



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"

DETECCION DE CELULAS CEBADAS EN EL
INTESTINO DELGADO DE CERDOS INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE CON *Trichinella spiralis*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

GISELA SÁNCHEZ OAXACA

ASESOR: Dr. MARCO ANTONIO VEGA LÓPEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO.

2004



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.



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

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Detección de células cebadas en el intestino delgado de
cerdos infectados experimentalmente con Trichinella spiralis

que presenta la pasante: Gisela Sánchez Oaxaca
con número de cuenta: 9657066-7 para obtener el título de :
Médica Veterinaria Zootecnista

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de marzo de 2004

PRESIDENTE	<u>Dr. Benito López Baños</u>	
VOCAL	<u>MVZ. José Alberto Chávez Enríquez</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. Marco Antonio Vega López</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MVZ. Martha Elizabeth Pérez Arias</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MVZ. Rocío Silva Mendoza</u>	

DEDICATORIA

El presente trabajo quiero dedicarlo a mi familia, a esas grandes personas que estuvieron conmigo y me apoyaron en todo momento, les doy las gracias a mi madre Francisca Oaxaca, a mis queridas hermanas Jazmín y Zoraya.

AGRADECIMIENTOS

- Al equipo de trabajo del Laboratorio 9 del Departamento de Patología Experimental del CINVESTAV, Juanita, Dr. Leopoldo Flores y demás personas por haberme permitido y facilitado realizar este trabajo.
- Al Dr. German Garrido de la FESC por su apoyo para trabajar en el Laboratorio.
- Al Dr. Vega con cariño y admiración.
- A todos los Profesores de la FESC por haber compartido sus conocimientos y experiencias.
- A los grandes amigos que puede conocer en CINVESTAV Juanito, Tony, Heidi, Claudia y José con quienes pase momentos muy amenos.
- A todos mis amigos de la FESC Mary, Rosa, Marcelino, Chio, Fabian, César y demás por todo el apoyo y amistad recibida.

CONTENIDO

INTRODUCCION.....	1
I ANTECEDENTES	
1.- Generalidades de las células cebadas.....	2
a) Características.....	4
b) Activación de las células cebadas.....	5
c) Función de las células cebadas.....	7
d) Desarrollo.....	8
e) Mediadores de las MC.....	10
2.- Sistema Inmune Intestinal en el cerdo.....	11
a) Lámina propia.....	12
b) Epitelio.....	14
c) Células cebadas porcinas.....	14
3.- Células cebadas en parasitosis.....	15
4.- Generalidades de <i>Trichinella spiralis</i>	18
a) Ciclo de vida	19
b) Importancia zoonótica.....	21
5.- Respuesta inmune a <i>Trichinella spiralis</i> en el cerdo.....	22
II JUSTIFICACION	24
III HIPOTESIS	24
IV OBJETIVOS	25
V MODELO EXPERIMENTAL	25
VI MATERIAL Y METODOS	26
VII RESULTADOS	28
VIII DISCUSION	33
IX CONCLUSIONES	38
X BIBLIOGRAFIA	39
XI APÉNDICE	48
XII FOTOGRAFIAS	51

ABREVIATURAS

APC	Células presentadoras de antígeno
CD4	Células T del fenotipo CD4
CD8	Células T del fenotipo CD8
Cr-EDTA	Sal de cromo utilizada en cerdos para medir permeabilidad de la mucosa intestinal
CTMC	MC de tejido conectivo
C5a	Factor 5a del complemento
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
FcERI	Receptor de alta afinidad a IgE
FcERII	Receptor de Baja afinidad a IgE
GM-CSF	Factor estimulante de las colonias de macrófago-granulocito
IEL	Linfocitos intraepiteliales
IFN γ	Interferón gama
IgA	Inmunoglobulina A
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
IMCP	Proteinasa de células cebadas intestinales
LIF	Factor inhibidor de la migración de leucocitos
LM	Larvas musculares
LP	Lámina propia
LRN	Larvas recién nacidas
LT	Leucotrieno
MC	Células cebadas
MC _T	Células cebadas que expresan triptasa
MC _{TC}	Células cebadas que expresan triptasa y quimasa
MCP-3	Proteinasa 3 de MC
MHCII	Complejo principal de histocompatibilidad II
MIP1 α	Proteína inflamatoria de macrófagos uno alfa
MMC	MC de la mucosa
MMCPI	Proteína I de MC de ratón
MPI	Proteína inflamatoria de monocitos
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NLM	Nodo linfático mesentérico
OVA	Ovoalbúmina
PAF	Factor de activación plaquetaria
PBMC	Células mononucleares sanguíneas
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PI	Post-infección
RANTES	Activación y regulación de células T normales expresadas y secretadas
RMCP I	Proteasa I de MC en rata
RMCP II	Proteasa II de MC en rata

RNAm	Acido ribonucleico mensajero
SCF	Factor de crecimiento de células madre
SLA	Antígeno linfocítico porcino
SMCP	Proteína de MC de serosas
TCA-3	Gen 3 activador de células T
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta
TH2	Linfocitos T cooperadores 2
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa

RESUMEN

Trichinella spiralis es el parásito causante de una de las zoonosis más peligrosas para la especie humana y está muy difundida en casi todo el mundo. Al igual que el cerdo y otros animales, el ser humano adquiere la triquinosis por consumir carne parasitada, insuficientemente cocida o cruda. La infección que produce en los cerdos es de carácter primario, alcanzando al ser humano en forma secundaria. Su diagnóstico se realiza en las inspecciones sanitarias post-faena.

El ciclo biológico tiene dos fases, una fase entérica en la que el hospedero adquiere la infección al consumir la carne mal cocida o cruda con las larvas enquistadas, de este modo el parásito se establece en el duodeno, donde madura, copula y las hembras inician la puesta de las LRN alrededor de los días 5-7 PI (post-infección) pudiéndose prolongar hasta por 4 semanas. La fase sistémica inicia cuando las LRN penetran el epitelio intestinal en busca de los vasos linfáticos que los llevará al nodo linfático; de allí se dirigen al ducto torácico y penetrarán a la circulación sanguínea para finalmente alojarse en los músculos estriados esqueléticos.

En los roedores, ocurre una expulsión temprana del parásito en la 2ª o 3ª semana PI, la cual se relaciona con una respuesta inmune del tipo TH2 incrementando las citocinas IL-4 e IL-5 que produce mastocitosis y eosinofilia. En cerdos ocurre una expulsión tardía del parásito alrededor de los días 50-60 PI, pero no se ha reportado el papel de las MC en esta expulsión del parásito. En el presente estudio se demostró que no hay una mastocitosis marcada antes del día 40 PI que pudiera ayudar a la expulsión temprana del parásito, sin embargo hay respuesta inflamatoria transitoria hacia el parásito, denotada por aumentos significativos de MC en duodeno al día 1 PI en LP de criptas y en submucosa y una disminución en íleon los días 15 y 40 PI se detectó un aumento de MC en epitelio de la vellosidad. Sin embargo esta respuesta no es lo suficientemente fuerte para promover la expulsión del parásito.

INTRODUCCIÓN

La triquinelosis es causada por el nemátodo *Trichinella spiralis*, tiene una distribución mundial y se considera una zoonosis de interés en Salud Pública porque es potencialmente fatal para el hombre, además de afectar la producción pecuaria por el decomiso de la carne infectada. En México se estima que la parasitosis tiene zonas endémicas importantes y su control es limitado al carecerse de métodos efectivos de diagnóstico y prevención (Martínez, 1985).

El ciclo de vida de este parásito es relativamente corto y presenta dos fases: una entérica donde el parásito pasa por cuatro estadios larvarios y el adulto; y la fase sistémica que incluye la larva recién nacida y la larva enquistada (Alcántara y Col., 1992). La fase entérica se establece después de la ingestión de carne cruda o mal cocida de animales silvestres y cerdos domésticos infectada con larvas enquistadas. Éstas se liberan en pocos minutos por la digestión gástrica y se establecen en el epitelio duodenal en pocas horas. La larva sufre cuatro mudas sucesivas hasta convertirse en adulto. Las hembras fecundadas migran a la lámina propia intestinal donde, después de aproximadamente cinco días, comienzan a liberar larvas recién nacidas que llegan a la linfa y al torrente sanguíneo estableciéndose la fase sistémica del parásito, para su posterior establecimiento en el músculo estriado esquelético del hospedero, donde pueden sobrevivir por años o calcificarse y morir (Despommier, 1993).

