotóxicos, mantener una vigilancia constante de la expresión de proteínas anormales. Se ha sugerido que los ags citoplásmicos procesados se asocian con las moléculas clase I antes de su liberación del RE. (Stewart y cols., 1994)

La cadena pesada clase I y la β 2-microglobulina (β 2m), entran al RE vía reconocimiento de la señal y del aparato de transporte. La cadena pesada se asocia

rápidamente con una proteína residente del RE, sensible al Ca^{++} , llamada p88, Ip90 o calnexina, la cual esta asociada con el mecanismo de translocación dependiente de la secuencia de la señal. p88 se ha involucrado en la regulación de la expresión de la proteína multimérica que se ensambla en la región transmembranal. Algunos estudios preliminares, sugieren que la porción transmembranal de las moléculas clase I, interacciona con p88, lo cual muestra que estas moléculas clase I, no existen como monómeros simples, sino que pasan a alguna forma de homo-oligomerización o a una interacción proteína-proteína como parte de su maduración. En células que no coexpresan $\beta 2m$, la gran mayoría de las cadenas pesadas clase I permanecen asociadas en el RE con p88 hasta que se degrada. En células normales, después de que la traducción de la cadena pesada se completa, la $\beta 2m$ se asocia con los complejos cadena pesada-p88. Sin embargo, la interacción con $\beta 2m$ no es suficiente para que p88 se disocie rápidamente. Numerosos estudios han mostrado que la $\beta 2m$ tiene un papel crítico en la expresión significativa de moléculas clase I sobre la superficie celular, sin embargo, se ha observado, que el requerimiento de $\beta 2m$ en el transporte no es absoluto, ya que se ha podido detectar un bajo nivel de ciertas cadenas pesadas clase I sobre la superficie de células que no expresan de $\beta 2m$.

La liberación de p88 en presencia de $\beta 2m$ parece ocurrir dentro del propio RE, entonces, los complejos cadena pesada clase I- $\beta 2m$ salen del RE y se mueven a través de los sacos del Golgi al sistema de interconexión trans-Golgi y de ahí a la superficie celular por la vía secretoria (Germain, 1993).

Se han considerado dos posibles mecanismos para conocer el sitio de interacción entre el ag procesado y las moléculas clase I. Un mecanismo considera que el ag se asocia con las moléculas clase I recicladas de la superficie celular por endocitosis constitutiva o dirigida; y el otro considera que el ag se asocia con moléculas clase I sintetizadas *de novo*.

Se ha sugerido que el primer sitio de asociación del péptido-clase I es el lumen del RE o un compartimento celular pre-Golgi asociado. Nuchtern y cols. en 1989, realizaron experimentos con células linfoblastoides B HLA-A2 infectadas con el virus de la influenza intacto en presencia de brefeldina A, y encontraron que la presentación de la proteína de la matriz a clones de LT específicas restringidas por HLA-A2, se inhibía completamente en presencia de brefeldina A, debido a su especificidad por su efecto sobre el tráfico de proteínas del RE hacia el aparato de Golgi. Este tipo de experimentos apoyan la hipótesis de que el RE es el sitio de unión del péptido-clase I.

Evidencias recientes indican que la unión de péptidos a moléculas clase I en el RE es importante para la expresión estable de estas moléculas en la superficie celular. Estudios realizados con la línea celular mutante de linfoma RMA-S, la cual expresa bajos niveles de moléculas clase I en la superficie celular y es incapaz de procesar y presentar epítopes de la Np (nucleoproteína del virus de la influenza) sintetizados en el citoplasma, han mostrado que cuando se les adiciona epítopes del péptido sintético, el número de moléculas clase I de la superficie aumenta notoriamente, permitiendo el reconocimiento por LT citotóxicos específicos. En ausencia del péptido, observaron que las cadenas pesadas clase I interactúan con $\beta 2m$, son transportadas a la superficie celular, pero se pierden rápidamente debido a su inestabilidad. En células normales, la asociación de un péptido con el sitio de unión del péptido de una cadena pesada clase I sintetizada *de novo* en el RE, permite que el complejo $\beta 2m$ -cadena pesada adopte la conformación correcta para la expresión de superficie estable. En ausencia de ags extraños, los péptidos unidos a moléculas clase I se derivan únicamente de proteínas normales propias. Una pequeña proporción de moléculas clase I sintetizada por la mayoría de las células puede alcanzar la membrana plasmática sin unir péptido, pero se pierden rápidamente debido a su inestabilidad (Male y cols., 1991).

Algunos ags exógenos, normalmente endocitados y procesados por presentación restringida por clase II, pueden ser procesados por entrada a la vía de clase I. Por ejemplo, los ags de la envoltura exógena del virus de la hepatitis B y del VIH pueden ser reconocidos por LT restringidos por clase I o clase II; las proteínas del virus de la influenza, que son procesadas por la vía endógena, pueden asociarse a moléculas clase II para estimular linfocitos CD4; bacterias como *Salmonella* y parásitos como *Leishmania* que residen dentro de compartimentos vesiculares, pero que no tienen acceso definido al citosol, pueden provocar respuestas de LT restringidos por clase I; *Listeria monocytogenes*, enzimáticamente, rompe la membrana vesicular, permitiendo el acceso al citosol y a la vía de procesamiento clase I; ags solubles pueden ser procesados también por clase I (Bolognesi, 1990; Collins y cols., 1992).

Con respecto a *Trichinella spiralis*, no existen reportes sobre el procesamiento de ags, el único trabajo en donde se hacen algunos experimentos de presentación de ags, fue el reportado por Krco y cols., en 1983. Estos investigadores produjeron clones y líneas de LT específicas para ags solubles, y encontraron que las clones de LT, estaban restringidas

por moléculas I-E del H-2 y que las CPAs del bazo de ratones B10.K con haplotipo E_p^aE_a^a eran las únicas capaces de presentar ags de *T. spiralis* efectivamente.

II. JUSTIFICACIÓN

Actualmente se reconoce que los LTh₂ median la inmunidad protectora contra la triquinosis (Grencis y cols., 1985; Riedlinger y cols., 1986; Korenaga y cols., 1989; Grecis y cols., 1991) y que esta protección es inducida principalmente por los ags de superficie y de secreción-excreción de la larva infectiva (Despommier y Müller, 1970; Despommier, 1981; Silberstein y Despommier, 1984; Gamble, 1985a, 1985b, Ortega-Pierres y cols, 1989; Su y cols., 1991). Sin embargo, no se sabe que ags del parásito son procesados y presentados por las CPAs a los LT para inducir una respuesta protectora tanto humoral como celular. Es por esto que en este trabajo se realizó un análisis preliminar sobre la unión y procesamiento de ags presentes en un extracto soluble de la larva infectiva L₁ de *Trichinella spiralis* empleando diferentes líneas de Mφs como CPA.

III. OBJETIVO GENERAL

Hacer un análisis de la unión y procesamiento de los ags presentes en un extracto total de la larva infectiva L₁ de *Trichinella spiralis* por diferentes líneas celulares de mφs.

IV. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el perfil de ags de la larva infectiva L₁ de *T. spiralis* que son unidos por Mφs de las líneas celulares J774, THP1, U937 así como de exudado peritoneal de ratón.
- Determinar la cinética de procesamiento de los ags presentes en el extracto total de la larva infectiva L₁ de *T. spiralis* por los Mφs de las diferentes líneas celulares.

V. METODOLOGÍA

1. Mantenimiento de la cepa de *Trichinella spiralis* in vivo.

La cepa de *T. spiralis* empleada se aisló de un cerdo cuya procedencia se desconoce, y fue donada por el Dr. Ricardo Martínez Marañón del Depto. de Parasitología del INDRE; la cepa se ha mantenido por varios años a través de la infección de ratones de las cepas NIH, CD1 y C57b1/6.

En este trabajo, se emplearon ratones de las cepas mencionadas de 4 a 6 semanas de edad, los cuales se inocularon por vía oral con 350 larvas infectivas L₁ en el caso de las cepas NIH y CD1 y con 250 L₁ para C57b1/6. Para permitir que el ciclo de vida del parásito se completara, los animales infectados se mantuvieron vivos durante un período de 30 días; posteriormente se sacrificaron, los restos de los animales que no se ocuparon se incineraron y el tejido muscular se sometió a digestión para obtener nuevas larvas L₁ e infectar a otros roedores.

2. Purificación y obtención de larvas infectivas L₁ de *T. spiralis*.

Las larvas infectivas L₁ necesarias para la infección de ratones y para la producción del extracto total (ET) del parásito se obtuvieron por el método de digestión descrito por Mazzotti y Pastrana, 1943.

El tejido de cada ratón infectado se digirió con una solución de pepsina-HCl 1% (Baker), en agitación constante durante aproximadamente 4 h a 37°C. Cuando el tejido se encontraba completamente desintegrado, la solución se pasó a través de dos capas de gasa y se colectó en copas de precipitación para permitir la sedimentación de las larvas en el fondo de los recipientes durante 1 h. Terminado este período de sedimentación, el sobrenadante se decantó y las larvas se colectaron en tubos de centrifuga de 50 mL. Posteriormente, las larvas se lavaron de 2 a 3 veces por centrifugación a 700 g, en una solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M y NaCl 0.15 M (PBS) pH 7.2 (Baker) durante 5 min a temperatura ambiente para eliminar los restos de tejido, se purificaron por un gradiente de dextrosa (Baker) de 3 fases, 80, 40, y 20%, donde las larvas sedimentaron entre la fase de 40 y 20%, se colectaron, y se volvieron a lavar como se mencionó anteriormente. Las larvas se resuspendieron en PBS y se tomaron 10 µL de la suspensión para determinar el número de parásitos para infectar ratones y así mantener la cepa del

mismo; las larvas restantes se usaron para infectar y así mantener el ciclo de vida del parásito o se congelaron a -20°C y posteriormente a -70°C para preparar el ET de *T. spiralis*.

3. Preparación del extracto total de las larvas infectivas de *T. spiralis* (ET).

Para la preparación del ET de las larvas infectivas se siguió la metodología descrita por Parkhouse y cols., 1981. Las larvas se descongelaron y se centrifugaron a 700 g durante 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se desechó y las larvas se resuspendieron en 14 mL de Tris-base (tris-hidroximetilaminometano) (Sigma) 10 mM pH 8 y se centrifugaron a la misma gravedad. Posteriormente, se resuspendieron en una solución de Tris-Base 10 mM pH 8, la cual contenía 50 µg/mL de TPCK* (Sigma), 50 µg/mL de TLCK** (Sigma), 10 µL/mL de PMSF*** (Sigma) 100 mM y se homogeneizaron manualmente con un triturador de tejidos durante 15 min. En seguida se agregaron 240 µL/mL de deoxicolato de sodio (DOC) (Difco) al 2% y se continuó triturando las larvas durante 15 min. Después, el homogenado se dejó reposar de 10 a 20 min y se centrifugó a 25, 000 g durante 30 min. Todo el proceso de preparación del ET se realizó a 4°C. Posteriormente, el sobrenadante (ET) se dializó exhaustivamente contra PBS pH 8 durante toda la noche, con al menos dos cambios más de PBS al día siguiente. Por último, se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (1976) usando el reactivo comercial de Bio-rad y el ET se distribuyó en alícuotas pequeñas, se guardó a -20°C y posteriormente a -70°C hasta su uso. El ET se sometió a electroforesis en gel de poli-acrilamida para verificar la calidad del mismo.

*TPCK (N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona): inhibidor inespecífico de papaina, inhibidor de α -quimiotripsina y de la biosíntesis de proteínas.

**TLCK (N- α -p-tosil-L-tisina clorometil cetona): inhibidor de tripsina y papaina.

***PMSF (Fenil metil sulfonil fluoruro): inactivador de enzimas proteolíticas.

4. Obtención de anticuerpos específicos anti-*T. spiralis*.

Se inmunizaron dos conejos Nueva Zelanda de aproximadamente 6 semanas de edad de acuerdo al siguiente esquema de inmunización:

Tabla III. Esquema de inmunización

Días	Vía	# Inmunización	# Sangrado
0	Subcutánea	1) 500 µg/mL de ET + ACF ^a	Preinmune
7	Intramuscular	2) 500 µg/mL de ET + AIF ^b	---
14	Intramuscular	3) 500 µg/mL de ET	1
21	Intramuscular	4) 500 µg/mL de ET	2
28	Intramuscular	5) 500 µg/mL de ET	3

a) adyuvante completo de Freund

b) adyuvante incompleto de Freund

La inmunización subcutánea se realizó en 5 puntos de inoculación en la región dorsal de los animales mientras que las intramusculares se hicieron en las piernas posteriores, alternando los sitios de inoculación en cada inmunización. Previo a cada inmunización (del preinmune al penúltimo), los conejos se sangraron por la vena marginal de las orejas. La sangre se colectó en tubos cónicos de 50 mL, se removió el coágulo y se incubó a 37°C durante 30 min o toda la noche a 4°C. En seguida se colectó el suero en tubos cónicos de 50 mL y se centrifugó a 250 g durante 10 min a temperatura ambiente. El suero obtenido de cada sangrado se valoró por ELISA empleando ET de la larva infectiva del parásito para conocer el título de anticuerpos. Cuando las densidades ópticas de los sueros fueron > 1.5, los animales se sangraron por punción intracardiaca para obtener el suero hiperinmune, la sangre se procesó como se mencionó anteriormente y se repartió en alícuotas de 1 mL, se almacenó a -20°C y posteriormente a -70°C hasta su uso. De manera colateral, el suero hiperinmune también se tituló por inmunoelectrotransferencia para obtener la dilución óptima a utilizar en los ensayos con las células.

5. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 11% (PAGE-SDS).

El extracto total (ET) o las células utilizados en los experimentos, se sometieron a electroforesis discontinua en minigeles de poliacrilamida-SDS al 11% (Bio-rad) en condiciones reductoras de acuerdo al método de Laemli, (1970). Como las células J774 se

emplearon para estandarizar el sistema de trabajo, los primeros geles que se corrieron de éstas, fueron hechos al 8%.

Los geles se cargaron con 40 µg y 60 µg de proteína de ET y de células respectivamente. En cada electroforesis se incluyó una muestra de marcadores de peso molecular para determinar el PM de cada proteína con base en la distancia migrada por cada una de ellas con respecto a la migración del colorante azul de bromofenol usado como marcador del frente (Rf).

Las electroforesis se llevaron a cabo aplicando una corriente constante de 140 volts durante aproximadamente 1:30 h a temperatura ambiente. Al término de la electroforesis, los geles se sometieron a inmunoelectrotransferencia.

6. Inmunoelectrotransferencia (IET).

El ET o las células utilizados en los experimentos una vez separados electroforéticamente, se transfirieron a papel de nitrocelulosa (PNC) (Bio-rad) de acuerdo al método estándar (Towbin y cols., 1979). La electrotransferencia se llevó a cabo durante 1 h a 100 volts a 4°C. Al término de la transferencia de las proteínas, el PNC se tiñó con rojo de Ponceau (Sigma) 0.2% en ácido tricloro-acético (TCA) (Merck) al 3% durante dos min para verificar que el proceso de transferencia hubiera sido óptimo así como para observar la presencia de las bandas proteicas. El PNC se lavó con agua destilada y se bloqueó con leche descremada Sveltes (Nestlé) al 5% en PBS-Tween 20 al 0.05% o con albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma) al 3% en PBS-Tween 20 al 0.05% durante toda la noche a 4°C y por 30 min a temperatura ambiente con agitación constante al día siguiente. En seguida, el PNC se incubó con un suero hiperinmune de conejo anti-*T. spiralis* a una dilución 1:25 en PBS-Tween 20 al 0.05%, durante 2 h a temperatura ambiente, con agitación constante. Posteriormente, el PNC se incubó con un conjugado de Proteína A-Peroxidasa (Bio-rad) a una dilución de 1:500 en PBS-Tween 20 al 0.05%, durante 2 h a temperatura ambiente y con agitación constante. Por último, las bandas antigénicas se revelaron con la solución de sustrato que contenía 0.1% de H₂O₂ al 3%, 0.1% de 4-cloro-1-naftol (Sigma), 5% de metanol y 50 ml de PBS pH 7.2; la reacción se paró agregando agua destilada. Entre cada incubación, se hicieron 3 lavados con PBS pH 7.2 y 2 lavados con PBS-Tween 20 0.05%, cada uno durante 5 min a temperatura ambiente, con agitación constante.

7. Mantenimiento *in vitro* de macrófagos (Mφs) de las líneas J774, U937 y THP1.

Las células empleadas en este trabajo provienen de las líneas J774, U937 y THP1.

La línea celular J774 se originó a partir de un sarcoma de células reticulares proveniente de un ratón hembra de la cepa BALB/c en 1968 durante un programa de inducción de plasmacitomas (Van Furth y cols., 1985).

La línea celular U937 se originó a partir de células malignas obtenidas de la efusión pleural de un hombre caucásico de 37 años con linfoma histiocítico difuso en 1974 (Sundström y Nilsson, 1976).

La línea celular THP1 se originó a partir de sangre periférica de un niño de 1 año con leucemia monocítica aguda (Tsuchiya y cols., 1980).

Las características principales de cada línea se muestran en la Tabla IV.