En estudios realizados en roedores sobre la infección primaria se ha demostrado que los parásitos adultos son expulsados después de la 3a. semana, porque se desarrolla una respuesta inmune protectora intensa con expulsión rápida de adultos o preadultos del intestino. En el cerdo aunque se desarrolla una respuesta inmune sistémica efectiva contra las larvas recién nacidas y enquistadas; que produce la reducción significativa de la fertilidad de las hembras del parásito, limitando su establecimiento (Gamble y Col., 1986). El parásito adulto puede permanecer en el intestino por periodos de más de 7 semanas.

Los cambios epiteliales y mucosales que ocurren durante la infección intestinal por nemátodos tienen muchos rasgos que son característicos de la inflamación alérgica en donde se produce IgE, se reclutan células cebadas (MC), basófilos, eosinófilos y la secreción epitelial se ve alterada. En los estudios *in vivo* en ratones y ratas infectados con

nemátodos intestinales como la *N. brasiliensis* o la *T. spiralis*, la respuesta de las MC en la mucosa, incluye una marcada mastocitosis en la lámina propia (LP) intestinal, además de cambios histológicos y ultra estructurales que fueron observados durante la expulsión de *N. brasiliensis* en ratas. Otros estudios subsecuentes demostraron que las MC intestinales de ratas fueron activadas durante la expulsión del nemátodo (Gamble y Col., 1986). No existen en el cerdo estudios relativos al efecto de la infección con *T. spiralis*, sobre el sistema inmune intestinal. Esta falta de información impide el desarrollo de estrategias adecuadas de prevención y control de la zoonosis.

En este trabajo se analizaron los cambios de las MC en la mucosa intestinal inducidos por la infección experimental del parásito. Tratándose de células cruciales en la respuesta inflamatoria, las MC funcionan tanto en los mecanismos inespecíficos como en los específicos de defensa, por lo que su descripción es este modelo arroja información valiosa para explicar la estancia prolongada del parásito en el intestino delgado del porcino, semejante a lo que ocurre en el humano.

I ANTECEDENTES

1.-GENERALIDADES DE LAS CÉLULAS CEBADAS

Las células cebadas (MC) son consideradas como una llave celular efectora en la patogénesis de enfermedades alérgicas como asma, rinitis, dermatitis atópica, urticaria, anafilaxia y alergia a los alimentos. En esta reacción de hipersensibilidad tipo I, las MC son activadas por entrecruzamiento de sus receptores de membrana para IgE por un antígeno multivalente, resultando en la liberación de una variedad de mediadores de la inflamación tanto preformados como recién sintetizados. Las MC pueden generar o liberar varias citocinas en adición a los mediadores citados. La síntesis de citocinas ocurre horas después de la activación de las MC en contraste con lo que ocurre con la liberación de los mediadores de inflamación y la generación de metabolitos del ácido araquidónico. La producción de estas citocinas indica que las MC no solo son almacén de mediadores inflamatorios, sino también tienen un papel importante en la regulación celular de la respuesta inmune (Mossman y Subach, 1996).

Las MC se encuentran principalmente en las mucosas, que son las superficies de contacto entre el organismo y el medio externo, en donde participan en funciones inmuno-reguladoras, incluyendo las reacciones inflamatorias. Las MC mucosales en el pulmón y tracto gastrointestinal son distintas de las células cebadas de otros tejidos en su bioquímica, propiedades funcionales y en su contenido de gránulos neutros de serina proteasas. La hiperplasia pronunciada, la diferenciación y activación de las MC ocurre en el intestino durante la infección por nemátodos. En roedores y ovejas esto se asocia con la liberación sistémica de los gránulos de quimiotripsina y serina proteasas de las MC en el momento de la expulsión de los gusanos; una función general de las betaquimasas de los gránulos es que pueden incrementar la permeabilidad del intestino y permitir la transferencia de anticuerpos y otras proteínas plasmáticas dentro del nicho que ocupa el parásito (Grencis, 1997; Finkelman y Col., 1999).

Los cambios epiteliales y mucosales que ocurren durante la infección intestinal por nemátodos tienen muchos rasgos que son característicos de la inflamación alérgica, incluyendo la producción de IgE, el reclutamiento de MC, basófilos, eosinófilos y la secreción epitelial alterada. Las células más comúnmente encontradas en la expulsión rápida de los parásitos son las MC, las que una vez desarrolladas permanecen en el tejido por varias semanas, mientras que los eosinófilos y basófilos sobreviven por periodos relativamente cortos. Hay nuevas evidencias de que el incremento de MC en la mucosa juega un papel importante en el rechazo cruzado a ciertos nemátodos. La importancia de la respuesta inmune de las MC en la mucosa se sugiere por los estudios *in vivo* en ratones y ratas normales e infectados con nemátodos intestinales como *N. brasiliensis* o *Trichinella spiralis*, los que inducen una marcada mastocitosis en la LP intestinal, además de los cambios histológicos y ultraestructurales durante la expulsión de los parásitos (Khan y Col., 2000).

a. CARACTERÍSTICAS

Normalmente las MC no se encuentran en la circulación. Los progenitores de estas células son liberados de la médula ósea para que migren a los tejidos periféricos para su maduración o diferenciación finales. Las MC se encuentran en todo el cuerpo, localizándose predominante cerca de los vasos sanguíneos, nervios y debajo de los

epitelios. El núcleo es típicamente redondo, el citoplasma tiene gránulos que contienen proteoglicanos que se unen a tintes básicos. Algunos de estos tintes asumen un color diferente cuando están ligados a los gránulos que cuando se tiñe el DNA nuclear, por ello son llamados meta cromáticos (Abbas y Col., 2000).

Hay dos tipos de células cebadas de acuerdo a su localización anatómica, las de la LP de la mucosa de pulmón y del tracto gastrointestinal, denominadas células cebadas de la mucosa (MMC), las que en ratas contienen mayor cantidad de sulfato de condroitina en sus gránulos de proteoglicanos y poca histamina y las MC del tejido conectivo (CTMC) que contienen heparina en la mayoría de sus gránulos de proteoglicanos y producen gran cantidad de histamina. Experimentos en ratones deficientes de MC sugieren que los fenotipos de los tejidos conectivo y mucosal no son fijos y que los cambios bidireccionales pueden ser posibles en microambientes adecuados. Las MMC son más pequeñas (12 μm de diámetro) que las CTMC (18 μm), contienen pocos gránulos por célula, con forma irregular y núcleo lobulado. En la LP intestinal hay $\sim 20,000$ MC/ mm^3 y su número se incrementa en infecciones parasitarias, inflamatorias del intestino (Lin Tong-Jun y Befus, 1999).

b.-ACTIVACION DE LAS CELULAS CEBADAS

La homeostasis de células cebadas se puede ver en dos contextos: la regulación de su número en condiciones normales (producción basal) dada por el SCF (factor de células madre) y la regulación de la hiperplasia de MC durante el proceso inflamatorio mediado por citocinas como las interleucinas (IL) del perfil TH2 como IL-3, 4, 5, 9, 10 y 13 (Shelburne y Ryan, 2001).

La activación de las MC ocurre por agregación de receptores de membrana para IgE con el anticuerpo apropiado y el antígeno específico (Galli y Col., 1993; Schuartz y Huff, 1994), por interacciones directas con bacterias patógenas (Abraham y Malaviya, 1997) o los productos de las bacterias como la enterotoxina B o la toxina del cólera (Leal-Berumen y Col., 1996; Abraham y Malaviya, 1997) o componentes de la cascada del complemento (Prodeus y Col., 1997).