Las células de la línea J774 se mantuvieron en cultivo en cajas de poliestireno de 250 mL (Costar) y las de las líneas U937 y THP1 en cajas de 50 mL (Costar). Todas las líneas se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, aminoácidos no esenciales 1x, glutamina 10 mM, una solución de antibióticos-antimicóticos 1x (10 mg de estreptomina, 10,000 U de penicilina y 25 µg de anfotericina B/mL) (Sigma) en una incubadora a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. El medio de cultivo se cambió cuando éste viró a color amarillo (U937 y THP1) ó cuando se encontraron células despegadas (J774). Cuando la proliferación celular fue confluyente en el caso de J774 ó cuando la población de células de U937 ó THP1 era máxima, los Mφs se despegaron mecánicamente de las cajas (J774) ó se pasaron con una pipeta para sembrarse en cajas nuevas para mantenerlas en cultivo. La viabilidad de las células J774 se verificó por su capacidad de adherencia a las cajas y por su forma fibroide; las U937 y THP1 por su refringencia y observándolas al microscopio por exclusión con una solución de azul tripano (Gibco) 0.04% en NaCl 0.15 M.

8. Obtención de Mφs de exudado peritoneal (CEP).

Para la obtención de células inflamatorias peritoneales (CEP), se emplearon ratones hembra de 4 a 6 semanas de edad de la cepa BALB/c siguiendo la metodología descrita por Taylor y cols., en 1987.

Los ratones se inyectaron intraperitonealmente con 1.5 mL de medio tioglicolato fluido (Biozon), utilizando una aguja 27x13 mm para jeringa de insulina. Cuatro días después, los ratones se sacrificaron, se les quitó la piel del abdomen para dejarlo

descubierto y se inyectó intraperitonealmente 5 mL de medio DMEM-2.5% SFB frío utilizando una aguja 22x32 mm. Posteriormente, se extrajo el líquido peritoneal, se colectó en un tubo cónico de 50 mL y se centrifugó a 250 g durante 10 min a temperatura ambiente. En seguida, se sustrajo el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 5 mL de DMEM no suplementado. Por último, se verificó la viabilidad de las células por exclusión con una solución azul tripano y se ajustó el número de células para ser utilizadas en los ensayos realizados en este trabajo.

9. Densitometría de las IETs.

Las IETs obtenidas de los ensayos de pulso y seguimiento de ag, se analizaron en un espectrofotómetro Shimadzu con un programa densitométrico normal y posteriormente se midió la altura de los picos de cada banda en cm y se graficó contra los diferentes tiempos de incubación.

Tabla IV. Características principales de las líneas celulares

	J774^a	U937^b	THP1^c
<u>Morfología</u>			
<i>Tipo celular</i>	Monocitoide	Monocitoide	Monocitoide
<i>Diámetro celular (µm)</i>	18.7	8.1-16.9	12-14
<i>Forma celular</i>	Variable	Variable	Variable
<u>In vitro</u>			
<i>Crecimiento en racimos</i>	No	No	Si
<i>Unión a superficie de plástico</i>	Si	No	No
<u>Receptores de superficie</u>			
<i>Fc</i>	Si	Si	Si
<i>C3</i>	Si	Si	Si
<u>Haplotipo</u>			
	Ia ^d	A3, W19; B5, 18; CW1, W3	A2, A9; B5; DRW1, DRW2
<u>Citoquímica</u>			
<i>Esterasas</i>	Si	Si	Si
<i>Lisozima</i>	Si	Si	Si
<i>5' nucleosidasa</i>	Si	No	No
<i>Peroxidasa</i>	No	No	No
<i>β-glucuronidasa</i>	No	Si	No
<u>Producción de lisozima</u>	No	Si	Si
<u>Producción de β-glucuronidasa</u>	Si	Si	No
<u>Fagocitosis</u>	Si	Si	Si

Datos tomados de:

^a Van Furth y cols., 1985

^b Sundström. y Nilsson, 1976

^c Tsuchiya y cols., 1980.

10. Efecto del ET y deoxicolato de sodio (DOC) sobre los Mφs de la línea J774.

Con la finalidad de descartar que el ET ó el DOC tuvieran cualquier efecto tóxico sobre los Mφs de la línea J774, se realizaron ensayos de viabilidad como se muestra en la Figura 10. Las células se despegaron mecánicamente y se centrifugaron a 250 g durante 10 min a 4°C. Luego los Mφs se resuspendieron en 5 mL de DMEM no suplementado, se determinó la viabilidad por exclusión con azul tripano y se ajustó el número de Mφs a 5×10^5 células/tubo. En estos experimentos, se contó con 5 grupos de trabajo:

Grupo 1: 5×10^5 Mφs + ET (50, 150 ó 300 µg/mL) sin DOC.

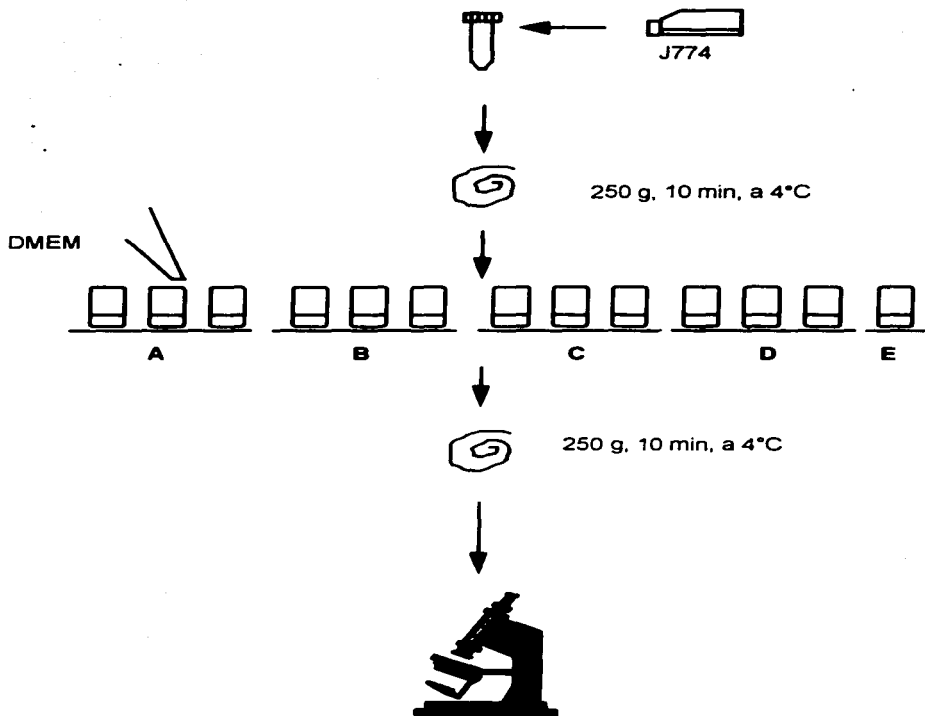
Grupo 2: 5×10^5 Mφs + ET (50, 150 ó 300 µg/mL) con DOC.

Grupo 3: 5×10^5 Mφs + DOC (0.0003 %, 0.001 % ó 0.002 %) sin inhibidores enzimáticos.

Grupo 4: 5×10^5 Mφs + DOC (0.0003 %, 0.001 % ó 0.002 %) con inhibidores enzimáticos.

Grupo 5: 5×10^5 Mφs + DMEM no suplementado.

Después de repartir los Mφs en cada tubo (de vidrio, 13 x 100), se agregó la cantidad correspondiente de ET (50, 150 ó 300 µg/mL) ó DOC (0.0003 %, 0.001 % ó 0.002 %), los tubos se agitaron y se incubaron a 37°C durante 15 ó 30 min. Terminado el tiempo de incubación, los tubos se colocaron en un recipiente con hielo, e inmediatamente después se centrifugaron a 250 g durante 10 min a 4°C. Después se decantó el sobrenadante, los tubos se escurrieron sobre una gasa, se colocaron nuevamente en el recipiente con hielo y se les agregó a cada tubo 2 mL de solución balanceada de Hank's (Gibco) fría, se agitaron y por último se centrifugaron a 250 g durante 10 min a 4°C. Finalmente, los botones celulares se resuspendieron en 50 µL de DMEM + 50 µL de azul tripano y se determinó la viabilidad de las células.



Determinación de viabilidad por exclusión con azul tripano

Figura 10. Diseño de los experimentos de viabilidad utilizando deoxicolato de sodio (DOC) e inhibidores enzimáticos. (A). Células+Extracto Total (ET) con DOC; (B). Células+ET sin DOC; (C). Células+ET con DOC e inhibidores enzimáticos; (D). Células+ET con DOC sin inhibidores enzimáticos y (E). Células+DMEM.

11. Efecto del los lavados y cambio de tubo sobre los Mφs de la línea J774.

Se hicieron experimentos con varias concentraciones de ET durante 30 min a 4°C para determinar el número óptimo de lavados y cambios de tubo que no afectaran la viabilidad de las células, y para averiguar si el ET se pegaba inespecíficamente a los tubos de vidrio empleados en los experimentos.

Los Mφs se incubaron con 0, 25, 50, 150, 300 o 450 µg/mL de ET, terminado el tiempo de incubación, se lavaron con 2 mL de solución balanceada de Hank's (Gibco) fría y se centrifugaron a 250 g durante 10 min a 4°C. En estos experimentos se incluyó un tubo que contenía solamente ET + DMEM. El número de lavados probados fue de 3 hasta 5 y de cambio de tubo hasta de 4.

12. Ensayos de dosis/respuesta.

Estos experimentos (Figura 11) se hicieron para conocer la concentración de ET necesaria para realizar los experimentos de unión y de pulso y seguimiento con cada uno de los tipos celulares empleados.

Los Mφs de la línea J774 (adherentes) se despegaron mecánicamente de la caja de cultivo y se pasaron a tubos cónicos de 50 mL estériles, mientras que los Mφs de las líneas U937 y THP1 (no adherentes) únicamente se pasaron a los tubos y se centrifugaron a 250 g durante 10 min a 4°C. Luego, las células se resuspendieron en 5 mL de DMEM no suplementado, para determinar la viabilidad por exclusión con azul tripano. Se agregaron 6×10^5 células en el fondo de cada tubo silicónizado evitando dañarlas. Posteriormente se adicionó la cantidad correspondiente de ET (25, 50, 150, 300 ó 450 µg/mL), los tubos se agitaron levemente y se incubaron a 4°C (en hielo) ó a 37°C (en una incubadora con una atmósfera húmeda con 5% de CO₂) durante 30 min.

Como testigos negativos, se emplearon: un tubo que únicamente contenía Mφs + DMEM para corroborar que por sí mismas las células no presentaban ags que pudieran interferir con el análisis de los resultados y otro tubo que sólo contenía ET [450 µg/mL] + DMEM para descartar que éste se estuviese pegando al mismo. El testigo positivo, lo constituyó un tubo con ET a una concentración de 450 µg/mL para descartar que éste pudiera presentar alguna modificación o degradación con su manipulación. Terminado el tiempo de incubación, al tubo testigo positivo, se le agregó coctel de muestra para electroforesis y se congeló a -70°C, mientras que los tubos, incluyendo los dos tubos testigos negativos (con células o ET únicamente), se colocaron en un recipiente con hielo,

e inmediatamente después se centrifugaron a 250 g durante 10 min a 4°C. Después el sobrenadante se retiró con una pipeta Pasteur, los tubos se colocaron nuevamente en el recipiente con hielo y se les agregó 1 mL de solución balanceada de Hank's (Gibco) fría, se agitaron levemente, se les adicionó lentamente más de la misma solución hasta llenarlos y por último se centrifugaron a 250 g durante 10 min a 4°C. Todo el procedimiento de lavado se hizo inclinando los tubos, lentamente y con cuidado, procurando no dañar las células. Finalmente, los botones celulares se resuspendieron en 100 µL de PBS pH 7.2, se tomaron 2 alícuotas de 10 µL cada uno; una se utilizó para verificar la viabilidad de los Mφs al microscopio por exclusión con azul tripano y la otra para determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford, con el reactivo comercial Bio-rad. Al resto de las células se les agregó 100 µL de mezcla para muestra de electroforesis en geles de poliacrilamida [SDS al 0.1% (Sigma), EDTA 2 mM (Backer), glicerol al 10% (Sigma), Tris-HCl 0.05 M (Sigma), azul de bromofenol (Bio-rad) y 2-mercaptoetanol 4 mM (Sigma)]. Se almacenaron a -70°C para posteriormente hervirlas durante 5 min y someterlas a electroforesis en minigeles al 11% y electrotransferencia en papel de nitrocelulosa. La cantidad de proteína por carril fue de 60 µg.

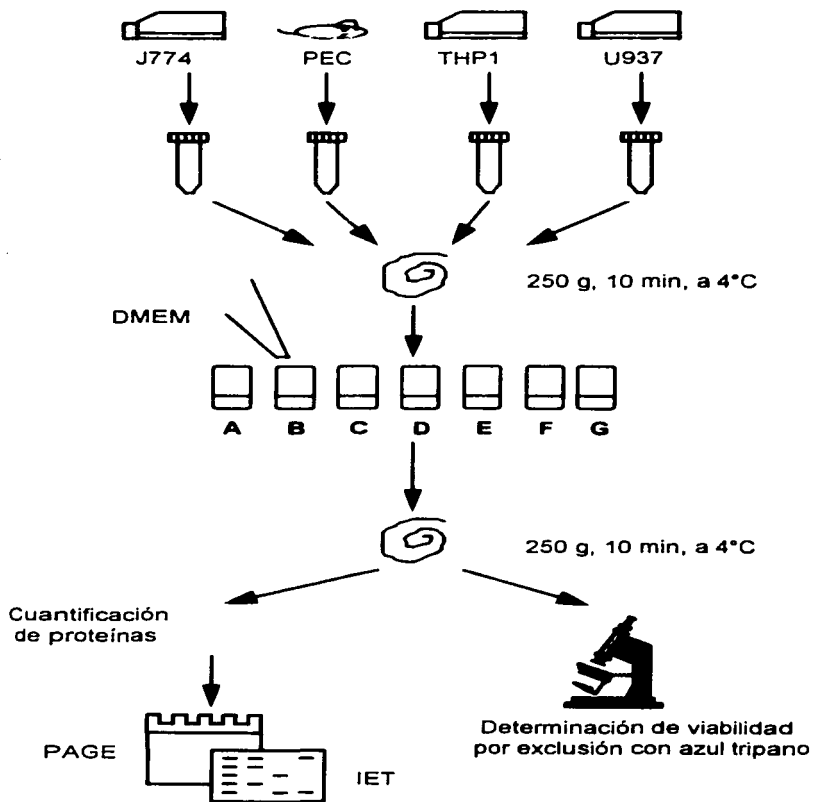


Figura 11. Diseño de los experimentos de Dosis-respuesta. Las diferentes líneas celulares (6×10^5) se incubaron con 25, 50, 150, 300 y 450 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ET (A-E). Como testigos se incluyeron Células+DMEM (F) y ET+DMEM (G).

13. Unión de ags.

El propósito de estos ensayos fue el de conocer el perfil de ags de *T. spiralis* que son unidos por la línea J774, U937, THP1 y las células peritoneales, así como el tiempo en el que estos tipos celulares los unen.

En la Figura 12 se muestra el esquema de realización de estos experimentos. Las células se sometieron al mismo procedimiento que en el apartado 12 de la metodología. Como testigos negativos, se emplearon un tubo que únicamente contenía Mφs + DMEM y otro que solo contenía ET + DMEM y como testigo positivo un tubo con ET + DMEM. En cada ensayo, el ET se empleó a la concentración óptima para cada tipo celular. Los Mφs se resuspendieron en 5 mL de DMEM no suplementado, se determinó la viabilidad por exclusión con azul tripano. Se agregaron 6×10^5 células en el fondo de cada tubo siliconizado para evitar dañarlas. Posteriormente se adicionó la cantidad correspondiente de ES (300 µg/mL para J774 y 150 µg/mL para CEP, U937 y THP1) a cada tubo, se agitaron levemente y se incubaron a 4°C (en hielo) ó a 37°C (en una incubadora con una atmósfera húmeda con 5% de CO₂) durante diferentes tiempos (2, 5, 15, 30 y 60 min). Terminado el periodo de incubación, las células se prepararon para el análisis electroforético como se indicó para los ensayos de dosis/respuesta, en el apartado 12.

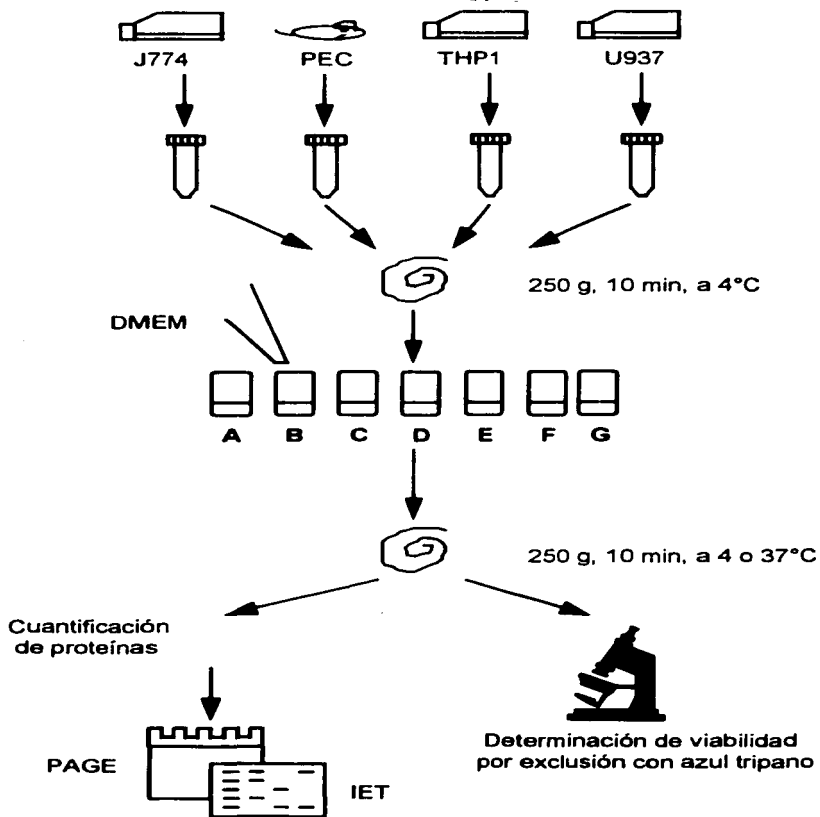
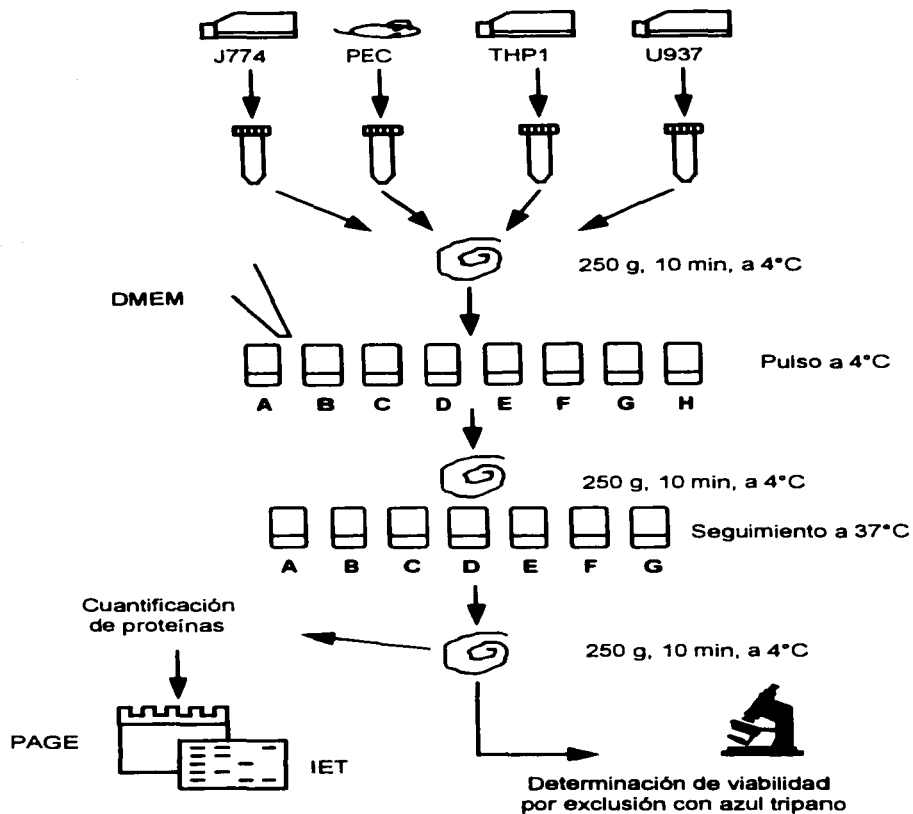


Figura 12. Diseño de los experimentos de unión. Las diferentes líneas celulares (6×10^5) se incubaron con 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ET (en el caso de la línea J774) y con 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ET (para las otras líneas celulares) durante 2, 5, 15, 30 y 60 min (A-E) a 4°C o 37°C. Como testigos se incubaron Células de cada línea + DMEM (F) y ET + DMEM (G).

14. Pulso y seguimiento.

El objetivo de estos ensayos fue el de determinar cuales proteínas del perfil antigénico de *T. spiralis* son procesadas por la línea J774, U937, THP1 y las células peritoneales (CEP) y el tiempo en el que son procesadas.

En la Figura 13 se muestra el esquema de realización de estos experimentos. Las células se sometieron al mismo procedimiento que en el apartado 12 de esta sección. Como testigos negativos, se emplearon un tubo que únicamente contenía Mφs + DMEM y otro que sólo contenía ET + DMEM y como testigos positivos, un tubo con ET y uno con Mφs + ET que funcionó como testigo del ensayo de unión de antígenos. En cada ensayo, el ET se empleó a la concentración óptima para cada tipo celular. Los Mφs se resuspendieron en 5 mL de DMEM no suplementado, se determinó la viabilidad por exclusión con azul tripano. Se agregaron 6×10^5 células en el fondo de cada tubo siliconizado para evitar dañarlas. Posteriormente se adicionó la cantidad correspondiente de ES (300 µg/mL para J774 y 150 µg/mL para CEP, U937 y THP1) a cada tubo, se agitaron levemente y se incubaron a 4°C (en hielo) al tiempo óptimo para cada tipo celular (30 min para J774 y 5 min para CEP, U937 y THP1). Inmediatamente después se centrifugaron a 250 g durante 10 min a 4°C. Después el sobrenadante se retiró con una pipeta Pasteur, los tubos se colocaron nuevamente en el recipiente con hielo y se les agregó 1 mL de solución balanceada de Hank's (Gibco) fría, se agitaron levemente, se les adicionó lentamente más de la misma solución hasta llenarlos y por último se centrifugaron a 250 g durante 10 min a 4°C. Después de este lavado, los Mφs se resuspendieron en 1 mL de DMEM 1% de SFB y se incubaron durante diferentes tiempos en una incubadora a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Terminado el periodo de incubación, se procedió a obtener los paquetes celulares, los cuales se prepararon para el análisis electroforético siguiendo la metodología descrita previamente en los ensayos de dosis/respuesta en el inciso 12.



Figra 13. Diseño de los experimentos de pulso y seguimiento. Los diferentes tipos celulares (6×10^5) se incubaron a su tiempo óptimo y con la cantidad óptima de ET para cada tipo celular a 4°C (A-E). Posteriormente se lavaron y se incubaron durante diferentes tiempos (de 2 min a 24 h) a 37°C. Como testigos se incluyeron Células + ET (F), Células+ET (Testigo de pulso); Células+DMEM (G) y ET+DMEM (H).

VI. RESULTADOS

1. Obtención de anticuerpos específicos anti-*T. spiralis*.

Para la obtención de acs anti-*T. spiralis* se inocularon dos conejos de acuerdo al esquema de inmunización detallado en la metodología. Como puede verse en la Figura 14a, la respuesta de los dos conejos fue similar. Los valores de absorbancia en el ELISA, mostraron que ambos conejos presentaban acs anti-*T. spiralis* a los 14 días. Cuando los valores de absorbancia aumentaron a > de 2.0 (a los 28 días), los conejos se sangraron a blanco y se procedió a conocer la dilución óptima de los sueros. La Figura 14b muestra que aunque todavía se podía observar un patrón de respuesta por IET, utilizando el suero diluido 1:200 (carril 4), las bandas antigénicas se observaban más claras cuando el suero estaba diluido 1:25 (carril 1), por lo que se decidió emplear esta dilución para mantener una sensibilidad óptima en la detección de los ags en los ensayos subsecuentes. Las tiras de PNC incubadas con el suero preinmune de los conejos no presentaron bandas (Figura 14b, carril 5).

2. Preparación del ET.

El procedimiento que se empleó para la obtención de ET es el descrito por Parkhouse y cols., en 1981. Este método presenta la ventaja de ser eficiente, rápido y reproducible, como se muestra en la Figura 15, por lo que se utilizó un solo lote de ET para todos los experimentos que se realizaron (aproximadamente 500 mg totales de ET). Por otro lado, también se demostró que no hubo variación entre los diferentes lotes de ET de larvas infectivas obtenidas de diferentes hospederos (ratones de las cepas NIH, CD1 y C57b1/6), ni tampoco si el ET se preparaba a partir de las larvas recién obtenidas ó congeladas a -20°C o -70°C (no se muestra).

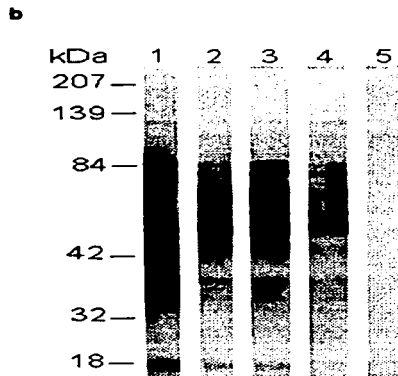
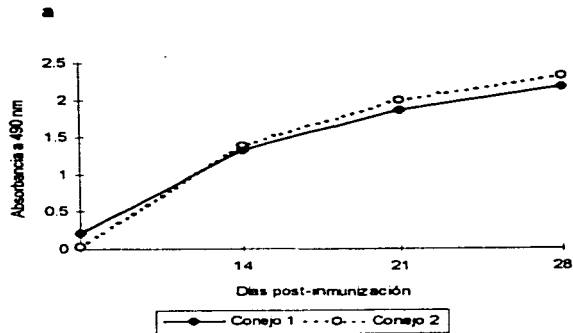


Figura 14. Análisis de la reactividad de los sueros de conejo anti-*T. spiralis*. Los sueros diluidos 1:1000 de los conejos inmunizados con el ET, tomados el día 0, 14, 21 y 28, se analizaron en ELISA (a) y los sueros tomados el día 28 se analizaron por IET (b). Carriles 1-4, suero diluido 1:25, 1:50, 1:100 y 1:200 respectivamente; carril 5, suero preinmune diluido 1:25.

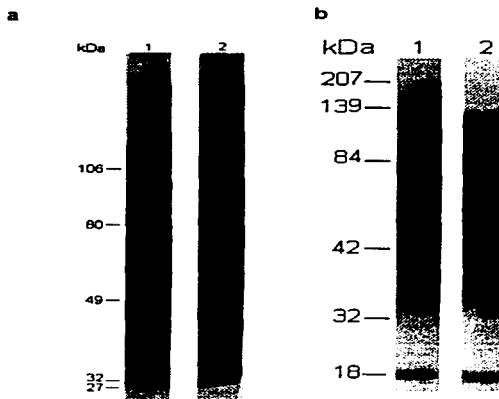


Figura 15. Análisis electroforético e inmunológico del ET de la larva infectiva de *T. spiralis*. El ET se obtuvo como se indicó en la metodología, se separó electroforéticamente en geles de poliacrilamida-SDS (panel a) y se transfirió a papel de nitrocelulosa donde el ET se incubó con un suero hiperinmune de conejo diluido 1:25 y revelado con un conjugado de Proteína A-peroxidasa diluido 1:500 (panel b). Los carriles 1 y 2 representan diferentes lotes de ET.

3. Efecto del ET y DOC sobre las células de la línea J774.

Estos experimentos mostraron que el ET en presencia de DOC provoca la muerte de los Mφs de manera proporcional al tiempo, a la concentración del ET y a la cantidad de DOC presente, independientemente de la presencia o ausencia de inhibidores enzimáticos como se observa en la Figura 16a (los resultados a 30 min de incubación fueron similares y no se muestran). Por lo anterior, se decidió emplear el ET dializado contra PBS pH 8 (el DOC se precipita a pHs más bajos), evitando de esta manera, que los inhibidores enzimáticos y el DOC interfirieran con el tipo de ensayos realizados en este trabajo. Como puede observarse, en la Figura 16b, el patrón de bandas antigénicas es igual para el ET sin dializar que dializado. Por otro lado, en cada experimento a 4°C o 37°C, se incluyó un tubo con ET y se corroboró que el patrón es reproducible (no se muestra).

4. Efecto del los lavados y cambio de tubo sobre los Més de la línea J774.

Los ensayos para averiguar si el ET se pegaba inespecíficamente a los tubos de vidrio, mostraron que se pegaba a las paredes del tubo de manera proporcional a su concentración (Figura 17). Para resolver este problema de pegado, se aumentó el número de lavados hasta 5 y se cambió el tubo hasta 4 veces. Con esta modificación, se logró quitar el pegado del ET (Figura 18b), sin embargo, cuando se verificó la viabilidad de las células en experimentos iniciales de unión, se observó que ésta disminuía hasta un 40% o menos (Figura 18a). Debido a estos resultados, se decidió trabajar con tubos de vidrio 13x100 mm siliconizados en el laboratorio con el reactivo Sigmacote (Sigma) y el número de lavados se disminuyó a uno sin cambiar de tubo. Estas últimas modificaciones, hicieron que el sistema de trabajo fuera óptimo, ya que la viabilidad de las células no disminuyó a lo largo de los experimentos (Figura 18a) y se logró evitar el pegado inespecífico del ET (Figura 18c).

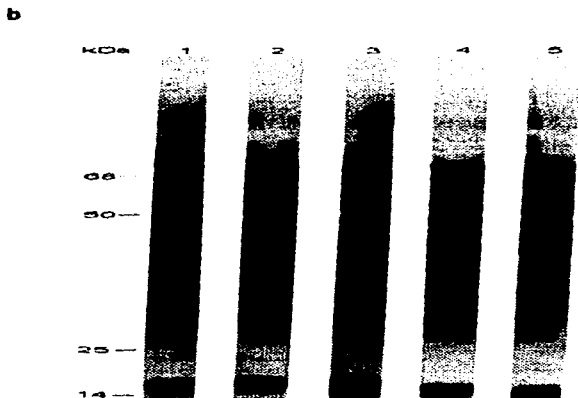
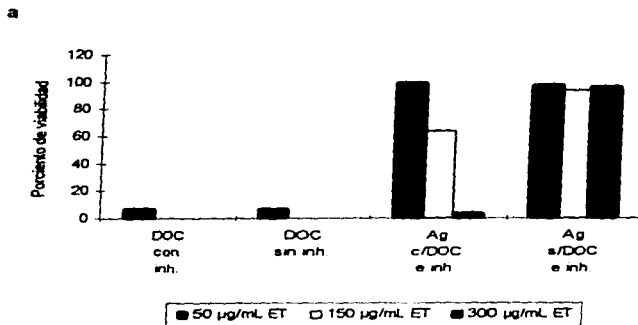


Figura 16. (a) Efecto del deoxicolato de sodio (DOC), inhibidores enzimáticos (TPCK, TLCK y PMSF) y ET sobre la viabilidad celular. Se muestra el porcentaje de viabilidad de los M₀s de la línea J774 incubados con DOC + inhibidores, DOC, ET + DOC o ET a 37°C durante 15 min. (b) IET del ET sin dializar y ET dializado. Carriles 1-2. Diferentes lotes de ET sin dializar, Carriles 3-5. Diferentes lotes de ET dializado.

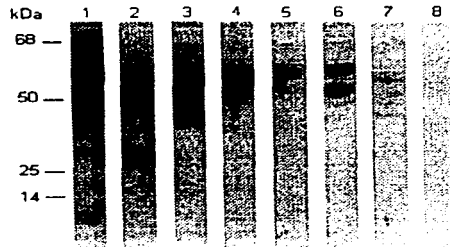


Figura 17. Pegado inespecífico del ET de la larva infectiva de *T. spiralis* a tubos de vidrio. IET de células J774 incubadas 30 min a 4° con diferentes concentraciones de ET y reaccionadas con el suero hiperinmune de conejo anti-*T. spiralis* diluido 1:25. Carril 1. Testigo positivo: ET (40 µg/mL), Carriles 2-6. Células + 25, 50, 150, 300 o 450 µg/mL de ET, Carril 7. ET (450 µg/mL) + DMEM, Carril 8. Células + DMEM.

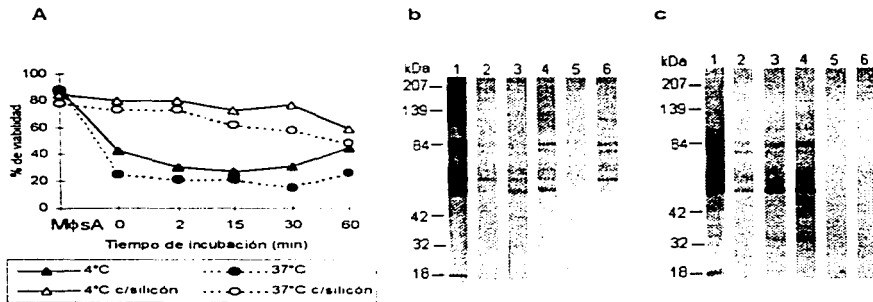


Figura 18. Efecto de los lavados y el uso de tubos siliconizados. (a) Las células J774 se incubaron durante diferentes tiempos con el ET a 4°C ó a 37°C en tubos sin siliconizar y siliconizados. Posteriormente las células que se encontraban en los tubos sin siliconizar se lavaron cinco veces con cuatro cambios de tubo; mientras que las células que se incubaron en tubos siliconizados, se lavaron una sola vez, sin cambiar de tubo. Se muestra el porcentaje de viabilidad obtenido. MφsA, macrófagos antes de las incubaciones con el ET. (b) IET de las células incubadas durante diferentes tiempos con el ET a 4°C en tubos no siliconizados o en tubos siliconizados (c). Carril 1. Testigo positivo: ET (40 µg/mL), Carriles 2-4. Células + 300 µg/mL de ET incubadas 2', 30' y 60' respectivamente, Carril 5. Células + DMEM, Carril 6. ET (300 µg/mL) + DMEM.

5. Ensayos de Dosis/respuesta.

Los ensayos de dosis/respuesta mostraron que la concentración óptima de ET (concentración a la que las células presentan una alta viabilidad) para la línea J774 es de 300 µg/mL (Figura 19a), mientras que para las células de exudado peritoneal (CEP), para la línea U937 y para la línea THP1 es de 150 µg/mL (Figura 19b-d).