Los componentes liberados por las células cebadas incluyen aminas vasoactivas como histamina y serotonina, proteoglicanos, enzimas proteolíticas y citocinas como factor

de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$) e IL-16 (Galli, 1997) . También pueden ser estimuladas para formar prostaglandina D_2 (PGD_2); leucotrienos LTC_4 , LTD_4 y LTE_4 , el factor de activación plaquetaria (PAF), IL-1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 18; factor estimulador de las colonias de macrófago-granulocito (GM-CSF), $\text{TNF}\alpha$, linfotoxinas, proteínas de inflamación de macrófagos MIP 1- α , MIP 1 β , TCA-3, factor inhibidor de migración de leucocitos (LIF), factor de crecimiento transformante beta ($\text{TGF}\beta$) y factor de crecimiento nervioso (NGF) (Galli, 2000).

Funcionalmente cada población de MC responde a diferentes citocinas las cuales influyen su fenotipo, viabilidad y habilidad para proliferar. Las CTMC murinas requieren SCF y las MMC requieren IL-3 (Crappier y Col., 1984; Schrader, 1986).

Los inicios de la hipersensibilidad inmediata están dados por la inmunoglobulina IgE adherida en la superficie de MC y basófilos a través del receptor $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$. En un individuo con alergia a un antígeno en particular una proporción significativa de IgE unida a las células cebadas es específica para el antígeno. En individuos no alérgicos, las moléculas de IgE asociadas a MC son específicas para muchos antígenos diferentes, lo que indica bajos niveles de producción de IgE.

La activación de las MC (y basófilos) resulta en tres tipos de respuestas biológicas:

- 1.-La secreción del contenido preformado de sus gránulos que es liberado por exocitosis.
- 2.-La síntesis de mediadores lipídicos que derivan de precursores almacenados en las membranas celulares y en algunos casos en cuerpos lipídicos.
- 3.-El inicio de la transcripción, traducción y secreción de citocinas.

Las células cebadas pueden ser activadas por otros mecanismos además de sus moléculas $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ de superficie. Por ejemplo por quimocinas derivadas de fagocitos mononucleares producidas como parte de la inmunidad natural o por citocinas producidas por células T o durante la anafilaxis derivada de factores del complemento como C5a producida durante la respuesta humoral. Las MC también pueden ser reclutadas en las reacciones inflamatorias y activadas por el contenido granular de los neutrófilos o por neurotransmisores como la epinefrina o sustancia P. Estos agentes son potencialmente importantes como eslabones entre el sistema nervioso y el sistema inmune. Se sabe que el sistema nervioso afecta las reacciones de hipersensibilidad (Abbas y Col., 2000).

Las interacciones entre eosinófilos, MC y otras células en el microambiente tisular son extensas y multifuncionales. Los eosinófilos tienen la capacidad de sintetizar y liberar citocinas como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-16, TGF α , TGF β , GM-CSF, TNF α , RANTES y MIP1 α . Los mediadores específicos de eosinófilos como la proteína básica principal (MBP), neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) y proteína catiónica de eosinófilos (ECP), estimulan la secreción de histamina por MC; además producen IL-6, IL-16, MIP1 α , TGF β , e IL-1 α que modulan la función linfocítica. La IL-16 se ha identificado como un ligando para CD4 y sus derivados estimulan la migración de linfocitos CD4⁺. Los linfocitos son importantes para originar citocinas IL-5, IL-3 y GM-CSF, RANTES, MIP1 α , MCP-3, las cuales tienen efecto en la supervivencia, maduración, migración y activación de eosinófilos (Befus, 1994).

b. FUNCIONES DE LAS CÉLULAS CEBADAS

Los blancos de los mediadores secretados por las MC incluyen otras células del cuerpo, tejido conectivo, epitelios, endotelios, células del sistema inmune, células del sistema nervioso y muscular. Estos blancos responden a la interacción con los mediadores de las células cebadas en numerosas formas que incluyen alteraciones en su supervivencia, corto tiempo de secreción, contracción, migración y otras respuestas funcionales como son la competencia, proliferación, diferenciación o maduración, en todos los tejidos y órganos en condiciones fisiológicas o patofisiológicas. Muchas de estas respuestas están relacionadas con la inflamación, que se asocia con el daño y el subsecuente proceso de reparación del tejido (Befus, 1994).

Otras funciones de las MC son menos conocidas y no parecen estar ligadas a los anticuerpos IgE. En reacciones de hipersensibilidad retardada en ratones, la activación de MC y liberación de serotonina es un factor importante de iniciación de cambios vasculares e infiltración celular (Askenase y Col., 1982). El número de MC se incrementa y se inicia la activación en sitios con tejido dañado así como en fracturas de hueso, cicatrización queloide y fibrosis. La hiperplasia de MC es evidente en algunos tumores y en sitios de inflamación crónica en el cuerpo.

La infección por nemátodos en el tracto gastrointestinal está acompañada por hiperplasia de MC y puede ser concomitante con la expulsión del parásito en la infección primaria (Miller, 1996). Las quimasas de MC, MMCPI, RMCP-II y SMCP son expresadas en abundancia en MMC y se detectan sistémicamente y en el lumen del intestino durante la infección por nemátodos, el aumento de RMCP-II se ha relacionado con el incremento de la permeabilidad mucosal a macromoléculas como albúmina en el yeyuno de rata, probablemente por proteólisis de proteínas de la membrana basal con el epitelio que podría explicar la alta proporción de MMC intraepiteliales en la submucosa parasitada (Miller, 1996).

d. DESARROLLO

Las MC derivan de precursores hematopoyéticos pluripotenciales que se originan en la médula ósea y migran a tejidos periféricos donde completan su diferenciación y maduración. En humanos esas células expresan el marcador CD34⁺ (Kirshenbaum y Col., 1991). Las MC maduras se encuentran en los tejidos vascularizados, especialmente en sitios que limitan el medio interno del externo como las submucosas de los tractos respiratorio, digestivo y debajo de la piel. También se encuentran en regiones que son adyacentes a vasos sanguíneos, linfáticos y nervios periféricos. Hay pocas MC en la médula ósea y cartilago y normalmente no se encuentran en sangre como células maduras (Schwartz y Huff, 1994; Galli y Hammel 1994).

La mastocitosis en tejidos seleccionados como el intestino puede ocurrir como respuesta a ciertos estímulos; como una infección por helmintos. Esta activación es timodependiente, pero en otros casos esto no es así.

Varios factores ambientales influyen sobre estas células madre para facilitar su diferenciación y subsecuente maduración en MC. Estos incluyen el SCF, también nombrado factor de crecimiento de MC (ligando c-kit) (Tsai y Col., 1991). El SCF promueve la proliferación de los progenitores de MC, los cofactores como IL-3, IL-4 e IL-10 son esenciales para el crecimiento y maduración de estos progenitores pues estimulan la maduración de las MC alterando su fenotipo y el contenido de sus mediadores. La IL-4 y el NGF facilitan el desarrollo de células cebadas de tejido conectivo (Hamaguchi y Col., 1987; Matsuda. y Col., 1991).

Los factores que inducen el cambio a MC de mucosa intestinal (IMMC) son el factor de estimulación de colonias macrófago-granulocitos (GM-CSF) (Bressler y Col., 1989), interferón gama ($\text{IFN } \gamma$) (Nafziger y Col., 1990), factor de crecimiento transformante beta ($\text{TGF } \beta$) (Broide y Col., 1989), e histamina (Schneider y Col., 1990).

ORIGEN Y MADURACIÓN DE LAS CÉLULAS CEBADAS

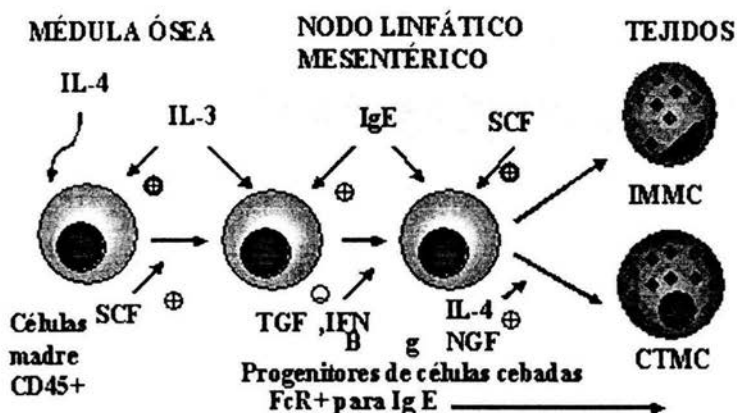


Fig.1. Factores que regulan la ontogenia de las células madre para madurar a subpoblaciones de células cebadas en los tejidos (Befus, 1994).