En las IET de los experimentos de dosis/respuesta se observa que los patrones de bandas antigénicas que unen las diferentes células son muy similares, mostrando un evidente efecto de dosis/respuesta. Desde incubaciones con 25 µg/mL de ET, las células CEP, THP1 y U937 unen principalmente dos proteínas, una de 58 kDa y otra de 18 kDa, mientras que la J774 une solamente la banda de 58 kDa. Aunque la intensidad y número de las bandas unidas por las diferentes células aumenta proporcionalmente a la concentración de ET durante el tiempo (Figura 19), a las concentraciones de 300 y 450 µg/mL, la viabilidad de las células, excepto la de las J774, disminuye hasta cerca de un 40% y se abate completamente a la última concentración de ET utilizada. Los experimentos de dosis/respuesta a 37°C mostraron resultados similares (no se muestra).

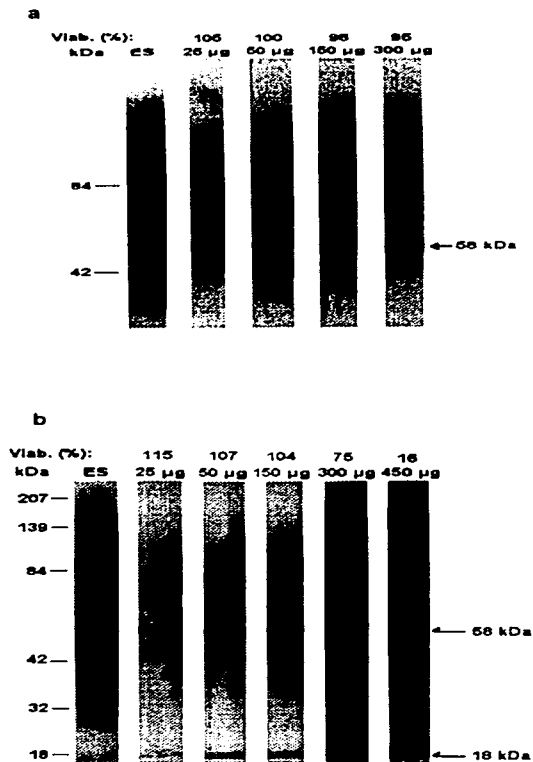


Figura 19. Ensayos Dosis-respuesta. IET de las células J774 (a) y de CEP (b) incubadas con diferentes concentraciones de ET durante 30 min a 4°C. Las células J774 se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 8% y las CEP a geles al 11%, se transfirieron a papel de nitrocelulosa y se incubaron con un suero hiperinmune de conejo diluido 1:25 y revelado con un conjugado de Proteína A-peroxidasa diluido 1:500.

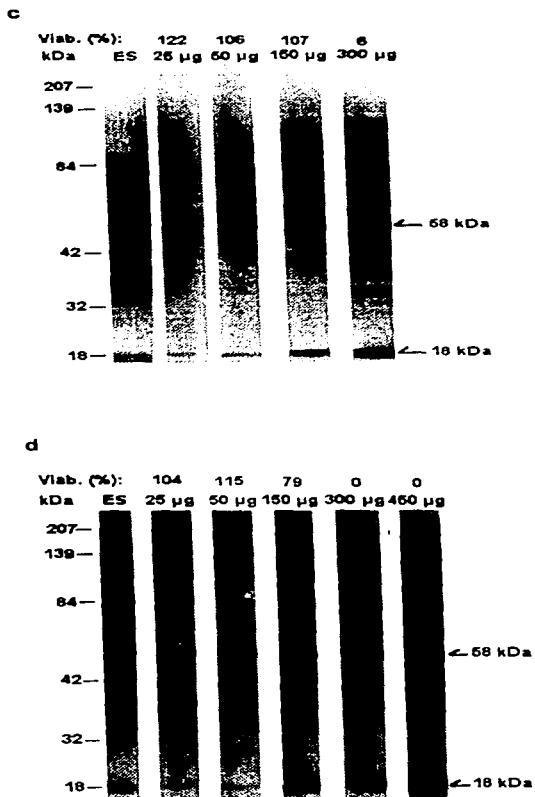


Figura 19. Continuación. IET de las líneas celulares THP1 (c) y U937 (d) incubadas con diferentes concentraciones de ET durante 30 min a 4°C. Los dos tipos celulares se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 11% y se sometieron al mismo procedimiento que los otros tipos celulares.

6. Ensayos de unión de antígenos.

Como se ha mencionado en la sección de metodología, el propósito de los ensayos de unión, fue el de conocer el perfil de ags de *T. spiralis* que son unidos por los diferentes tipos celulares y el tiempo en el que las células los unen. En la Figura 20, se muestran las IET de los lisados de las células incubadas con el ET durante diferentes tiempos a 4°C. Como puede observarse, el patrón general de bandas que unen es muy similar entre las diferentes células aunque existen algunas diferencias, sobre todo en las intensidades de algunas bandas. Comparando dicho patrón con el ET del parásito, se ve que las células unen solo algunos de los ags de éste en mayor o menor grado. Desde los 2 min de incubación con el ET, se puede detectar unión de algunos ags, principalmente los de 18 kDa y 58 kDa, los cuales presentan intensidades altas similares a través de todos los tiempos de incubación. Las células J774, sin embargo, como se observó en los ensayos de dosis/respuesta, unen solamente la banda de 58 kDa. Además de estas bandas, todas las células unen un grupo de ags entre 40 y 100 kDa, el cual se une a tiempos de incubación más largos. Por otro lado, las células peritoneales y las U937, también reconocieron un grupo de ags entre 20 y 40 kDa, aunque con intensidad mas baja.

Los experimentos de unión de ags a 4°C también fueron útiles para determinar el tiempo óptimo de incubación con el ET ("tiempo de pulso") para los ensayos de pulso y seguimiento, ya que a esta temperatura, el metabolismo de las células disminuye y se inhibe el procesamiento. Se determinó que el tiempo en el cual todas las bandas antigénicas son unidas a las células J774, es de 30 min (Figura 20a), mientras que para los otros tipos celulares, es de 5 min (Figura 20b-d). Como se puede ver en esta misma Figura, en los tiempos de incubación posteriores al "tiempo de pulso" para cada tipo celular, el patrón de bandas es el mismo, en cambio en los tiempos de incubación anteriores, no todas las bandas están presentes. En el caso de las células U937 aunque la intensidad de las bandas es más baja a los 5 min que en los tiempos posteriores, ya a este tiempo están presentes todas las bandas.

Para verificar que estos perfiles antigénicos correspondieran a la unión por células vivas, se verificó su viabilidad por exclusión con azul tripano. Como se muestra en las mismas Figuras (20 y 21), la viabilidad de todas las células se mantiene a lo largo de las incubaciones con el ET. A pesar de que las células estuvieron incubadas a una temperatura que les permitía estar metabólicamente activas (unir y procesar antígenos), en los ensayos a 37°C se encontraron resultados similares (Figura 21).

Con respecto a su viabilidad, se observa que ésta se mantuvo constante a través de los diferentes tiempos de incubación, sin embargo, la viabilidad de las células J774 tendió a disminuir ligeramente.

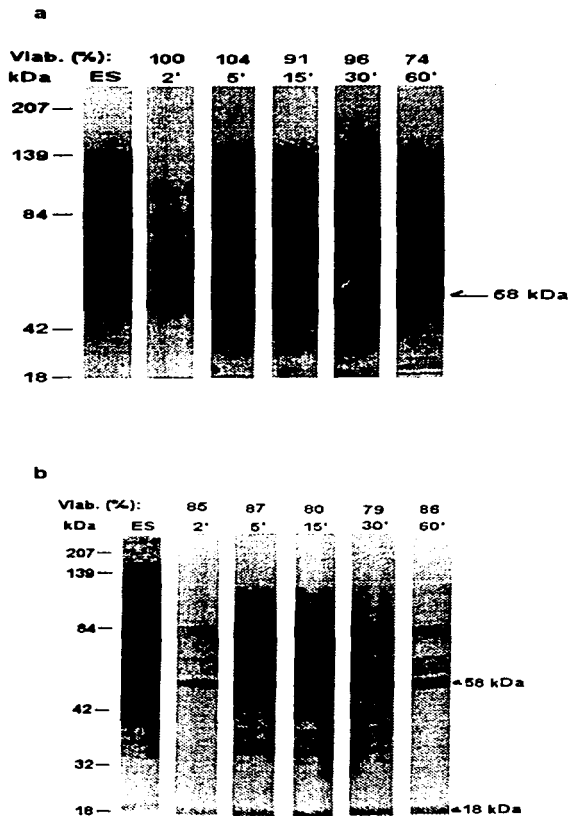


Figura 20. Ensayos de Unión. IET de J774 (a) y CEP (b) cuando se incubaron con ET durante diferentes tiempos a 4°C. Las células J774 se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 8% y las CEP a geles al 11%, se transfirieron a papel de nitrocelulosa y posteriormente se procesaron como se indicó en la Figura 19.

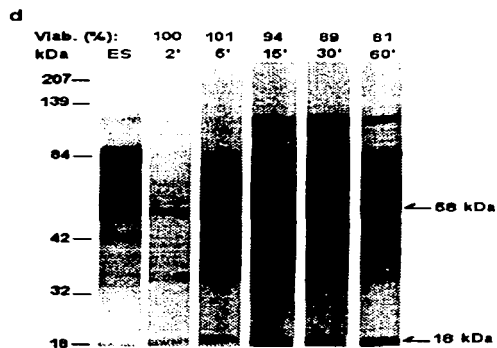
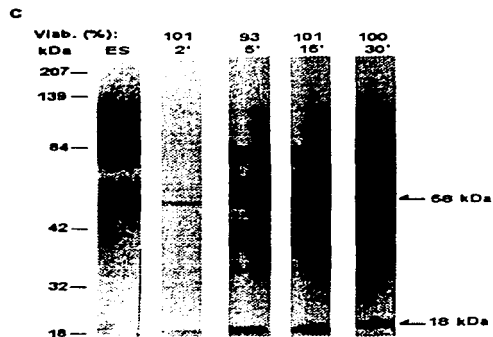


Figura 20. Continuación. IET de las líneas celulares THP1 (c) y U937 (d) cuando se incubaron con ET durante diferentes tiempos a 4°C. Las células se sometieron a geles de poliacrilamida-SDS al 11%, se transfirieron a papel de nitrocelulosa y posteriormente se procesaron como se indicó en la Figura 19.

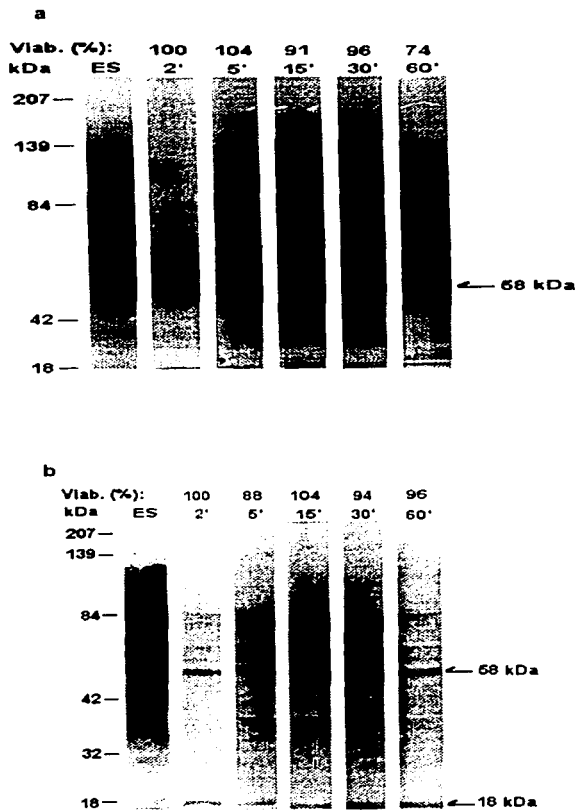


Figura 21. Ensayos de Unión. IET de J774 (a) y CEP (b) cuando se incubaron con ET durante diferentes tiempos a 37°C. Las células J774 se sometieron en un gel de poliacrilamida-SDS al 8%, las CEP a gels al 11%, se transfirieron a papel de nitrocelulosa y posteriormente se procesaron como se indicó en la Figura 19.

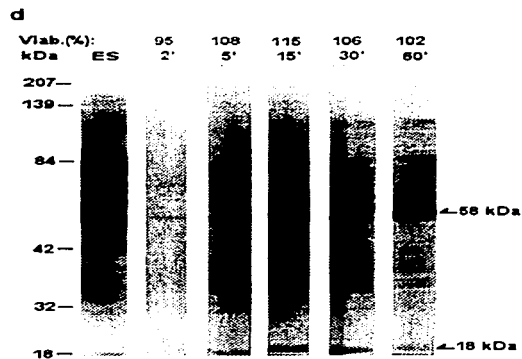
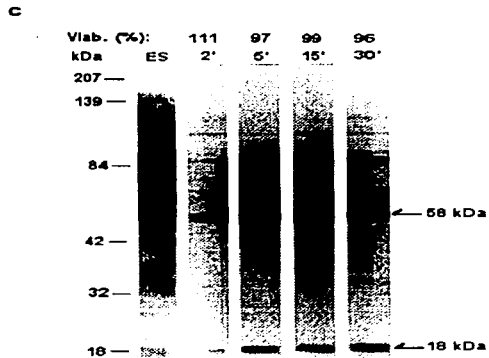


Figura. 21. Continuación. IET de (c) THP1 y (d) U937 cuando se incubaron con ET durante diferentes tiempos a 37°C. Las células se sometieron a geles de poliacrilamida-SDS al 11%, se transfirieron a papel de nitrocelulosa y posteriormente se procesaron como se indicó en la Figura 19.

7. Pulso y seguimiento de antígenos.

Para determinar cuáles ags unidos por las células son procesados, se realizaron ensayos de pulso y seguimiento, incubándolas con el ET a 4°C durante el tiempo adecuado para la unión de todos los ags según cada línea celular y se hizo el seguimiento a diferentes tiempos a 37°C. En estos ensayos, la viabilidad de las células fue un factor muy importante ya que ésta nos indicaba que las células estuvieran activas, por lo que se verificó por exclusión con azul tripano. La Figura 22 muestra que la viabilidad de las diferentes células se mantuvo a lo largo de los experimentos.

Las IETs obtenidas de estos ensayos se muestran en la Figura 23, en donde puede observarse que la desaparición y disminución en la intensidad de bandas con todos los tipos celulares. Los antígenos de 18 kDa y 58 kDa, estuvieron presentes, aún en experimentos realizados hasta 24 h de incubación (Figuras 23b y d).

En el caso de las células J774, no se observaron diferencias en el patrón de bandas a lo largo de las incubaciones hasta los 30 min ya que sus intensidades permanecieron constantes; a los 60 min, todas las bandas presentan una intensidad mas baja, (Figura 23a y 24a). Mediante el análisis densitométrico se evidenció que de los antígenos que disminuyen su intensidad, dos de ellos, uno de aproximadamente 72 kDa y el otro de 40 kDa, desaparecen a los 15 min y a los 30 min respectivamente (Figura 24a).

Los experimentos con las células peritoneales y las U937 fueron realizados hasta las 24 h, sin una disminución significativa de su viabilidad a través del tiempo (Figura 22); sin embargo, la viabilidad de las células THP1 disminuyó hasta más de un 40% cuando se incubaron a estos tiempos, por lo que únicamente se realizaron experimentos con estas células hasta las 8 h (Figura 22). En el caso de las células THP1 entre 1 h y las 4 h de incubación se observó la desaparición de algunas bandas (ags de 91, 94, 98 y 100 kDa) (Figura 24c.2), así como la disminución en intensidad de otras (ags de 50, 64, 69, 72, 85 y 123 kDa) (Figura 24c.1). En estas células algunas bandas permanecieron durante todo el experimento (ags de 58 y 102 kDa) (Figura 24c).

En relación con las células peritoneales y la línea U937, se observó la presencia de una banda de aproximadamente 80 kDa, la cual aparece a las 4 h de incubación y permanece hasta las 24 h (Figuras 23b y d y 24b y d). Así mismo, se encontraron otras 10 bandas entre 40 y 100 kDa, además de la banda de 58 kDa (Figura 24b y d) las cuales permanecieron durante el experimento.

En la Tabla V se resumen los resultados obtenidos en los experimentos de pulso y seguimiento en las diferentes líneas celulares.

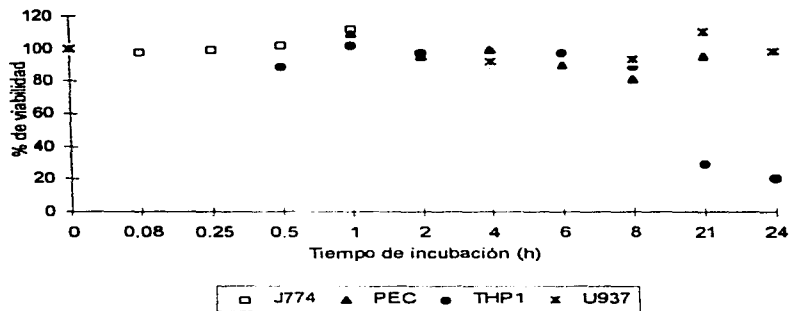


Figura 22. Ensayos de Pulso y seguimiento. Porcentaje de viabilidad que mostraron los diferentes tipos celulares después del seguimiento a 37°C.

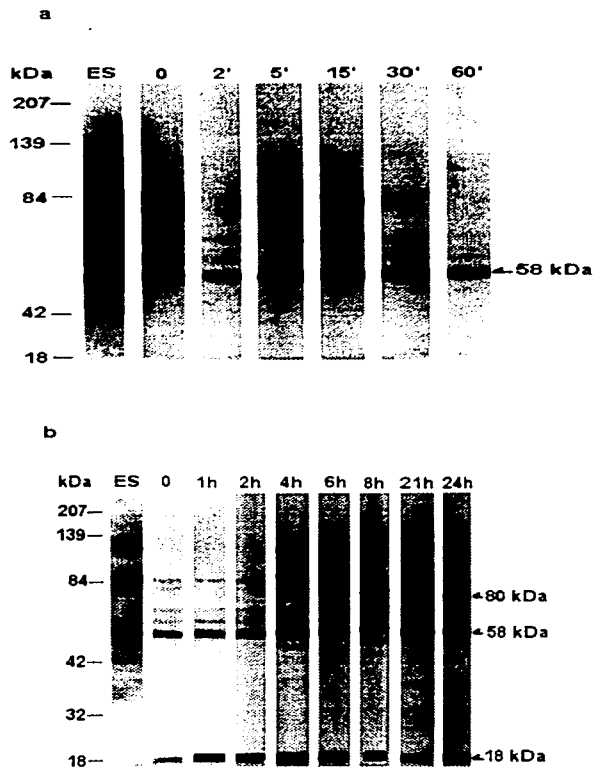


Figura 23. Ensayos de Pulso y seguimiento. Las células J774 (a) se pulsaron con 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ET durante 30 min (carril al tiempo 0) y las CEP (b) pulsaron con 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ET durante 5 min (carril al tiempo 0) a 4°C. Terminado el tiempo de pulso se lavaron y se incubaron diferentes tiempos a 37°C. Posteriormente las células se sometieron a electroforesis, se transfirieron y se procesaron como se indicó en la Figura 19. Las células J774 se corrieron en un gel al 8%, mientras que las CEP en un gel al 11%.

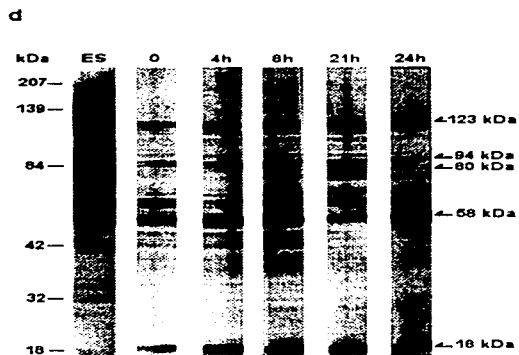
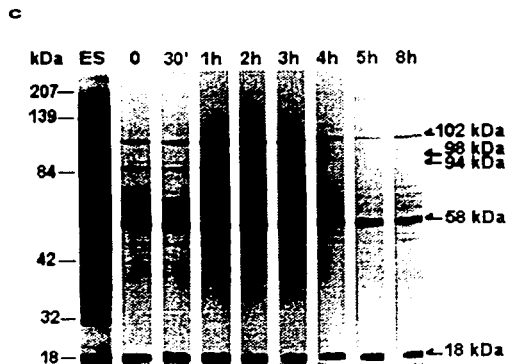


Figura 23. Continuación. Las células THP1 (c) y las células (d) U937 se pulsaron con 150 $\mu\text{g/mL}$ de ET durante 5 min (carril al tiempo 0). Terminado el tiempo de pulso, se lavaron y se incubaron diferentes tiempos a 37 C. Posteriormente las células se sometieron a electroforesis, se transfirieron y se procesaron como se indicó en la Figura 19.

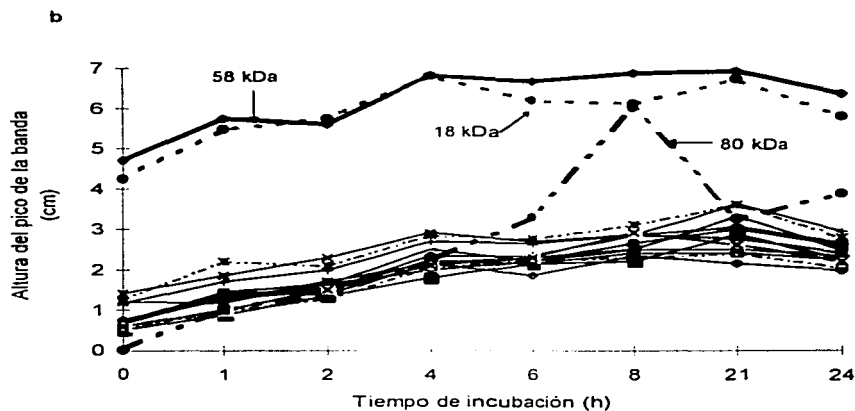
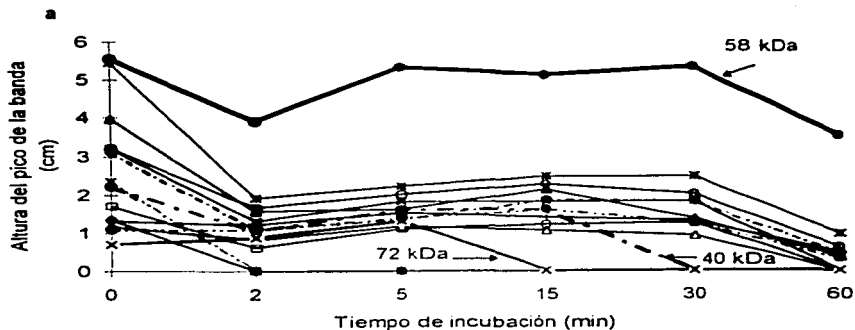


Figura 24. Densitometría de las IETs de los ensayos de pulso y seguimiento de las líneas celulares J774 (a) y CEP (b). La cantidad de cada antígeno presente en la IET, se determinó mediante un programa normal de densitometría. La altura del pico de cada banda se midió en cm para cada uno de los tiempos de incubación.

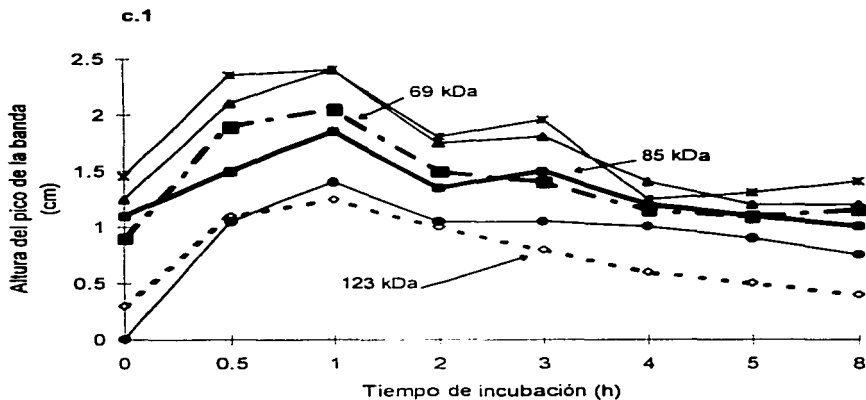
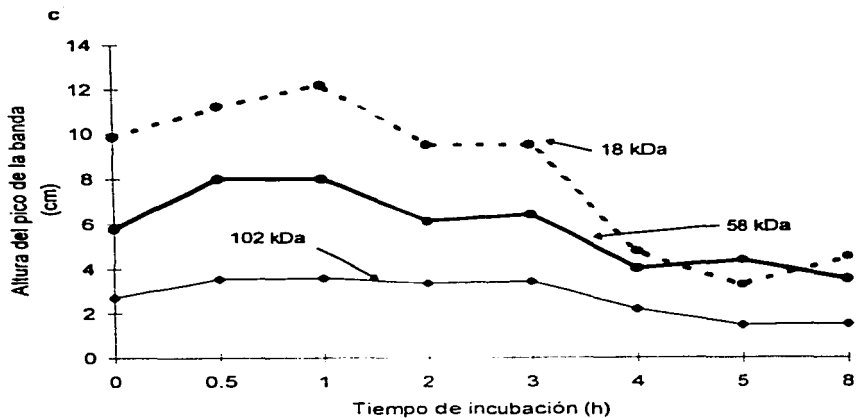


Figura 24. Densitometría de las IETs de los ensayos de pulso y seguimiento de la línea celular THP1, (c) y (c.1). La cantidad de cada antígeno presente en la IET, se determinó mediante un programa normal de densitometría. La altura del pico de cada banda se midió en cm para cada uno de los tiempos de incubación.

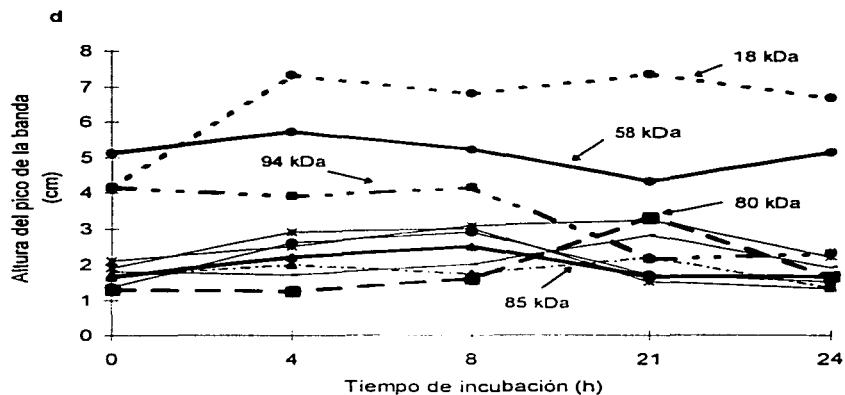
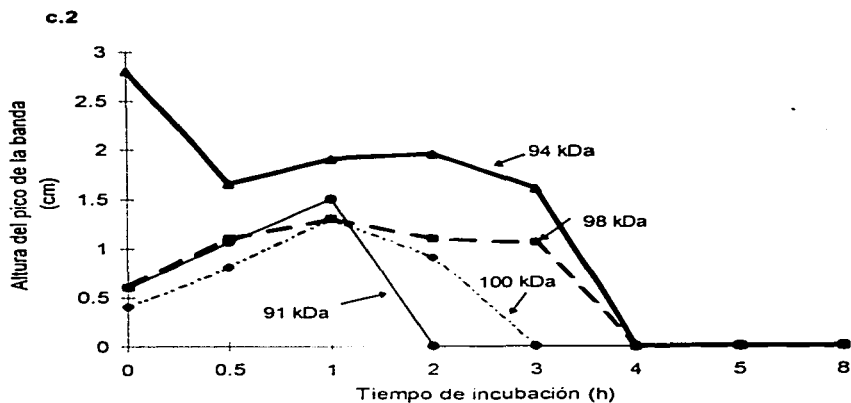


Figura 24. Densitometría de las IETs de los ensayos de pulso y seguimiento de las líneas celulares THP1 (c.2) y U937 (d). La cantidad de cada antígeno presente en la IET, se determinó mediante un programa normal de densitometría. La altura del pico de cada banda se midió en cm para cada uno de los tiempos de incubación.

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

Tabla V. Antígenos que presentaron cambios en los ensayos de pulso y seguimiento.

	Bandas (kDa)	Tipo celular			
		J774	CEP	THP1	U937
Antígenos que permanecen	18	+	+	+	+
	58	+	+	+	+
Antígenos que desaparecen	102	-	-	+	-
	72	+	-	+	-
	91	-	-	+	-
	94	-	-	+	-
	98	-	-	+	-
	100	-	-	+	-
Antígenos que disminuyen su intensidad	50	-	-	+	-
	64	-	-	+	-
	85	-	-	+	-
	123	-	-	+	-
Antígeno que aparece en el tiempo	80	-	+	-	+

*Disminuye la intensidad.

+presencia de la banda.

-ausencia de la banda.

VII. DISCUSIÓN

La generación de una respuesta inmune hacia cualquier antígeno puede depender del tipo de CPA que lo procesa, por lo que es interesante el estudio de los eventos de procesamiento y presentación de antígenos que originan los péptidos que reconocerán los LT. En la triquinelosis no existen reportes acerca de este tipo de estudios, por lo que el objetivo de este trabajo fue hacer un análisis preliminar sobre la unión y procesamiento de antígenos solubles de un extracto crudo de la larva L₁ de *T. spiralis* (ET) efectuado por células peritoneales de ratón, además de las líneas celulares J774, THP1 y la U937, utilizando como método de detección la IET .

Al analizar los ensayos de dosis/respuesta por IET (Figura 19), se observó que el patrón de bandas reconocido por las diferentes células fue similar al que se encontró en los experimentos de unión. Todos los tipos celulares, a excepción de las células J774, unieron varios componentes pero principalmente las moléculas de 58 y 18 kDa desde incubaciones con 25 µg/mL del ET (Figura 20), sugiriendo que ambos antígenos están presentes en altas concentraciones en el ET, que son inmunodominantes, y generan una respuesta alta de anticuerpos y que se unen ávidamente a las CPAs.

Sin embargo, la viabilidad de las líneas celulares bajó hasta un 40%, cuando se emplearon concentraciones altas de ET (300 y 450 µg/mL), observándose el mismo patrón de bandas en las IETs. Estos resultados indican que el patrón de bandas observado a esta(s) concentración (es) es debido, muy probablemente, a que el antígeno se pega a los detritus celulares y células muertas (Figuras 19b-d). Así mismo, estos resultados sugieren que el ET tiene algún componente que es tóxico para las células a concentraciones altas.

Los ensayos de unión mostraron por IET que los diferentes tipos celulares no unen todos los antígenos presentes en el ET (Figuras 20 y 21), sugiriendo que estas células tienen la capacidad de seleccionar antígenos. Sin embargo, no sabemos si otro tipo celular que no sea CPA profesional une de manera inespecífica estos antígenos.

Con respecto a la unión del antígeno a una CPA, ésta constituye el paso inicial en la **presentación** de antígenos y puede ocurrir de manera específica mediante receptores o de **manera inespecífica** (pinocitosis de fase fluida), con eficacias y especificidades variables (Abbas y cols., 1991) en donde la unión de antígenos está directamente relacionada a su **concentración**, por lo que se trata de un proceso no saturable (Howard y Chesnut, 1985).

Con los experimentos de unión que se realizaron en este trabajo no se puede conocer la vía por la cual las células unieron los antígenos, sin embargo, se observó que a tiempos cortos existe una selección de ciertos antígenos por parte de la CPA, además de que en el transcurso del experimento, los mismos antígenos se observaron con mayor intensidad, lo que sugeriría la participación de un mecanismo específico de unión. Sin embargo, no puede excluirse el que los antígenos puedan unirse de manera inespecífica a las CPAs. Así mismo las bandas de 18 y 58 kDa posiblemente son unidas por un mecanismo específico similar ya que fueron unidas desde tiempos tempranos (2 min) (Figuras 20 y 21).

A este respecto, McCoy y cols. (1993), mostraron que cuando se incuban diferentes CPAs con concentraciones limitantes (0.5 μ M) de antígeno (citocromo C-transferrina férrica humana, Cc-Tr), éste se une vía receptores para transferrina desde tiempos tempranos (5 min); mientras que cuando se incubaba con concentraciones mayores (10 μ M), en el caso de una línea de M ϕ s, éste se internaliza predominantemente por un mecanismo no mediado por receptor. Dados estos resultados, se sugiere que ambos mecanismos de unión ocurrieron en nuestros ensayos, debido a que empleamos un ET del parásito y debido a que no se realizaron cinéticas de unión a diferentes concentraciones del antígeno es posible que la concentración seleccionada por cada tipo celular permita la unión específica y/o inespecífica a la célula.

El tiempo de unión requerido por las células que se emplearon en este trabajo (de 5 a 15 min) es similar al encontrado por otros autores. Así, Ziegler y Unanue (1981) encontraron que la bacteria *Lysteria monocytogenes* se une a los M ϕ s de 5 a 10 min. Así mismo, Fridkis-Hareli y cols. (1994) encontraron que el Cop 1 (copolímero que suprime la encefalomielititis experimental en varias especies animales y presenta una reactividad inmunológica cruzada con la proteína básica de la mielina, PBM) se une durante los primeros 5 min, mientras que la PBM se une a los 15 min.

Sin embargo, se ha observado que este tiempo de unión depende tanto de las características fisicoquímicas del antígeno, como del tipo de célula accesoria de que se trate, por lo que este tiempo puede variar. En el caso de algunos antígenos puros tales como la ovoalbúmina (OVA), la hemocianina de la cazueta de mar (KLH), la insulina, la IgG de conejo-anti-ratón y la β 2-microglobulina, se ha mostrado que su unión puede realizarse hasta los 45 min (Howard y cols., 1982). Por otro lado, Pérez (1993) encontró que el tiempo de unión de un extracto crudo del cisticerco de *T. solium* es de 15 a 30 min.

Mediante los ensayos de pulso y seguimiento se trató de analizar el procesamiento de antígenos efectuado por las diferentes células y se encontró que éste es parcial y heterogéneo, iniciando después de 1 a 2 h de incubación (Figura 23). Sin embargo, a pesar de que en las IETs se observa la desaparición de bandas, disminución de la intensidad de otras bandas así como la aparición de otras, no se puede determinar si este procesamiento se llevó a cabo mediante la internalización de los antígenos o si se realizó en la superficie de las CPAs, por lo que se requiere de estudios adicionales, p. ej. empleando inhibidores de proteasas, para conocer el sitio donde ocurre el procesamiento de éstos.

Diferentes estudios han mostrado que el tiempo de pulso con el antígeno y de procesamiento varía desde unos pocos min hasta horas (este último dependiendo de la concentración del antígeno y la temperatura) (Lombardi y cols., 1987). Por ejemplo, Mondragón (1988) utilizando la línea J774 como CPA y como método de detección la IET y un suero hiperinmune de conejo anti-*M. tuberculosis* o sueros de pacientes, encontró que el procesamiento de proteínas de secreción de *M. tuberculosis* también es parcial, que el tiempo de pulso es de 15 min y que el de procesamiento inicia a los 5 min de incubación; mientras que Pérez en 1993 (utilizando la misma línea celular como CPA y como antígeno un extracto total del cisticerco de *T. solium* y la misma metodología) encontró que el tiempo de pulso con este antígeno es de 1 h y que el procesamiento inicia desde los 2 min de incubación, encontrando una banda de 73 kDa resistente a la degradación.