En roedores la clasificación de los subtipos de MC esta basada en las diferencias fenotípicas entre las MMC y las CTMC. En adición a las diferencias morfológicas y características histoquímicas, estos dos subtipos de células cebadas difieren en muchos aspectos de su desarrollo, activación y bioquímica. Las CTMC incluyen las MC de origen peritoneal y cutáneo, mientras que las MMC se refieren a las células de la LP intestinal. Las MMC son más pequeñas (5-10µm) que las CTMC (10-20 µm). La visualización de MMC por microscopía de luz requiere de técnicas especiales de fijación y tinción. En el humano las MC histoquímicamente análogas a las CTMC expresan quimasa y triptasa (MC_{TC}) mientras que las histoquímicamente análogas a las IMMC solo expresan triptasa (MC_{T}) (Lin Tong-Jun y Befus, 1999).

e. MEDIADORES DE LAS CÉLULAS CEBADAS

Las MC tienen la capacidad para producir una gran cantidad de mediadores, muchos de los cuales son pro-inflamatorios, especialmente cuando se liberan en grandes cantidades de manera explosiva. Algunos de los más conocidos son la histamina, ciertas proteasas y otras enzimas que son almacenadas en gránulos citoplasmáticos en asociación con la matriz proteoglicana.

Cuando las células están activadas hay exocitosis del contenido de los gránulos iniciando una serie de eventos en cascada a corto y mediano plazo. La activación celular también induce la síntesis de lípidos y otros mediadores que son liberados inmediatamente en el ambiente local, incluyendo prostaglandinas, leucotrienos, factor de activación plaquetaria (PAF) y óxido nítrico (Befus, 1994).

Las células cebadas también producen citocinas y cuando se activan rápidamente producen RNAm para su producción. Las células cebadas de roedores y humanos son una prominente fuente de factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (Klein y Col., 1989, Benyon y Col., 1991; Bissonnette y Befus. 1990; Gordon y Galli, 1991). Las MC, macrófagos y otras células son el origen inmediato de TNF α en un proceso inflamatorio.

Los mediadores derivados de las MC juegan un papel importante en reacciones alérgicas e inflamatorias, no solo porque actúan directamente sobre músculo liso, epitelios y endotelios, también reclutan otras células efectoras como neutrófilos, eosinófilos, monocitos y linfocitos para ampliar y regular las respuestas inflamatorias.

Estos mediadores se dividen en 3 categorías: mediadores preformados, recientemente sintetizados y citocinas. Los preformados son almacenados en gránulos citoplasmáticos y liberados bajo estimulación, entre ellos se encuentra la histamina, proteinasas neutras preformadas, tripsina y quimasa de MC, heparina, sulfato de condroitina E (proteoglicanos), hidrolasas ácidas como β hexosaminidasa, β glucuronidasa, β -galactosidasa y arilsulfatasa A. En los recientemente sintetizados están los derivados lipídicos del ácido araquidónico (eicosanoides) y fosfolípidos acetilados que estructuralmente están relacionados con el PAF y finalmente las citocinas como: SCF, TNF α , NGF, TGF β_1 , GM-CSF, INF γ , RANTES, MCP-1, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13 (Cuadro No. 1).

Cuadro1. Distribución de mediadores en los tipos de MC en roedores (Befus, 1994).

MEDIADOR	CTMC (Células cebadas de tejido conectivo).	IMMC (Células cebadas de mucosa intestinal).
Aminas preformadas		
-Histamina	+	+
-Serotonina	+	+
Peptidos quimiotácticos		
-ECF (eosinófilos)	+	
-NCF (neutrófilos)	+	
Enzimas	RMCP I	RMCP II
-Quimasa		
-Catepsina G	+	+
-Tryptasa	+	
-Carboxipeptidasa	+	+?
-Lisozima		
Proteoglicanos		
-Heparina	+	-
-Condroitínsulfatos diB		+
-Condroitínsulfatos E		+
Recientemente sintetizados		
-PAF (factor de activación plaquetaria)	+	+
-Oxido nítrico	+	+
Metabolitos del ácido araquidónico		
-PGD ₂	+	+
-LTB ₄	-	+
-LTC ₄ y metabolitos	-	+
Citocinas		
-TNF α	+	+
-IL-1,3,4,6	+	+
-IL-10, IFN γ		+
Factor estimulante de colonias macrófago- granulocitos GM-CSF	+	+

RMCP I (proteasa I de célula cebada en rata).
 RMCP II (proteasa II de célula cebada en rata).
 LT (leucotrieno).
 PGD₂ (prostaglandina D₂).
 TNF (factor de necrosis tumoral).
 IL (interleucina).

Las MC en el intestino también pueden secretar un número de factores neurotróficos como el NGF, el factor inhibidor de migración de leucocitos (LIF), un factor de diferenciación neural colinérgica, IL-3, IL-6, GM-CSF y óxido nítrico (NO) el cual es conocido por actuar como neurotransmisor o modulador del crecimiento o actividad neural.

2.-SISTEMA INMUNE INTESTINAL EN EL CERDO

Las células epiteliales intestinales forman una barrera que separa el medio interno del ambiente externo. Estas células se comunican con otras células mucosales por medio de mediadores que tienen actividades autócrinas y parácrinas que actúan sobre ellas mismas así como sobre los linfocitos intraepiteliales (IEL) otras células linfoides, fagocitos mononucleares, neutrófilos, células cebadas y eosinófilos adyacentes en la LP, que también actúan como un importante componente de la cascada de citocinas y en la liberación de mediadores adicionales. Estas cascadas de mediadores inducen y regulan la respuesta inmune y las respuestas inflamatorias en las superficies mucosales (Kagnoff y Col., 1996).

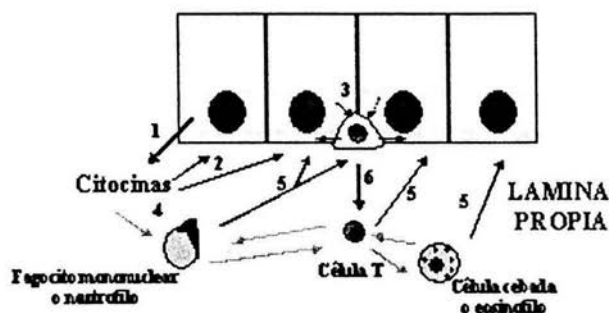


Fig. 2. Las células del epitelio intestinal son un componente integral de una red de comunicaciones. 1. Las citocinas producidas por las células epiteliales intestinales tienen un efecto autócrino o parácrino sobre otras células epiteliales, (2) además de estimular a los linfocitos intraepiteliales (3) y células que se encuentran en la lámina propia (4), que también liberan mediadores (5) que actúan sobre las células epiteliales así como sobre otras células que se encuentran en la lámina propia. Los linfocitos intraepiteliales también liberan citocinas que influyen el crecimiento y diferenciación de otras células que se encuentran en la lámina propia (6) (Kagnoff y Col., 1996).

El tejido linfoide asociado al intestino (GALT, por sus siglas en inglés) es una de las mayores subdivisiones del sistema inmune. El intestino delgado contiene grandes acúmulos de células inmunológicas (Trepel, 1974). Los linfocitos y células plasmáticas, junto con los macrófagos, eosinófilos, células cebadas y varios tipos de células presentadoras de antígeno se encuentran poblando la lámina propia; los linfocitos también están presentes en el epitelio intestinal (Parrot, 1987); nódulos linfoides organizados (placas de Peyer o agregados linfoides) se encuentran esparcidos en línea en el tracto intestinal. Cada placa contiene múltiples folículos de células B separados por áreas interfoliculares dominadas por células T. Las células plasmáticas contienen IgM, IgG e IgA que están presentes en la superficie y entre las bases de los folículos (Brown y Bourne, 1976a). Entre el epitelio y los folículos está una región que contiene células que expresan altos niveles de moléculas MHC clase II y con características morfológicas similares a las células dendríticas (Wilders y Col., 1983).