Por otro lado, las CPAs empleadas en este trabajo presentaron algunas diferencias en su capacidad para procesar antígenos y en el tiempo en el que iniciaban el procesamiento. Por ejemplo, las células peritoneales (CEP) y las U937 produjeron un antígeno de 80 kDa que apareció a las 4 h de incubación y se acumuló a lo largo del tiempo. En las CEP, este antígeno, tuvo una máxima acumulación a las 8 h, disminuyendo posteriormente y aumentando a las 24 h; mientras que en las células U937, este antígeno se acumuló hasta las 21 h para posteriormente disminuir a las 24 h (Figura 23b y d). La aparición de esta banda sugiere que se trata de un producto de procesamiento de algún antígeno de peso molecular mayor que no es detectado con el sistema empleado, y que al ser degradado produce un producto que se acumula exponiendo algún(os) epítope(s) reconocidos por los anticuerpos anti-*T. spiralis*. Posteriormente este antígeno probablemente es degradado a péptidos más pequeños (no detectados con nuestro sistema) ya que su intensidad disminuyó. Si se comparan las IETs de las CEP y las células J774 (Figura 23a y b), las cuales provienen de ratones hembra de la cepa BALB/c, podemos observar que

existen diferencias como la presencia del antígeno de 80 kDa en las CEP y no en las células J774. Probablemente éstas se deban principalmente a que las células peritoneales eran frescas, es decir, provenían de animales recién sacrificados, mientras que la línea J774 se ha mantenido en cultivo por tiempos prolongados y quizás éstas hayan adquirido algunas modificaciones.

Cuando se compararon los patrones de bandas obtenidos por IET de las células THP1 y las U937, ambas líneas humanas de diferente origen, también se observaron diferencias entre ellas (Figura 23c y d). La IET de las células THP1 mostró que estas células procesaron completamente algunos antígenos, a otros sólo parcialmente y a otros habían permanecido sin ningún cambio. En el caso de las células U937, éstas aparentemente no fueron eficientes para procesar antígenos ya que el patrón de bandas que se observó en su IET es similar durante todos los tiempos de incubación. Probablemente las U937 presentan una batería de enzimas proteolíticas muy diferentes no sólo con respecto a las THP1 sino también a las CEP y las J774. Otra posible explicación para un deficiente procesamiento de antígenos por parte de estas células, puede ser la temperatura, ya que el pulso con el ET fue a 4°C y el seguimiento a 37°C; y como Harding y Unanue (1990) mostraron con su sistema de procesamiento de antígenos (LB y lisozima), cuando el pulso con el antígeno es a temperaturas bajas (4 y 18°C) y el seguimiento a 37°, las CPAs son incapaces de procesar y presentar a la lisozima. Otra explicación en el caso de internalizar el antígeno, pudiera ser por el hecho de que las células THP1 presentan funciones de macrófagos maduros (a los 30 min termina de fagocitar eritrocitos cubiertos con anticuerpos anti-eritrocitos) (Tsuchiya y cols., 1982), mientras que la U937 es una línea menos madura y presenta una fagocitosis débil (solo el 20% de ellas fagocitaron partículas de látex, *Staphylococcus aureus* fijados) (Sundström y Nilsson, 1976). Sin embargo se requieren de estudios adicionales que lo corroboren.

Por otro lado, aunque encontramos diferencias en el procesamiento entre cada uno de los tipos celulares, también pudimos observar algunas similitudes, principalmente la presencia de dos antígenos, uno de 18 kDa y otro de 58 kDa que a lo largo de todas las incubaciones tanto en los experimentos de unión como en los de pulso y seguimiento, no sufrieron ningún cambio (la banda presenta una misma intensidad). Ambos antígenos, pueden ser resistentes al procesamiento, sin embargo, el de 18 kDa probablemente sea una mezcla de antígenos procesados que han expuesto epitopes reconocidos por los anticuerpos anti-*T. spiralis*.

Así mismo, la resistencia de algunos antígenos al procesamiento puede explicarse de diferentes maneras. Por ejemplo, Yamada y Kennedy (1981) sugirieron que la resistencia de una molécula al procesamiento, puede deberse a que ésta permanezca secuestrada en un compartimento celular inaccesible a la degradación; o que permanezca atrapada por algún receptor que no medie su internalización hacia compartimentos donde ocurra degradación y que esté siendo continuamente reciclada hacia la membrana. Por otro lado, Jacquier-Sarlin y cols. (1995) sugirió que el procesamiento puede prevenirse por la interferencia estérica de los receptores a los que se une un antígeno. Otra explicación, es que la molécula pueda estar unida a alguna región de la membrana que no participa en la endocitosis, manteniendo de esta forma su estructura original y por tanto induciendo una respuesta humoral dirigida hacia determinantes conformacionales del antígeno nativo unido a la membrana de las CPAs.

Actualmente se considera que los epitopes reconocidos por los LT, son independientes de la estructura secundaria y terciaria nativa del antígeno, por lo que las proteínas intactas o moléculas no procesadas no pueden normalmente ser reconocidas, sugiriendo que el epitope lineal reconocido por un LT en particular, debe acomodarse en el sitio de unión de la molécula MHC. Sin embargo, Mills y cols. (1986) al caracterizar clonas de LT específicas para la hemaglutinina del virus de la influenza, encontraron que éstas reconocían epitopes conformacionales. Aunado a lo anterior, Kim y cols. (1985), encontraron que un mismo antígeno puede ser procesado en diferentes sitios dependiendo del tipo de CPA que se emplee. Así, encontraron que la línea de LB A20 procesa el PPD mediante un mecanismo unido a la membrana y que no necesita ser internalizado para ser procesado y presentado a hibridomas de T; mientras que cuando la CPA era la línea de Mφs P388, el PPD se procesa en los lisosomas.

Además, aunque anteriormente se pensaba que todos los antígenos debían ser procesados, se ha observado que no existe correlación entre el tamaño de un antígeno y su requerimiento para ser procesado (Chain y Levine, 1993). De esta manera, se ha visto que existen proteínas largas y pequeñas que requieren procesamiento como la OVA, la colágena tipo II o la apamina (Shaw y Chain, 1989; Manoury-Schwartz y cols., 1995; Regnier-Vigouroux y cols., 1988); proteínas largas y polipéptidos pequeños que no requieren procesamiento como el fibrinógeno, la proteína básica de la mielina (PBM) o como el copolímero 1 (competidor de la PBM) (Lee y cols., 1988; Fridkis-Hareli y cols., 1994, 1995);

o proteínas que retienen alguna estructura secundaria después del procesamiento como sucede con la insulina (Naquet y cols., 1987).

El extracto total con el que trabajamos está constituido principalmente por antígenos de superficie (51, 55, 97 y 105 kDa) y de excreción-secreción (45-100 kDa), que en conjunto se les ha llamado antígenos TSL-1 (Appleton y cols., 1991). Estos antígenos comparten un epítopo N u O-glicosilado común, la D-tivelosa, la cual tiene la capacidad de actuar como un inductor de anticuerpos independientemente del genotipo del hospedero, de la especie y de la vía de acceso que tenga para estar en contacto con el sistema inmune (Appleton y cols., 1991, Denkers y cols., 1990 a, 1990b; 1991; Wisnewski y cols., 1993). Es probable que el antígeno de 58 kDa sea semejante al antígeno TSL-1 de 55 kDa, ya que fue reconocido de manera intensa por el suero hiperinmune anti-*T. spiralis* empleado en este trabajo y que su resistencia al procesamiento puede deberse a sus características propias. A este respecto, Unanue y Askonas (1968) observaron que los productos catabolizados por las CPAs no son inmunogénicos, mostrando que la resistencia al procesamiento puede estar relacionada con la inmunogenicidad de los antígenos; mientras que Unanue y Cerottini (1970), mostraron que las moléculas que permanecen en la célula sin cambios si lo son. Además, Unanue y Allen (1986) mostraron que la inmunogenicidad de la hemocianina en células fagocíticas se asocia con la persistencia de una pequeña fracción de antígeno. Por otro lado, si el antígeno de 58 kDa pertenece al grupo TSL-1, podría ser además un antígeno timo-independiente, ya que estos incluyen polisacáridos que no pueden ser procesados y presentados a LT restringidos por moléculas clase II (Abbas y cols., 1991; Zisman y cols., 1993) o un superantígeno, ya que se ha observado que éstos no son internalizados pero son presentados intactos (fuera del sitio de unión del péptido de la molécula del MHC) y reconocidos por una parte lateral de la cadena V β del TCR de los LT (Abbas y cols., 1991; Kotzin, 1994). Por todo lo antes mencionado, resulta de interés estudiar si en especial el antígeno de 58 kDa en presencia de CPAs es capaz de estimular a LT.

Conociendo que los determinantes antigénicos que estimulan a los linfocitos T son pequeños, de 8 a 20 aminoácidos (Howard y cols., 1982; Unanue, 1984; Howard; Chesnut, 1985 y Hämmerling y Moreno, 1990), y que en su mayoría son productos del procesamiento que sufrió el antígeno en una CPA, se esperaría que al realizar ensayos de pulso y seguimiento, se pudieran encontrar péptidos de bajo peso molecular como resultado del procesamiento. Sin embargo, en los experimentos de pulso y seguimiento con las células J774, CEP y THP1 no se detectaron péptidos de menor peso molecular generados del

procesamiento de algunos antígenos. Estos resultados pueden tener varias explicaciones. Por ejemplo, puede ser que el tamaño de los fragmentos que se generaron sea tan pequeño que no se pudieron detectar en un gel de acrilamida-SDS, debido a que esta técnica presenta un poder de resolución insuficiente para que se puedan detectar péptidos de menos de 10 kDa (Schägger y Von Jagow, 1987). En apoyo a esta explicación, Chain y cols., en 1986, al estudiar el procesamiento de la hemocianina de la cazuela de mar (KLH) marcada con ^{125}I por células dendríticas y Mφs, no pudieron detectar por autoradiografía en geles de poliacrilamida-SDS, los péptidos que se habían generado. Por otro lado, Howard y cols., en 1982, utilizando como antígeno a la proinsulina (proteína pura), encontraron que los fragmentos producidos en el procesamiento, se podían detectar en geles de poliacrilamida; mientras que cuando utilizaban un extracto más complejo constituido por proteínas de diferentes pesos moleculares, los péptidos generados del procesamiento, no se resolvían eficientemente en este mismo tipo de geles. Otra explicación para la falta de detección de péptidos de bajo peso molecular puede ser el sistema de revelado que se empleó, ya que los antígenos degradados por las CPAs, pierden epítopes reconocidos por los anticuerpos anti-*T. spiralis*.

Así, en un estudio utilizando como antígeno al toxoide tetánico marcado con ^{125}I , Davidson y Watts (1989) pudieron detectar a los 45 min., péptidos productos del procesamiento, de alrededor de 14 kDa. Lo anterior se logró debido a que en su sistema de detección no utilizaron anticuerpos, sino que marcaron radiactivamente a su antígeno como se mencionó anteriormente y emplearon un gel de alta resolución que separa a los péptidos de alto peso molecular de los de menor peso y por tanto se hace posible detectar péptidos con pesos moleculares de los 2 a los 50 kDa (Schägger y Von Jagow, 1987).

En resumen, en este estudio, encontramos que algunos antígenos observados en las IETs de los experimentos de pulso y seguimiento desaparecieron, otros disminuyeron su intensidad y otros permanecieron con la misma intensidad, sugiriendo que había ocurrido procesamiento parcial de antígenos realizado por los diferentes tipos celulares. Posiblemente sea necesario realizar más experimentos a tiempos de incubación mayores para poder observar cambios más evidentes y considerar el implemento de otros controles para estos ensayos como el empleo de otras células que no sean CPAs profesionales, para apoyar más los resultados obtenidos.

El análisis de la unión y procesamiento de antígenos en el sistema utilizado resultó ser complicado, debido al propio sistema de trabajo y a que se empleó una mezcla compleja de antígenos. Por otro lado, con los experimentos que realizamos, no se puede saber si el procesamiento que se observó para algunos antígenos es a nivel de membrana o si se lleva a cabo en el interior de las CPAs, por lo que se requiere hacer estudios mas profundos encaminados al conocimiento del procesamiento de antígenos de este parásito. Sin embargo, este trabajo, da a conocer algunos de los antígenos de un ET del parásito que pueden ser unidos y aparentemente procesados por diferentes CPAs, e inicia una línea de investigación que incluye la evaluación de la participación de los antígenos seleccionados por las CPAs en la generación de una respuesta inmune celular.

Los estudios subsecuentes en esta área deben implementar el uso de antígenos marcados, purificados o péptidos sintéticos, el empleo de otras técnicas complementarias con poder resolutivo de buena calidad, el uso de inhibidores enzimáticos que ayude a discernir entre la internalización y procesamiento en el interior de la célula y el procesamiento a nivel de membrana de los antígenos y la producción tanto de anticuerpos monoclonales como de clones de linfocitos T específicas, para de este modo determinar los epítopes involucrados en la generación de una respuesta efectiva y tener un conocimiento más profundo de las interacciones celulares que se llevan a cabo para originarla.

VIII. CONCLUSIONES

- Las células J774, CEP, U937 y THP1 unen algunos antígenos presentes en el extracto soluble, mostrando un patrón antigénico similar.
- Las líneas celulares unen un grupo de antígenos de entre 40 y 100 kDa, los cuales aparecen a través de los diferentes tiempos de incubación a 4 y a 37°C.
- Las líneas celulares unen desde los 2 min de incubación principalmente dos antígenos, uno de 18 kDa y otro de 58 kDa.
- La desaparición de bandas, la disminución de intensidad de otras y la permanencia de bandas sin cambio observadas en las IETs de los ensayos de pulso y seguimiento sugieren que el procesamiento de antígenos es parcial para todos los tipos celulares.
- Las células J774 comienzan el procesamiento a los 60 min, mientras que las THP1, las CEP y las U937 empiezan a las 4h.
- En las células peritoneales y las U937 aparece una banda de 80 kDa a las 4 h que probablemente se trate de un producto del procesamiento.
- El antígeno de 18kDa podría ser un antígeno resistente al procesamiento, aunque puede ser también una mezcla de antígenos procesados, mientras que el antígeno de 58 kDa, fue resistente a la degradación.

IX. REFERENCIAS

- ABBAS A. K., LICHTMAN A. H. y POBER J. S. 1991. Antigen presentation and T cell antigen recognition. In: Cellular and molecular immunology. Saunders W. B. Philadelphia, PA. USA., pp. 115.
- AKIYAMA K., KAGAWA S., TAMURA T., SHIMBARA N., TAKASHINA M., KRISTENSEN P., HENDIL K. B., TANAKA K. y ICHIHARA A. 1994. Replacement of proteosome subunits X and Y by LMP7 y LMP2 induced by interferon- γ for acquirement of the functional diversity responsible for antigen processing. *FEBS*. **343**: 85.
- ALCANTARA P. y CORREA D. 1993. Human humoral immune responses against *Trichinella spiralis*. *Int. J. Parasitol.* **23**: 657.
- ALCANTARA P., DE LA ROSA J. L. y CORREA D. 1992. *Trichinella spiralis*: una parasitosis fuera de serie. Publicación Técnica del INDRE. No. 16. Secretaría de Salud. México D. F. pp. 56.
- ALIZADEH H. y WAKELIN D. 1982. Genetic factors controlling the intestinal mast cell response in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Clin. Exp. Immunol.* **49**: 331.
- ALLEN P. M. y UNANUE E. R. 1984. Differential requirements for antigen processing by macrophages for lysozyme-specific T cell hybridomas. *J. Immunol.* **132**: 1077.
- ALUJA A. S. 1982. Frequency of porcine cysticercosis in Mexico. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives, A. Flisser, K. Willms, J. P. Lacleite, C. Larralde, C. Ridaura y F. Beltrán (eds.), New York, Academic Press. pp. 53.
- APPLETON J. A., BELL R. G., HOMAN W. y VAN KNAPEN F. 1991. Consensus of *Trichinella spiralis* antigens and antibodies. *Parasitol. Today*. **7**: 190.
- APPLETON J. A. SCHAIN L. R. y MCGREGOR D. D. 1988. Rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in suckling rats: mediation by monoclonal antibodies. *Immunology*. **65**: 487.
- ARRIAGA C., MUÑOZ E., MORILLA A. y ORTEGA-PIERRES G. 1989. *Trichinella spiralis*: recognition of muscle larva antigens during experimental infection of swine and its potential use in diagnosis. *Exp. Parasitol.* **69**: 363.
- AU A. C. S., KO R. C., SIMON J. W., RIDELL N. J., WONG F. W. y TEMPLER M. 1983. Study of acute trichinosis in Ghurkas: specificity and sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assays for IgM and IgE antibodies to *Trichinella* larval antigens in diagnosis. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* **77**: 412.
- BARRAGAN J. 1981. Breves consideraciones sobre la triquina en México. Tesis Fac. Medicina. UNAM.
- BELL R. G., LINCOLN S. A. y OGDEN R. W. 1984. A single gene determines rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in mice. *Inf. Immunity*. **45**: 273.