Las placas de Peyer no están completamente formadas desde el nacimiento. Acúmulos de leucocitos son visibles pero se extienden y organizan rápidamente en los primeros días de vida, incrementándose con la edad y la organización es dependiente de la presencia de antígenos de la dieta (Pabst y Col., 1988). En animales jóvenes se desarrolla una única y larga placa de Peyer en el íleon, poblada con células B. Con la edad, esta placa involuciona convirtiéndose en una serie de placas de Peyer aisladas que contienen células B y T, que sirven como sitio inductor para las respuestas de células B y T (Pastorret y Col., 2000).

a. LAMINA PROPIA

Las células plasmáticas y las células B predominan en la zona de las criptas intestinales y las células T en las vellosidades. Las células plasmáticas son predominantemente IgA e IgM pero algunas IgG también están presentes (Brown y Bourne, 1976a). Dentro de las células T que dominan la vellosidad existe una clara separación entre las células CD8 localizadas en la base del epitelio y las células CD4 que se encuentran en la lámina propia cerca del plexo capilar (Vega-López y Col., 1993). Hay una extensa expresión de antígenos MHC clase II en células de la vellosidad y criptas,

aunque una proporción está asociada con los capilares del endotelio (Wilson y Col., 1996). Grandes cantidades de eosinófilos, células cebadas y basófilos también están presentes (Pabst y Beil, 1989; Haverson y Col., 1994). Las células cebadas de la mucosa son bioquímicamente distinguibles de las de otros sitios y podrían ser comparadas con las células cebadas mucosales, descritas en otras especies (Xu y Col., 1993).

Los lechones nacen sin células T o células plasmáticas en la vellosidad y lámina propia intestinales. El desarrollo de esas células ocurre en fases. La acumulación de células plasmáticas ocurre en las primeras 4 semanas de vida siendo inicialmente IgM pero las células IgA rápidamente predominan (Brown y Bourne, 1976b). Las células T γ/δ están presentes en el feto en bajas cantidades (Trelichavsky y col., 1995). Durante la primera semana, las células CD2⁺ 4⁻ 8⁻ entran al intestino; las células CD2⁺ 4⁺ aparecen alrededor de las 3 semanas y las CD2⁺ 8⁺ a las 7 semanas (Rothkötter y Col., 1991; Bianchi y Col., 1992; Vega-López y Col., 1995).

La IgA es la inmunoglobulina de mayor secreción intestinal y la principalmente sintetizada localmente en la LP. Las células epiteliales de las criptas contienen IgA e IgM pero no IgG, indicando el transporte selectivo de las inmunoglobulinas (Brown y Bourne, 1976a). Las IgA lumbales están asociadas con el componente secretor como un receptor (Bourne y Col., 1971). La IgA también es transportada selectivamente dentro de la bilis (Sheldrake y Col., 1991). La inmunoglobulina IgG está presente en los espacios intracelulares y en la inflamación local.

La respuesta antígeno específica a patógenos en la población de células T, ha sido difícil de demostrar siguiendo las infecciones entéricas (Brim y Col., 1995). La activación *in vitro* de células T, aisladas de LP, ha demostrado la transcripción de RNAm para IL-4 pero fracasó en demostrar la transcripción o secreción de IL-2, no obstante la expresión de altos niveles del receptor CDw25 para esa citocina (Bailey y Col., 1994). Estos patrones de secreción de citocinas sugieren que la activación celular en el intestino tiende a la apoptosis, lo que quizá incluya una inmunorregulación más rápida que la expresión de memoria (Pastorret y Col., 2000). Los macrófagos aislados de la lámina propia pueden activar células T en reacciones primarias de mezcla de linfocitos, pero lo hacen pobremente en comparación con macrófagos sistémicos (Kambarage y Col., 1994).

Benítez en el 2001, reportó la densidad de eosinófilos en las semanas 2, 3, 4, 6 y 8 post-destete; los valores oscilaron entre 600 y 800 células/mm², en la LP de la vellosidad con diferencias estadísticas en la semana 6 (802 ± 93) y en la 8 (753 ± 83) $p < 0.05$ con relación a la semana 2 (619 ± 78). En la LP de las criptas reportó al inicio cerca de 700 células y al final 1400 células/mm², las diferencias estadísticas significativas en la semana 3 (771 ± 88) $p < 0.05$ y en la semana 8 (1460 ± 202) $p < 0.01$ comparados con la semana 2 (625 ± 63) post-destete.

b. EPITELIO

La mayoría de los linfocitos en el epitelio intestinal (IEL) expresan el marcador CD2. En animales maduros una alta proporción también expresa CD8⁺. En cerdos jóvenes, los IEL son en su mayor parte CD2⁺ CD4⁻ CD8⁻. Durante las primeras semanas de vida, aparecen CD2⁺ CD4⁻ CD8⁻ pero los IEL CD8⁺ no aparecen si no hasta las 7 semanas de vida (Vega López y Col., 1993; Whary y Col., 1995; Vega-López y Col., 2001). La habilidad de los IEL de los lechones a responder a los mitógenos es pobre y se desarrolla con el tiempo (Wilson y Col., 1986), aunque esto puede retrasarse por el destete temprano. El fracaso para proliferar puede reflejar su inhabilidad para producir suficiente IL-2 (Whary y Col., 1995). Sin embargo las células intraepiteliales de cerdos maduros pueden producir suficiente IL-2 e interferón gama después de la activación *in vitro* y también son capaces de efectuar cierta citotoxicidad limitada (Wilson y Col., 1986).

c. CELULAS CEBADAS PORCINAS

Las MC de la mucosa intestinal en cerdos y ratas (Jarret y Haig, 1984) varían en forma y tamaño más que las MC del tejido conectivo de la submucosa y contienen gránulos que se tiñen con menor intensidad. En cerdos las MC en la mucosa son más largas que las del tejido conectivo de la submucosa. En el estudio realizado por Manica y Col. (1983) describen a las MC de forma irregular en la mucosa y de forma más esférica en la submucosa, el diámetro promedio de las MC de la pared duodenal es de 13.3 μm y su núcleo de 6.9 μm .

El estudio hecho por Xu y Col., 1993 encontró un gran número de MC en el timo, especialmente en la médula, además de demostrar que la ultraestructura de los gránulos de las células cebadas en cerdos es distinta a la de los humanos como lo indicaban Caulfield y Col., (1980), Craig y Col., (1988-89) y Weidner y Austen (1990).

En secciones de tejido fijados con Carnoy y teñidos con azul de toluidina las MC aparecieron en la misma cantidad en la LP de la mucosa y en la submucosa de animales. Las MC de la mucosa intestinal estuvieron localizadas predominantemente en la base de las vellosidades, debajo del epitelio y en menor número dentro del epitelio. Las MC del tejido conectivo se localizaron adyacentes a la periferia de los vasos sanguíneos y fueron detectadas en la submucosa intestinal, lengua, piel, cápsulas y trabéculas de timo, bazo, tonsila y nodo linfático mesentérico (Xu y Col., 1993). La forma de las MC depende de la densidad y distribución de otras células y también de fibras de tejido conectivo.

En cerdos de 6 meses de edad el área de las MC en cortes transversales de la mucosa intestinal ($45.9 \pm 3.9 \mu\text{m}^2$) fue mayor que la de las MC del tejido conectivo de la submucosa ($40.6 \pm 3.4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0.05$) y en lechones de 1 mes de edad el área de las células cebadas en la mucosa intestinal fue de $29.5 \pm 4.8 \mu\text{m}^2$ y fue mayor que las MC de la submucosa ($21.5 \pm 2.8 \mu\text{m}^2$) ($p < 0.02$); mientras que en el yeyuno de cerdos adultos la densidad fue de $274 \pm 14 \text{ MC/mm}^2$ en la mucosa intestinal y en la submucosa intestinal fue de $265 \pm 41 \text{ MC/mm}^2$, mostrando que las MC tanto en la mucosa como en el tejido conectivo de la submucosa aumentan en tamaño (μm^2) y densidad (MC/mm^2) con la edad; su forma se vuelve más variada y su contenido granular se incrementa (Xu y Col., 1993).

3.- CELULAS CEBADAS EN PARASITOSIS

MODELOS DE INFECCION PARASITARIA

Las infecciones con nemátodos en intestino están asociadas con el desarrollo de la hipersensibilidad inmediata de tipo 1 mediada por la IgE. La IgE parásito-específica puede unirse al receptor $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ de alta afinidad que se expresa en MC, basófilos, eosinófilos, monocitos, células dendríticas, de Langerhans y plaquetas y al receptor de baja afinidad $\text{Fc}\epsilon\text{RII}$ expresado por células B y monocitos. Los linfocitos T cooperadores 2 (TH2) son

los responsables de regular la producción de IgE, la hiperplasia de MC y la eosinofilia a través de la producción de IL-4 (Miller, 1996).

Se han utilizado principalmente dos modelos experimentales de infestación parasitaria intestinal: *N. brasiliensis* y *T. spiralis* en el intestino delgado de ratas (Perdue y Col., 1990). Estos modelos han documentado una mastocitosis en la mucosa después de que los gusanos han sido expulsados del hospedero (~35 días post-infección). Las ratas desarrollan una respuesta anafiláctica ante la reexposición oral al parásito, la cual provoca su rápida expulsión.

La activación de mastocitos está asociada con la historia natural de la infección por el nemátodo. En el estudio realizado por Perdue y Col., en 1990 se hace un seguimiento de la infección con *N. brasiliensis*. El intestino inicia una respuesta aguda entre los días 7 y 10 post-infección. El daño mucosal incluye la atrofia de vellosidades e hiperplasia evidente de las criptas y la secreción de Na^+ y Cl^- durante la inflamación aguda (Ramage y Col., 1988a; Perdue y Col., 1989). En el día 10 post-infección hay un incremento significativo de la permeabilidad intestinal a macro y pequeñas moléculas. El número de MC mucosales teñidas y la disminución del nivel de histamina mucosal implica que la activación de células cebadas puede causar daño al tejido durante la fase de inflamación aguda que acompaña la infección con el parásito (Perdue y Col., 1989).

Siguiendo la expulsión del gusano, que ocurre entre la 2a. y 3a. semana postinfección, el transporte de iones y los niveles séricos de RMCP II regresan a la normalidad, mostrando un aumento dramático en el número de MC en la mucosa intestinal (Perdue y Col., 1990). En esta fase, el desafío del intestino con los antígenos de los gusanos induce una respuesta anafiláctica intestinal caracterizada por el incremento en la secreción de iones y agua, lo cual parece ser benéfico por la abundante salida de los parásitos. El desafío intravenoso con los antígenos de los gusanos, en ratas primoinfectadas, induce aumento de la permeabilidad intestinal demostrado por un aumento en la recuperación de Cr-EDTA y OVA en la sangre y orina 1 hora después de la inyección en el asa ligada del intestino (Ramage y Col., 1988a; O' Inca y Col., 1990). La liberación sistémica de RMCP II correlaciona con una reducción sustancial en el número de MC teñidas, sugiriendo su activación y desgranulación. Scudamore y Col., en 1995, demostraron una relación timo-

dependiente con la liberación de RMCP II y el incremento de la permeabilidad intestinal a macromoléculas en un modelo de anafilaxis por infección con nemátodos. La liberación de RMCP II de las MC, inducida por los antígenos de los gusanos al unirse a la IgE de superficie explica el incremento de la permeabilidad intestinal en esta respuesta anafiláctica. Resultados similares fueron encontrados en ratas infectadas con *T. spiralis* (Castro y Col., 1979). Los desafíos con los antígenos de los gusanos en ratas primoinfectadas inducen una disminución significativa en la absorción neta de fluidos, un incremento en la secreción intestinal de Cl⁻ y un rápido rechazo al parásito. En ratas la expulsión del parásito requiere de células T del fenotipo CD4⁺ CD45RC, las que aparecen en el intestino y ducto torácico linfático durante la infección (Korenaga y Col., 1996). La expulsión de los gusanos está asociada con el incremento máximo en los niveles de IL-4 e IL-5 los cuales se acentúan por la transferencia adoptiva de células protectoras CD4⁺ CD45RC- (Ramaswamy y Col., 1996). Esto sugiere que la respuesta de citocinas del tipo Th2 es protectora.

El infiltrado de eosinófilos y la hiperplasia mucosal de MC en ratones está regulada por las células Th2 que activadas secretan interleucinas 3, 4, 6, 9 y 10 y el factor estimulador de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) siendo las principales responsables de la típica respuesta de células Th2 hacia los helmintos (Miller, 1996).

En estudios sobre la infección primaria en roedores se ha demostrado que los parásitos adultos son expulsados del intestino después de la tercera semana, al desarrollarse una respuesta inmune protectora de citocinas de perfil Th2, la que produce interleucinas 4 y 5 que estimula la síntesis de anticuerpos IgA, IgG e IgE, además de la liberación de IMCP (proteasa de células cebadas intestinales) que participa en la eliminación de los parásitos adultos (Miller, 1984; Huntley y Col., 1990). Además, los parásitos inducen una respuesta de anticuerpos IgG1 e IgE acompañada de eosinofilia y mastocitosis mucosal. Estas respuestas están directamente relacionadas a un perfil de citocinas Th2. Basados en la respuesta de citocinas de un organismo infectado, la inmunidad a un antígeno específico puede ser controlada efectivamente, ser irrelevante o exacerbar la infección (Urban y Col., 1992).

La inmunidad protectora hacia *T. spiralis* está controlada por la genética del hospedero, ligada al MHC II y la producción de citocinas para una rápida o lenta expulsión

del parásito (predominio de IFN γ y de IL-4 respectivamente). La *T. spiralis* genera una efectiva y fuerte respuesta de tipo TH2 mediando los cambios inflamatorios y patológicos que acompañan a la infección (Grencis y Col., 1991).

4.- GENERALIDADES DE TRIQUINELA SPIRALIS

La triquinelosis es una enfermedad que representa un problema en muchas partes del mundo y es causada por el nemátodo *Trichinella spiralis*. Se le considera zoonosis de interés en salud pública porque es potencialmente fatal para el hombre, además de afectar la producción pecuaria por el decomiso de carne de cerdo infectada. En México se estima que la parasitosis tiene zonas endémicas importantes y su control es limitado al carecerse de métodos efectivos de diagnóstico y prevención. El parásito tiene como hospederos habituales a los cerdos. La infección que en éstos produce es de carácter primario, alcanzando al ser humano en forma secundaria. Su diagnóstico se realiza en las inspecciones sanitarias post-faena. Si bien una infestación masiva suele pasar inadvertida, en algunos casos y en cerdos jóvenes puede llegar a evidenciarse. El estudio de *Trichinella spiralis*, que es la especie que afecta al cerdo, resulta de gran interés porque, además, provee un modelo de estudio de la respuesta inmune durante su fase intestinal (Martínez, 1985; García, 1997).

A menudo, la signología de la parasitosis suele confundirse con avitaminosis, carencias minerales, Peste Porcina Clásica, así como también algunas lesiones nerviosas. Con relación a la patología y clínica humanas, puede encuadrarse como una parasitosis evidenciada por fiebre, trastornos intestinales, algias musculares, edemas periorbitales y un cuadro hemático de hipereosinofilia. Trastornos cardíacos y neurotóxicos pueden acompañar a la sintomatología mencionada, dándole un carácter de grave. Sin embargo, puede que estos síntomas no tengan manifestación aparente o bien se hallen minimizados.

Se puede decir, que la triquinelosis es una helmintiasis *sui géneris*, que presenta profundas diferencias con casi todas las parasitosis conocidas. No tiene vectores de ninguna especie, desarrollándose totalmente dentro del mismo hospedador. El agente etiológico es un pequeño gusano redondo de color blanquecino, cuyas hembras miden entre 3,5 - 4 mm de longitud, mientras que los machos no sobrepasan los 1,5 mm. Ambos presentan el extremo anterior aguzado y el posterior redondeado.