- BELL R. G., MCGREGOR D. D. y DESPOMMIER D. D. 1979. *Trichinella spiralis*: Mediation of the intestinal component of protective immunity in the rat by multiple phase-specific anti-parasite responses. *Exp. Parasitol.* **47**: 140.
- BOLOGNESI D. 1990. Fresh pathways to follow. *Nature.* **344**:818.
- BRADFORD M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Nature.* **329**: 21.
- BÜÜS S. y WERDELIN O. 1986. A group-specific inhibitor of lysosomal cysteine proteinases selectively inhibits both proteolytic degradation and presentation of the antigen dinitrophenyl-poly-L-lysine by guinea pig accessory cells to T cells. *J. Immunol.* **136**: 452.
- CAMPBELL W. C. 1983a. Epidemiology I. Modes of Transmission. En: *Trichinella* and trichinosis, W. C. Campbell (ed.), New York: Plenum Press. pp. 425.
- CAMPBELL W. C. 1983b. Historical Introduction. En: *Trichinella* and trichinosis, W. C. Campbell (ed.), New York: Plenum Press. pp. 1.
- CARMAN J. A., POND L., NASHOLD F., WASSOM D. L., y HAYES C. E. 1992. Immunity to *Trichinella spiralis* infection in vitamin A-deficient mice. *J. Exp. Med.* **175**: 111.
- CASTEN L. A., LAKEY E. K., JELACHICH M. L., MARGOLIASH E. y PIERCE K. 1985. Anti-immunoglobulin augments the B-cell antigen-presentation function independently of internalization of receptor-antigen complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 5890.
- CHAIN B. M., KAY M. P. y FELDMANN M. 1986. The cellular pathway of antigen presentation: biochemical and functional analysis of antigen processing in dendritic cells and macrophages. *Immunology.* **58**: 271.
- CHAIN B. M. y LEVINE T. P. 1993. Antigen processing. En: Blood cell biochemistry. Vol. 5, Macrophages and related cells. M. A. Horton (de.), Plenum Press, N. Y. pp. 161.
- CORREA D., DE LA ROSA J. L. y ORTEGA-PIERRES M. G. Trichinellosis: epidemiological data in Mexico from 1939 to 1995. (en prensa)
- COLLINS D. S., FINDLAY K. y HARDING V. 1992. Processing of exogenous liposome-encapsulated antigens in vivo generates class I MHC-restricted T cell responses. *J. Immunol.* **148**: 3336.
- COLLINS D. S., UNANUE E. R. y HARDING C. V. 1991. Reduction of disulfide bonds within lysosomes is a key step in antigen processing. *J. Immunol.* **147**: 4054.
- COX J. H., YEWDELL J. W., EISENLOHR L. C., JOHNSON P. R. y BENNINK J. R. 1990. Antigen presentation requires transport of MHC class I-8 molecules from the endoplasmic reticulum. *Science.* **247**: 715.

- CRESSWELL P. 1992. Chemistry and functional role of the invariant chain. *Curr. Opin Immunol.* **4**: 87.
- CRUM E. D., DESPOMMIER D. D. y MCGREGOR D. D. 1977. Immunity to *Trichinella spiralis*. I. Transfer of two classes of lymphocytes. *Immunology.* **33**: 787.
- DAVIDSON H. W. y WATTS C. 1989. Epitope-directed processing of specific antigen by B lymphocytes. *J. Cell Biol.* **109**: 85.
- DELOVITCH T. L., PHILLIPS M. L., NAQUET P., LIN J., BERNARD N. F., YIP C. C., ELLIS J. y REID P. C. 1986. Antigen internalization, processing, and recycling by antigen-presenting cells. *Progress Immunol.* VI. pp. 238.
- DENKERS E. Y., WASSOM D. L. y HAYES C. E. 1990a. Characterization of *Trichinella spiralis* antigens sharing an immunodominant, carbohydrate-associated determinant distinct from phosphorylcholine. *Mol. Biochem. Parasitol.* **41**: 241.
- DENKERS E. Y., WASSOM D. L., KRCO D. L. y HAYES C. E. 1990b. The mouse antibody response to *Trichinella spiralis* defines a single, immunodominant epitope shared by multiple antigens. *J. Immunol.* **144**: 3152.
- DENKERS E. Y., HAYES C. E., WASSOM D. L. 1991. *Trichinella spiralis*: Influence of an immunodominant carbohydrate-associated determinant on the host antibody response repertoire. *Exp. Parasitol.* **72**: 403.
- DESPOMMIER D. D. 1977. Immunity to *Trichinella spiralis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **26**: 68.
- DESPOMMIER D. D. 1981. Partial purification and characterization of protection-inducing antigens from the muscle larvae of *Trichinella spiralis* by molecular sizing chromatography and preparative flatbed isoelectric focusing. *Parasitol. Immunol.* **3**: 261.
- DESPOMMIER D. D. 1983. Biology. En: *Trichinella* and trichinosis, W. C. Campbell (ed.), New York: Plenum Press. pp. 75.
- DESPOMMIER D. D., CAMPBELL W. C. y BLAIR L. S. 1977. The in vivo and in vitro analysis of immunity to *Trichinella spiralis* in mice and rats. *Parasitology.* **74**: 109.
- DESPOMMIER D. D. y MÜLLER M. 1970. Functional antigens of *Trichinella spiralis*. *J. Parasitol.* **56**: 76.
- DESPOMMIER D. D. y MÜLLER M. 1976. The stichosome and its secretion granules in the mature muscle larva of *Trichinella spiralis*. *J. Parasitol.* **62**: 775.
- DICK T. A. y SILVER B. B. 1980. Intestinal distribution of *Trichinella spiralis* in rats. *J. Parasitol.* **66**: 472.

- DILLON S. B. y MACDONALD T. T. 1986. Limit dilution analysis of mast cell precursor frequency in the gut epithelium of normal and *Trichinella spiralis* infected mice. *Parasite Immunol.* **8**: 503.
- DUPOUY-CAMET J., VAN KNAPEN F., ANCELLE T., VOQUANG D., LAVARDE V. y LAPIERRE J. 1988. Study of specific immunoglobulins (total IgG, IgM, IgA, IgE) in indirect immunofluorescence and ELISA in 40 patients with trichinosis followed over a 9-month period. *Pathol. Biol.* **36**: 803.
- ELSE K. J. y GRENCIS R. K. 1991. Cellular immune responses to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. I. Differential cytokine production during acute or chronic infection. *Immunology.* **72**: 508.
- ELSE K. J., HÜLTNER L. y GRENCIS R. K. 1992. Cellular immune responses to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. II. Differential induction of Th cell subsets in resistant versus non-responder mice. *Immunology.* **75**: 232.
- FRIDKIS-HARELI M., TEITELBAUM D., ARNON R. y SELA M. 1995. Synthetic copolymer 1 and myelin basic protein do not require processing prior to binding to class II major histocompatibility complex molecules on living antigen-presenting cells. *Cell. Immunol.* **163**: 229.
- FRIDKIS-HARELI M., TEITELBAUM D., GUREVIH E., PECHT I., BRAUTBAR C., KWON O. J., BRENNER T., ARNON R. y SELA M. 1994. Direct binding of myelin basic protein and synthetic copolymer 1 to class II major histocompatibility complex molecules on living antigen-presenting cells-specificity and promiscuity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 4872.
- GAMBLE H. R. 1985a. *Trichinella spiralis*: immunization of mice using monoclonal antibody affinity-isolated antigens. *Exp. Parasitol.* **59**: 398.
- GAMBLE H. R. 1985b. Comparison of immune effects in mice immunized with *Trichinella spiralis* adult and larval antigens. *J. Parasitol.* **71**: 680.
- GENITEAU M., VORROUST P. J., SMITH M. D., MOREL-MAREGER L., SAIMET G. y COULAND J. P. 1977. Circulating immune complexes in six patients with trichinellosis. *Clin. Exp. Immunol.* **30**: 141.
- GERMAIN R. N. 1993. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Ann. Rev. Immunol.* **11**: 403.
- GOLD A. M., DESPOMMIER D. D. y BUCK S. W. 1990. Partial characterization of two antigens secreted by L₁ larvae of *Trichinella spiralis*. *Biochem. Parasitol.* **41**: 241.
- GOLINSKA Z., MACHNICKA B. y RYSINSKA A. 1986. Circulating immune complexes in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Wiadomosci Parazytologiczne.* **32**: 243.
- GOULD S. E. 1970. Anatomic pathology. En: *Trichinosis in man and animals*, S. E. Gould (ed.) Springfield, Ill.: Charles C. Thomas. pp. 147.

- GOYAL P. K., HERMANEK J. y WAKELIN D. 1994. Lymphocyte proliferation and cytokine production in mice infected with different geographical isolates of *Trichinella spiralis*. *Parasite Immunol.* **16**: 105.
- GOYAL P. K. y WAKELIN D. 1993. Influence of variation in host strain and parasite isolate on inflammatory and antibody responses to *Trichinella spiralis* in mice. *Parasitology.* **106**: 371.
- GRENCIS R. K., CRAWFORD C., PRITCHARD D. Y., BEHNKE J. M. y WAKELIN D. 1986. Immunization of mice with surface antigens from the muscle larvae of *Trichinella spiralis*. *Parasite Immunol.* **8**: 587.
- GRENCIS R. K., HÜLTNER L. y ELSE K. J. 1991. Host protective immunity to *Trichinella spiralis* in mice: activation of Th cell subsets and lymphokine secretion in mice expressing different response phenotypes. *Immunology.* **74**: 329.
- GRENCIS R. K., RIEDLINGER J. y WAKELIN D. 1985. L3T4-positive T lymphoblasts responsible for transfer of immunity to *Trichinella spiralis* in mice. *Immunology.* **56**: 213.
- GRENCIS R. K., RIEDLINGER J. y WAKELIN D. 1987. Lymphokine production by T cells generated during infection with *Trichinella spiralis*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **83**: 92.
- GRENCIS R. K. y WAKELIN D. 1982. Short lived, dividing cells mediate adoptive transfer of immunity to *Trichinella spiralis* in mice. I. Availability of cells in primary and secondary infections in relation to cellular changes in the mesenteric lymph node. *Immunology.* **46**: 443.
- GUAGLIARDI L. E., KOPPELMAN B., BLUM J. S., MARKS M. S., CRESSWELL P. y BRODSKY F. M. 1990. Co-localization of molecules involved in antigen processing and presentation in an early endocytic compartment. *Nature.* **343**: 133.
- GUIDOS C., WONG M. y LEE K-C. 1984. A comparison of the stimulatory activities of lymphoid dendritic cells and macrophages in T proliferative responses to various antigens. *J. Immunol.* **33**: 1179.
- HÄMMERLING J. G. y MORENO J. 1990. The function of the invariant chain in presentation by MHC class II molecules. *Immunol. Today.* **11**: 337.
- HARDING C. V., COLLINS D. S., SLOT J. W., GEUZE H. J. y UNANUE E. R. 1991. Liposome-encapsulated antigens are processed in lysosomes, recycled, and presented to T cells. *Cell.* **64**: 393.
- HARDING C. V. y GEUZE H. J. 1992. Class II MHC molecules are present in macrophage lysosomes and phagolysosomes that function in the phagocytic processing of *Listeria monocytogenes* for presentation to T cells. *J. Cell Biol.* **119**: 531.
- HARDING C. V. y UNANUE E. R. 1990. Low-temperature inhibition of antigen processing and iron uptake from transferrin: deficits in endosome functions at 18°C. *Eur. J. Immunol.* **20**: 323.

- HENDERSON R. A., MICHEL H., SAKAGUCHI K., SHABANOWITZ J., APPELLA E., HUNT D. F. y ENGELHARD H. 1992. HLA-A2.1-associated peptides from a mutant cell line: a second pathway of antigen presentation. *Science*. **255**: 1264.
- HOCKETT R. D., COOK J. R., FINDLAY K. y HARDING C. V. 1996. Interferon- γ differentially regulates antigen-processing functions in distinct endocytic compartments of macrophages with constitutive expression of class II major histocompatibility complex molecules. *Immunology*. **87**: 68.
- HOFFMAN M. 1992. Antigen processing: a new pathway discovered. *Science*. **255**: 1214.
- HOWARD M., COLON M. y CHESNUT R. 1982. Requirements for the processing of antigen by antigen-presenting B cells. *J. Immunol.* **129**: 2389.
- HOWARD M. y CHESNUT R. 1985. Antigen processing and presentation to T cells. *Immunol. Today*. **6**: 101.
- JACQUIER-SARLIN M. R., GABERT F. M., VILLIERS M. B. y COLOMB CEA M. G. 1995. Modulation of antigen processing and presentation by covalently linked complement C3b fragment. *Immunology*. **84**: 164.
- JAMES E. R. 1989. ICT7: The 1988 *Trichinella* olympics. *Parasitol. Today*. **5**: 66.
- JASMER D. P. 1990. *Trichinella spiralis*: altered expression of muscle proteins in trichinosis. *Exp. Parasitol.* **70**: 452.
- KELLY E. A. B., CRUZ E. S., HAUDA K. M. y WASSOM D. L. 1991. IFN- γ and IL-5 producing cells compartmentalize to different lymphoid organs in *Trichinella spiralis*-infected mice. *J. Immunol.* **147**: 306.
- KIM C. 1983. Epidemiology. II. Geographic distribution and prevalence. En: *Trichinella* and trichinosis, W. C. Campbell (ed.), New York: Plenum Press. pp. 445.
- KIM K., SOLVAY M. J. y THOMAS D. W. 1985. Cellular requirements for antigen processing by antigen-presenting cells: Evidence for different pathways in forming the same antigenic determinants. *Cell. Immunol.* **90**: 267.
- KOLATA G. 1985. Testing for trichinosis. *Science*. **227**: 621.
- KORENAGA M., WANG C. H., BELL R. G., ZHU D. y AHMAD A. 1989. Intestinal immunity to *Trichinella spiralis* is a property of OX8⁺OX22⁻ T helper cells that are generated in the intestine. *Immunology*. **66**: 588.
- KOTZIN B. L. 1994. Superantigens and their role in disease. *Hosp. Pract.* Nov 15: 59.
- KRCO C. J., WASSOM D. L., ABRAMSON E. J. y DAVID CH. S. 1983. Cloned T cells recognize *Trichinella spiralis* antigen in association with an E β ^k E α ^k restriction element. *Immunogenetics*. **18**: 435.

LAEMLI V. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly at the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680.

LAH T. T., HAWLEY M., ROCK K. L. y GOLDBERG A. L. 1995. Gamma-interferon causes a selective induction of the lysosomal proteases cathepsins B and L, in macrophages. *FEBS Letters*. **363**: 85.

LARSH J. E., GOULSON H. T. y WEATHERLY N. F. 1964. Studies in delayed (cellular) hypersensitivity in mice infected with *Trichinella spiralis*. II. Transfer of peritoneal exudate cells. *J. Parasitol.* **50**: 496.

LEE P., MATSUEDA G. R. y ALLEN P. M. 1988. T cell recognition of fibrinogen: a determinant of the Alpha chain does not require processing. *J. Immunol.* **140**: 1063.

LEVINE N. D. 1980. Introduction to the nematoda. En: Nematode parasites of domestic animals and of man, N. D. Levine (ed.), Minneapolis . Burgess Publishing Company. pp. 1.

LJUNGSTROM Y., HAMMARSTROM L., KOCIECKA W. y SMITH C. Y. E. 1988. The sequential appearance of IgG subclasses and IgE during the course of *Trichinella spiralis* infection. *Clin. Exp. Immunol.* **75**: 230.

LOMBARDI G., DEL-GALLO F., VISMARA D., PICCOLELLA E., DE-MARINO C., GARZELLI C., PUGLISI C. y COLLIZI V. 1987. Epstein-Barr virus- transformed B cells process and present Mycobacterium tuberculosis particulate antigens to T-cells clones. *Cell. Immunol.* **107**: 281.

LOVE R. J., OGILVIE B. M. y McLAREN D. J. 1976. The immune mechanism which expels the intestinal stage of *Trichinella spiralis* from rats. *Immunology*. **30**: 7.

MALE D., CHAMPION B., COOKE A. y OWEN M. 1991. Antigen processing and presentation. En: Advanced immunology, (2nd. Ed). London. Gower Medical Publishing. pp. 81.

MANOURY-SCHWARTZ B., CHIOCCHIA G. y FOURNIER C. 1995. Processing and presentation of type II collagen, a fibrillar autoantigen, by H-2^d antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol.* **25**: 3235.

MARTINEZ-MARAÑÓN R. 1983. Cuatro casos nuevos de triquinosis aguda en Naucalpan. Consideraciones sobre frecuencia real de la enfermedad. *Salud Publ. Mex.* **25**: 574.

MARTINEZ-MARAÑÓN R. 1985. Esta aumentando la triquinosis en México? Podría esto ser una consecuencia inesperada de nuestro desarrollo?. *Salud Publ. Mex.* **27**: 40.

MARTINEZ-MARAÑÓN R., TREJO J. y DELGADO A. B. 1974. Frecuencia de la infección por *Trichinella spiralis* en 1000 diafragmas de cadáveres de la ciudad de México en 1972-1973. *Rev. Inv. Salud Pública.* **31**: 95.

MATSUNAGA I., SAIBARA T., KIDO H. y KATUNUMA N. 1993. Participation of cathepsin B in processing of antigen presentation to MHC class II. *FEBS*. **324**: 325.

MAZZOTTI L. 1944. Examen de 400 diafragmas humanos en la Cd. de México para investigar triquinosis. *Rev. Inst. Salubr. Enf. Trop.* **5**: 157.

MAZZOTTI L. y CHAVIRA C. 1943. Investigación de triquina en 600 diafragmas humanos de la Cd. de México. *Rev. Inst. Salubr. Enf. Trop.* **4**: 343.