Los parásitos adultos, no perduran más de un ciclo, es decir, no producen varias generaciones, sino que se hacen adultos, copulan y mueren dejando una sola generación de embriones. A partir del día 4 hasta el 15 después de la ingestión de carne infestada con *Trichinella spiralis* pueden detectarse, en la sangre por métodos de concentración, las larvas en forma de bastoncillos de 90-120 μm de longitud y de 6 a 8 μm de grosor en su camino hacia la musculatura, las larvas musculares miden 100 x 8 μm y pueden permanecer vivas hasta 20 años en el hombre y en muchos animales toda la vida. La capacidad infestante de las triquinelas musculares para los nuevos hospederos se alcanza después de 4 a 6 semanas de la infestación (Bowman, 1995).

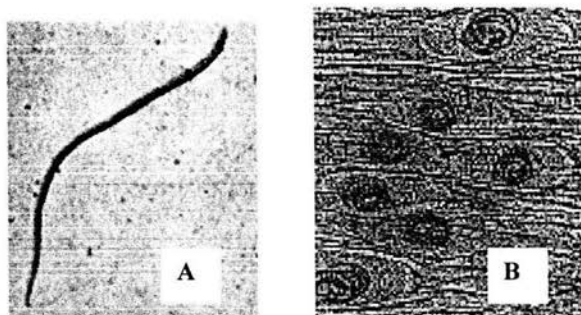


Fig.3. A) Parásito adulto de *T. spiralis* y B) larvas enquistadas del parásito. Tomado de: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasito/nematodos/img/trichinlarva2UPTON.jpg>

a. CICLO DE VIDA

Este gusano se mantiene por la existencia de organismos hospederos, casi todos mamíferos y carnívoros, teniendo dos ciclos: el doméstico y el selvático. El ciclo doméstico incluye cerdos, ratas, gatos y perros, siendo el del cerdo el de mayor riesgo para las personas dado que su carne es utilizada como alimento. El ciclo selvático (o silvestre), comprende una gran diversidad de mamíferos y carnívoros, como los osos, lince, hienas, zorros, jabalíes y chacales, también mamíferos marinos, incluyendo morsas y focas. En ambos casos, el ciclo se origina cuando uno de estos hospederos (incluyendo al hombre), ingiere carne infectada cruda o mal cocida de animales silvestres y cerdos domésticos infectada con larvas enquistadas de *Trichinella spiralis* (fase entérica). Esta carne con las

cápsulas, pasa al estómago e intestino, en donde los ácidos de los procesos digestivos las disuelven, liberando así las larvas que de inmediato invaden el epitelio del duodeno. Allí crecen y llegan rápidamente al estado adulto. Luego de tres o cuatro mudas realizadas en un lapso de tiempo muy breve, machos y hembras entran en cópula al tercer día de comenzada la infección. La hembra fecundada (vivípara, en virtud de que los huevos son incubados en el útero), se encuentra fija a la mucosa intestinal, por su extremo anterior. Iniciando así alrededor de los días 5-7 post infección la puesta de embriones, los que al nacer reciben la denominación de larvas recién nacidas. Esto último acaece aproximadamente a la semana de haber comenzado la infección y puede prolongarse por espacio de cuatro semanas más.

Las minúsculas larvas (80 micrones), con su extremidad aguzada, penetran en los vasos linfáticos (fase sistémica) y por esta vía llegan a los linfonodos. De allí se dirigen al conducto torácico y penetran en la circulación sanguínea para, finalmente, alojarse en los músculos esqueléticos. Las principales localizaciones están directamente relacionadas con la función muscular y la irrigación sanguínea. Una vez dentro de las fibras musculares, estas larvas sufren diferentes modificaciones, orientadas fundamentalmente a su diferenciación sexual, presentando el característico arrollamiento en forma de espiral. La acción defensiva del organismo parasitado, conduce a la formación de la cápsula, distrofias hialinas, céreas, grasas e infiltraciones cálcicas donde puede sobrevivir por años o calcificarse y morir (Despommier, 1993).

El corazón no es invadido por el parásito, sólo sufre alteraciones por acción neurotóxica. Los músculos lisos, tampoco suelen alojarlo. Una vez concluida la invasión muscular por las larvas, el ciclo evolutivo de la *Trichinella spiralis* finaliza. Cada hembra fecundada, tiene una producción de entre 1.000 a 1.500 larvas destinadas a la localización muscular (Leman y Col., 1992). Se ha podido determinar experimentalmente, que para que un cerdo de 70 kg de peso, muera por triquinosis, debe recibir una cantidad de 700.000 larvas, algo que difícilmente puede ocurrir en forma natural.

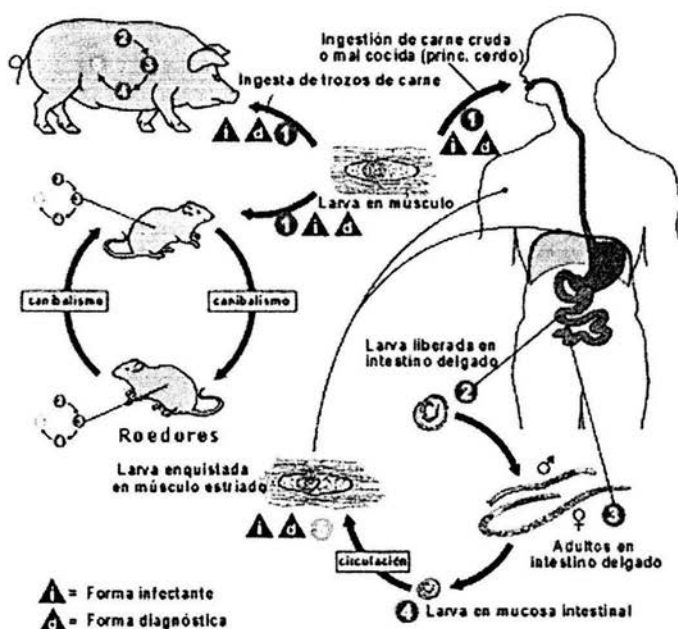


Fig.4. Ciclo biológico del parásito *T. spiralis*. La especie que afecta con mayor frecuencia al ser humano es *Trichinella spiralis*. El ciclo doméstico incluye principalmente a cerdos y ratas, en tanto que el hombre constituye un huésped paraténico. 1) FASE de infección al ingerir carne con quistes del parásito, 2) Las larvas se establecen en el intestino delgado, 3) los parásitos adultos copulan, 4) Se liberan larvas recién nacidas en la mucosa intestinal, 5) las larvas recién nacidas se enquistan en el músculo estriado esquelético. Tomado de:

<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasito/nematodos/img/trichinlarva2UPTON.jpg>

b. IMPORTANCIA ZONÓTICA Y EPIDEMIOLÓGICA

La triquinelosis es una de las zoonosis más peligrosas para la especie humana y está muy difundida en casi todo el mundo. Al igual que el cerdo y otros animales, el ser humano adquiere la triquinelosis por consumir carne parasitada, mal cocida o cruda. Dependerá de la cantidad de larvas ingeridas, que la infestación se manifieste en forma clínica (con sintomatología). Para que un ser humano presente síntomas, debe ingerir no menos de 70 larvas. Desde la ingestión del alimento parasitado, hasta la aparición de los primeros síntomas, transcurren como término medio diez días (Pozio y Bruschi, 1994).

Los síntomas que se presentan en las primeras 24 horas incluyen diarrea, náusea, calambres abdominales y en ocasiones signos nerviosos. Durante la invasión del músculo hay fiebre, edema facial (periorbital) y dolor muscular, inflamación y debilidad. El daño muscular puede causar problemas al masticar, tragar, respirar etc. y dependiendo de los músculos involucrados hay eosinofilia y síntomas neurológicos (Bowman, 1995). El diagnóstico es por medio de biopsias, autopsia del espécimen (músculo) se comprime la muestra en el triquinoscopio en el cual se observan las larvas enquistadas en el músculo, digestión artificial del músculo para liberar la larva y pruebas serológicas como ELISA (García y Bruckner, 1993; Pozio y Bruschi, 1994).