MAZZOTTI L. y PASTRANA A. 1943. Investigación de triquinosis en tejidos musculares por el método de digestión. *Rev. Inst. Salubr. Enf. Trop.* **4**: 337.

McCOY K. L., PAGE M. SH., MERKEL B. J., INMAN J. K. y STUTZMAN R. 1993. Differences among various lineages of antigen-presenting cells in processing exogenous antigen internalized through transferrin receptors. *J. Immunol.* **151**: 6757.

MICHALEK M. T., BENACERRAF B. y ROCK K. L. 1989. Two genetically identical antigen-presenting cell clones display heterogeneity in antigen processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 3316.

MILLS K. H. G., SKEHEL J. J. y THOMAS D. B. 1986. Conformational-dependent recognition of influenza virus hemagglutinin by murine T helper clones. *Eur. J. Immunol.* **16**: 276.

MMWR, 1991. Epidemiologic notes and reports: *Trichinella spiralis* infection-United States, 1990. February 1. **40**: 57.

MONACO J. J. 1992a. A molecular model of MHC class-I-restricted antigen processing. *Immunol. Today.* **13**: 173.

MONACO J. J. 1992b. Genes in the MHC that may affect antigen processing. *Curr. Opinion Immunol.* **4**: 70.

MONDRAGON J. V. A. 1988. Manejo de proteínas solubles de *Mycobacterium tuberculosis* por células fagocíticas. Tesis de Maestría. Fac. de Medicina. UNAM.

MURRELL K. D., FAYER R. y DUBEY J. P. 1984. Parasitic Organisms. En: *Advances in meat science*. pp. 27.

NAKAMURA-LOPEZ M. A. 1991. Programa epidemiológico de las enfermedades transmitidas por alimentos en México. *Epidemiology.* **6**: 41.

NAQUET P., ELLIS J., SINGH B., HODGES R. S. y DELOVITCH T. L. 1987. Processing and presentation of insulin. I. Analysis of immunogenic peptides and processing requirements for insulin a loop-specific T cells. *J. Immunol.* **139**: 3955.

NEEFJES J. J. y PLOEGH H. L. 1992. Intracellular transport of MHC class II molecules. *Immunol. Today.* **13**: 179.

NEIFER S., KREMSNER P. G., WEINIG M., HARMS G., SAHLMULLER G., BIENZIE U., HELTMANN M., BREUER F. y MEHLHORN H. 1991. Interferon-gamma treatment in mice experimentally infected with *Trichinella spiralis*. *Parasitol. Res.* **77**: 437.

NUCHTERN J. G., BONIFACINO J. S., BIDDISON W. E. y KLAUSNER R. D. 1989. Brefeldin A implicates egress from endoplasmic reticulum in class I restricted antigen presentation. *Nature*. **339**: 223.

OLSEN B. S., VILLELLA J. B. y GOULD S. E. 1964. Distribution of *Trichinella spiralis* in muscles of experimentally infected swine. *J. Parasitol.* **50**: 489.

OLVERA G. 1896. Triquinosis en México. Contribución de dos casos para la historia de triquinosis en la capital de México. *Gas. Med. Mex.* **33**: 167.

ORTEGA-PIERRES M. G., ALMOND N. W. y PARKHOUSE R. M. E. 1987. Applications of biochemically defined antigens of *Trichinella spiralis* in host immunity, protection and diagnosis. *Wiad. Parazytol.* **33**: 423.

ORTEGA-PIERRES G., CHAYEN A., CLARK N. T. W. y PARKHOUSE R. M. E. 1984. The occurrence of antibodies to hidden and exposed determinants of surface antigens of *Trichinella spiralis*. *Parasitology*. **88**: 359.

ORTEGA-PIERRES G., MUÑIZ E., CORAL-VAZQUEZ R. y PARKHOUSE R. M. E. 1989. Protection against *Trichinella spiralis* induced by purified stage-specific surface antigens of infective larvae. *Parasitol. Res.* **75**: 563.

PARKHOUSE R. M. E., PHILIPP M. y OGILVIE B. M. 1981. Characterization of surface antigens of *Trichinella spiralis* infective larvae. *Parasite Immunol.* **3**: 339.

PAWLOWSKI Z. S. 1983. Clinical aspects in man. En: *Trichinella* and trichinosis, W. C. Campbell (ed.), New York: Plenum Press. pp. 367.

PEREZ I. D. G. 1993. Procesamiento de antígenos somáticos y de excreción secreción del cisticerco de *Taenia solium*. Tesis de Licenciatura. Fac. de Ciencias, UNAM.

PERRIN T. G. 1939. Primeras observaciones sobre la frecuencia en México D. F., de triquinosis ignoradas. *Rev. Med. Hosp. Gral.* **1**: 437.

POND L., WASSOM D. L. y HAYES C. E. 1989. Evidence for differential induction of helper T cells subsets during *Trichinella spiralis* infection. *J. Immunol.* **143**: 4232.

POND L., WASSOM D. L. y HAYES C. E. 1992. Influence of resistant and susceptible genotype, IL-1, and lymphoid organ on *Trichinella spiralis*-induced cytokine secretion. *J. Immunol.* **149**: 957.

POZIO E. y BRUSCHI F. 1994. Updating on trichinellosis. *Parasitol. Today.* **10**: 44.

POZIO E., LA ROSA G. y ROSSI P. 1989. *Trichinella* reference center. *Parasitol. Today.* **5**: 169.

- REGNIER-VIGOUROUX A., ELAYEB M., DEFENDINI M.-L., GRANIER C. y PIERRES M. 1988. Processing by accessory cells for presentation to murine T cells of apamin, a disulfide bonded 18 amino-acid peptide. *J. Immunol.* **140**: 1069.
- RIEDLINGER J., GRENCIS R. K. y WAKELIN D. 1986. Antigen-specific T-cell lines transfer protective immunity against *Trichinella spiralis* in vivo. *Immunology.* **58**: 57.
- ROCHE P. A. y CRESSWELL P. 1990. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature.* **345**: 615.
- ROJAS-ORTEGA S., REYES-GUTIERREZ E. y PONCE DE LEON-ROSALES S. 1989. Triquinosis esporádica. *Salud Pública Mex.* **31**: 658.
- ROMAGNOLI P., LAYET C., YEWDELL J., BAKKE O. y GERMAIN R. N. 1993. Relationship between invariant chain expression and major histocompatibility complex class II transport into early and late endocytic compartments. *J. Exp. Med.* **177**: 583.
- ROSENWASSER L. J. y GURKA G. P. 1987. Immunologic functions of macrophages. En: Phagocytes and disease, M. S. Klempner, B. Styrz y J. Ho (eds.), Boston, Massachusetts: Kluwer Academic Publishers. pp. 91.
- SCALA G. y OPPENHEIM J. J. 1983. Antigen presentation by human monocytes: evidence for stimulant processing and requirement for interleukin 1. *J. Immunol.* **131**: 1160.
- SCHÄGGER H. y VON JAGOW G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochem.* **166**: 368.
- SHAW M.-A. y CHAIN B. M. 1989. A cell-free model system for the study of antigen processing. *Int. Immunol.* **1**: 619.
- SHIMONKEVITZ R., KAPPLER J., MARRACK P. y GREY H. 1983. Antigen recognition by H-2-restricted T cells. I. Cell-free antigen processing. *J. Exp. Med.* **158**: 303.
- SILBERSTEIN D. D. 1983. Antigens. En: *Trichinella* and trichinosis, W. C. Campbell (ed.), New York: Plenum Press. pp. 309.
- SILBERSTEIN D. S. y DESPOMMIER D. D. 1984. Antigens from *Trichinella spiralis* that induce a protective response in the mouse. *J. Immunol.* **132**: 898.
- SILBERSTEIN D. S. y DESPOMMIER D. D. 1985. Effects on *Trichinella spiralis* of host responses to purified antigens. *Science.* **227**: 948.
- STEWART G. L. y GIANNINI S. H. 1982. *Sarcocystis*, *Trypanosoma*, *Toxoplasma*, *Brugia*, *Angylostoma* y *Trichinella* spp.: A review of the intracellular parasites of striated muscle. *Exp. Parasitol.* **53**: 406.

STEWART C. C., RIEDY M. C. y STEWART S. J. 1994. I. Macrophage biology. 1. Introduction: The proliferation and differentiation of macrophages. En: Macrophage-pathogen-interactions. Immunology series. Vol. 60. B. S. Zwillig y T. K. Eisenstein (eds.), M. Dekker, Inc. New York: Plenum Press. pp. 3.

STREET N. E., SCHUMACHER J. H., FONG T. A. T., BASS H., FIORENTINO D. F., LEVERAH J. A. y MOSMANN T. R. 1990. Heterogeneity of mouse helper T cells. Evidence from bulk cultures and limiting dilution cloning for precursors of Th₁ and Th₂ cells. *J. Immunol.* **144**: 1629.

SU X., PRESTWOOD A. K. y McGRAW R. A. 1991. Cloning and expression of complementary DNA encoding an antigen of *Trichinella spiralis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **45**: 331.

SUNDSTRÖM C. y NILSSON K. 1976. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U937). *Int. J. Cancer.* **17**: 565.

TAKAHASHI H., CEASE K. B. y BERZOFSKY J. A. 1989. Identification of proteases that process distinct epitopes on the same protein. *J. Immunol.* **142**: 2221.

TAKAHASHI Y., MIZUNO N., SHIMUZU K. y ARAKI T. 1992. Ultrastructure, antigenicity and histochemistry of stichocyte granules of adult *Trichinella spiralis*. *J. Parasitol.* **78**: 518.
TAYLOR P.M., THOMAS D. B. y MILLS K. H. G. 1987. In vitro culture of T cell lines and clones. En: Lymphocytes a practical approach, G. G. B. Klaus (ed.) Oxford: IRL Press. pp. 133.

TOWBIN H., STAEBELIN T. y GORDON J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **76**: 4350.

TSUCHIYA SH., KOBAYASHI Y., GOTO Y., OKUMURA H., NAKAE SH. KONNO T. y TADA K. 1982. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by phorbol diester. *Cancer. Res.* **42**: 1530.

TSUCHIYA S., YAMABE M., YAMAGUCHI Y., KOBAYASHI Y., KONNO T. y TADA K. 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP1). *Int. J. Cancer.* **26**: 171.

UNANUE E. R. 1984. Antigen-presenting function of the macrophage. *Ann. Rev. Immunol.* **2**: 395.

UNANUE E. R. 1992. Cellular studies on antigen presentation by class II MHC molecules. *Curr. Opinion Immunol.* **4**: 63.

UNANUE E. R. y ALLEN P. M. 1986. Biochemistry and biology of antigen presentation by macrophages. *Cell. Immunol.* **99**: 3.

UNANUE E. R. y ASKONAS B. A. 1968. Persistence of immunogenicity of antigen after uptake by macrophages. *J. Exp. Med.* **127**: 915.

UNANUE E. R. y CEROTTINI J. 1970. The immunogenicity of antigen bound to the plasma membrane of macrophages. *J. Exp. Med.* **131**: 711.

VAN FURTH R., SCHADEWIJK-NIEUWSTAD M., ELZENGA-CLAASEN Y., CORNELISSE C. y NIBBERING P. 1985. Morphological, cytochemical, functional and proliferative characteristics of four murine macrophage-like cell lines. *Cellular Immunol.* **90**: 339.

VAN KNAPEN F., FRANCHIMONT J. H., RUITENBERG E. J., ANDRE P., BALDELLI B., GIBSON T. E., GOTTAL C., HENRIKSEN S. A., KOHLER G., RONEUS O., SHOVGAAARD N., SOULE C., STRICKLAND K. L. y TAYLOR S. M. 1982a. Comparison of four methods for early detection of experimental *Trichinella spiralis* infections in pigs. *Vet. Parasitol.* **9**: 117.

VAN KNAPEN F., FRANCHIMONT J. H., VERDONK A. R., STUMPF J. y UNDEUTSCH K. 1982b. Detection of specific immunoglobulins (IgG, IgM, IgA, IgE and total IgE levels in human trichinosis by means of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Am. J. Med. Hyg.* **31**: 973.

VIDARD L., ROCK K. L. y BENACERRAF B. 1992. Heterogeneity in antigen processing by different types of antigen-presenting cells. Effect of cell culture on antigen processing ability. *J. Immunol.* **149**: 1905.

VIVILLE S., NEEFJES J., LOTTEAU V., DIERICH A., LEMEUR M., PLOEGH H., BENOIST C. y MATHIS D. 1993. Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell.* **72**: 635.

WAKELIN D. 1978. Genetic control of susceptibility and resistance to parasitic infection. *Adv. Parasitol.* **16**: 219.

WAKELIN D. 1980. Genetic control of immunity to parasites: infection with *Trichinella spiralis* in inbred and congenic mice showing rapid and slow responses to infection. *Parasite Immunol.* **2**: 85.

WAKELIN D. 1983. Genetic variation in immunity to *Trichinella spiralis* in the mouse. *Wiad. Parasytol.* **29**: 375.

WAKELIN D. 1993. *Trichinella spiralis*: immunity, ecology, and evolution. *J. Parasitol.* **79**: 488.

WAKELIN D. y DENHAM A. 1983. The immune response. En: *Trichinella* and trichinosis, W. C. Campbell (ed.), New York: Plenum Press. pp. 265.

WAKELIN D., DONACHIE A. M. y GRENCIS R. K. 1985. Genetic control of immunity to *Trichinella spiralis* in mice: capacity of cells from slow responder mice to transfer immunity in syngeneic and F₁ hybrid recipients. *Immunology.* **56**: 203.

WAKELIN D., GRENCIS R. K. y DONACHIE A. M. 1982. Short lived dividing cells mediated adoptive transfer of immunity to *Trichinella spiralis* in mice. II. *In vivo* characteristics of the cells. *Immunology*. **46**: 451.

WAKELIN D. y LLOYD M. 1976. Immunity to primary an challenge infections of *Trichinella spiralis* in mice: A re-examination of conventional parameters. *Parasitology*. **72**: 173.

WAKELIN D. y WILSON M. M. 1977. Transfer of immunity to *Trichinella spiralis* in the mouse with mesenteric lymph node cells: time of appearance of efective cells in donors and expression of immunity in recipients. *Parasitology*. **74**: 215.

WAKELIN D. y WILSON M. M. 1980. Immunity to *Trichinella spiralis* in irradiated mice. *Int. J. Parasitol.* **10**: 37.

WALKER W. S. 1989. Differential antigen presentation by cloned populations of mouse splenic macrophages. *J. Immunol.* **143**: 2142.

WASSOM D. L., BROOKS B. O., BABISH B. O. y DAVID C. S. 1983. A gen mapping between the S and D regions of the H-2 complex influences resistance to *Trichinella spiralis* infections in mice. *J. Immunogenetics*. **10**: 371.

WASSOM D. L., WAKELIN D., BROOKS B. O., KRCO C. J. y DAVID C. S. 1984. Genetic control of immunity to *Trichinella spiralis* infections of mice. Hypothesis to explain the role of H-2 genes in primary and challenge infections. *Immunology*. **51**: 625.

WISNEWSKI N., MCNEIL M., GRIEVE R. B. y WASSOM D. L. 1993. Characterization of novel fucosyl- and tyvelosyl- containing glycoconjugates grom *Trichinella spiralis* muscle stage larvae. *Mol. Biochem. Parasitol.* **61**: 25.

WRIGHT K. A. 1987. The nematodes's cuticle-its surface and the epidermis: function, homology, analogy-a current consensus. *J. Parasitol.* **73**: 1077.

WRIGHT K. A. y HONG H. 1988. Characterization of the accessory layer of the cuticle of muscle larvae of *Trichinella spiralis*. *J. Parasitol.* **74**: 440.

YAGI J., BARON J., BUSER S. y JANEWAY C. A. 1990. Bacterial proteins that mediate the association of a defined subset of T cell receptor: CD4 complexes with class II MHC. *J. Immunol.* **144**: 892.

YAMADA K. M. y KENNEDY D. 1981. Glycolipids: receptors for fibronectin? *J. Cell. Physiol.* **109**: 343.

YANG I., WATERS J. B., FRUH K. y PETERSON P. A. 1992. Proteosomes are regulated by interferon- γ : Implications for antigen processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 4928.

YEWDELL J. W. y BENNINK J. R. 1989. Brefeldin A specifically inhibits presentation of protein antigen to cytotoxic T lymphocytes. *Science*. **244**: 1072.

YOSHIKAWA M., WATANABE M. y HOZUMI N. 1987. Analysis of proteolytic processing during specific antigen presentation. *Cell. Immunol.* **110**: 431.

ZHU D. y BELL R. G. 1989. IL-2 production, IL-2 receptor expression, and IL-2 responsiveness of spleen and mesenteric lymph node cells from inbred mice infected with *Trichinella spiralis*. *J. Immunol.* **142**: 3262.

ZHU D. y BELL R. G. 1990a. *Trichinella spiralis*: murine variation in response to monoclonaally defined, protective, no stage-specific antigens. *Exp. Parasitol.* **70**: 330.

ZHU D. y BELL R. G. 1990b. Genetic analysis of the relationship between interleukin production and worm rejection in *Trichinella spiralis*-infected inbred mice. *J. Parasitol.* **76**: 703.

ZIEGLER K. y UNANUE E. R. 1981. Identification of a macrophage antigen-processing event required for I-region-restricted antigen presentation to T lymphocytes. *J. Immunol.* **127**: 1869.

ZIMMERMANN W. J. 1970. The epizootiology of trichiniasis in wildlife. *J. Wildlife Dis.* **6**: 329.

ZISMAN E., DAYAN M., SELA M. y MOZES E. 1993. Ia-antigen-T-cell interactions for a thymus-independent antigen composed of D amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 994.