5.- RESPUESTA INMUNE A *Trichinella spiralis* EN EL CERDO

La infestación en el cerdo con *Trichinella spiralis* inicia con el consumo de músculo estriado que contenga larvas enquistadas infectantes. La digestión gástrica libera las larvas, las cuales maduran en el intestino. Los gusanos adultos producen larvas recién nacidas las cuales se diseminan a través del cuerpo vía circulación sistémica. La expulsión de los gusanos adultos de ambas infecciones primaria y secundaria es modesta y retrasada (Murrell, 1985). Sin embargo los cerdos pueden resistir infecciones secundarias por *Trichinella spiralis* y muestran resistencia inducida por la infección de larvas enquistadas de infecciones previas (inmunidad concomitante). Gamble y Col., (1986) reportaron que la reducción de la fecundidad de los gusanos hembras estuvo asociada con la producción de anticuerpos dirigidos hacia los productos de excreción secreción de las larvas musculares, mostrando antifecundidad que reduce el establecimiento de la larva muscular en cerdos desafiados. Otros reportan una fuerte respuesta de anticuerpos hacia las larvas recién nacidas (Marti y Murrell, 1986).

En el cerdo, el parásito adulto puede permanecer en el intestino por periodos de más de siete semanas desconociéndose aún los mecanismos que permiten esa larga permanencia. La cinética de la infección primaria o secundaria así como la respuesta inmune a antígenos de *Trichinella spiralis* están claramente diferenciadas en roedores y cerdos. En modelos de roedores la resistencia a *Trichinella spiralis* esta asociada con genes dentro y fuera del Complejo principal de histocompatibilidad (MHC). En cerdos se ha

definido esta molécula como el antígeno linfocítico porcino (SLA) el cual se ha detectado en células presentadoras de antígeno (APC), linfocitos B y células T activadas. Esta molécula es importante para la presentación de antígenos a los linfocitos T cooperadores para que posteriormente activen otras células para que se monte la respuesta humoral o celular (citotoxicidad). Las células epiteliales porcinas no tienen moléculas clase II, que si están presentes en las células de roedores y humanos (Romero, 2000). Sachs y Col. (1988), reportaron una disminución del 50% en la carga de larvas musculares en minicerdos con SLA cc comparado con los que tienen fenotipo dd o aa. Cuando se siguió el desafío de la infección, un alto porcentaje de minicerdos con una copia menor del alelo a referido como ax, demostró la capacidad única de aniquilar la larva enquistada de la infección primaria, confirmando que 47% de minicerdos ax exhibieron respuesta a larvas enquistadas a las 6 semanas post-infección y sólo 8% de cerdos no ax mostraron sólo una reacción débil (Baker y Col., 1994).

En un estudio histológico de minicerdos desafiados con *Trichinella spiralis* publicado por Sarmiento en 1993, se indica que la respuesta inflamatoria predominante hacia las larvas enquistadas está dada por linfocitos y macrófagos.

Ivanoska, Cuperlovic y Lunney en 1990 reportaron elevaciones persistentes de linfocitos CD4, CD8 y de la expresión de moléculas clase II en células mononucleares sanguíneas (PBMC) de cerdos ante la infección primaria con *Trichinella spiralis*. No hubo cambios en los monocitos / macrófagos circulantes o en las células B. Las líneas de células T establecidas de PBMC de minicerdos NIH infectados con *Trichinella spiralis* exhibieron un incremento transitorio en la expresión del receptor para IL-2, moléculas de clase II y marcadores CD4 y CD8 después de la estimulación *in vitro* con antígeno de *Trichinella spiralis*.

Existe una falta de información acerca del papel de las MC ante la infección con *Trichinella spiralis* en cerdos, especie cuya infección entérica y sistémica guarda muchas semejanzas con la humana por lo que puede emplearse como modelo de estudio de los mecanismos defensivos de la mucosa intestinal ante la infección con el parásito.

II JUSTIFICACION

Aunque el sistema inmune de las mucosas posee los mismos componentes que el sistémico, existen diferencias importantes en cuanto a la naturaleza y distribución de células en el tejido linfóide, presentación de antígenos, células regulatorias, secreción de ciertas clases de inmunoglobulinas, células cebadas y señales neuroendócrinas (Bienenstock y Col., 1987; Kiyono y Col., 1992).

Ya se ha descrito el desarrollo, distribución y número de células del sistema inmune intestinal porcino y la presencia y organización estructural de todos los tipos celulares necesarios para la respuesta inmune de cerdos jóvenes y adultos. También se conoce la cinética de migración de las poblaciones celulares en el epitelio y lámina propia intestinal durante el desarrollo del animal y los cambios que ocurren en el órgano ante variaciones en el ambiente como el destete (Vega-López, y Col., 1993; 1995). Sin embargo, los estudios de distribución de las MC en el cerdo son escasos y no se han realizado en infecciones parasitarias.

Con objeto de ampliar la información sobre las interacciones de los componentes del sistema inmune en presencia de agentes infecciosos en este trabajo se analizó la distribución de las MC en el intestino delgado porcino ante la infección experimental con *Trichinella spiralis*.

III HIPOTESIS

La densidad de células cebadas en el intestino porcino se verá afectada ante la infección experimental con *Trichinella spiralis*.

IV OBJETIVO GENERAL

Analizar el número y distribución de las células cebadas en el intestino delgado de cerdos infectados con *Trichinella spiralis*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Validar la técnica de tinción histoquímica de células cebadas porcinas con azul de toluidina en tejidos fijados con PLP.
- Analizar el número y distribución de las células cebadas en la mucosa y submucosa de duodeno e íleon en cerdos normales e infectados con *Trichinella spiralis*.

V MODELO EXPERIMENTAL

Se utilizaron 5 camadas de 10 cerdos destetados cada una (experimento realizado en 1995), de la raza Hampshire X Landrace de aproximadamente 6 semanas de edad y provenientes de una granja libre de enfermedades endémicas y que no vacuna a sus animales. Cada camada se dividió en dos grupos (cinco animales control y cinco infectados) los cuales se mantuvieron en jaulas por separado dentro de las instalaciones del bioterio del CINVESTAV-IPN.

Los animales se infectaron con carne de rata con larvas enquistadas de *Trichinella spiralis* (ver apéndice) a una dosis de 700 larvas /Kg. de peso y se sacrificó un animal del grupo control (sin infectar) y otro del grupo infectado de cada camada, los días 1, 15 y 40 post-infección, para lo cual se utilizó una sobredosis intravenosa de pentobarbital sódico (Anestesal/Smithkline Beecham).

Se tomaron muestras pareadas de intestino delgado proximal, 5 cm después del píloro (duodeno) y 10 cm antes de la unión íleo-cecal para íleon de los animales control e infectados a los diferentes días post-infección. Las muestras fueron de una longitud aproximada de 2 a 3 cm. Estas se depositaron inmediatamente en el fijador (Carnoy o PLP) y se fijaron por 18 horas a 4°C antes de su inclusión en parafina.

VI MATERIAL Y METODOS

1.-Se hicieron cortes histológicos de 3 μm de las muestras incluidas en parafina en un microtomo (Jung Histocut 820, Leica).

2.- Para la estandarización de la técnica de tinción para células cebadas en tejidos porcinos se compararon muestras de duodeno fijadas en Carnoy, PLP y congeladas de dos minicerdos de 5 semanas de edad (A y B). Se contaron las células del tejido de 10 campos en seco débil (10X), de cada una de las muestras para cada cerdo y se midió el área del tejido que las contenía con lo que se obtuvo la densidad de células ($\text{células}/\text{mm}^2$) en el tejido por medio de un analizador de imágenes computarizado.

El análisis estadístico se realizó comparando las muestras fijadas en Carnoy, PLP y congelada mediante la prueba t-student. La tinción para revelar las células cebadas de las muestras con los diferentes medios de conservación se describe en el apéndice.

3.- Hecha la validación de la técnica se procedió a realizar las tinciones de las muestras de duodeno e íleon de los cerdos controles e infectados.

Las MC de los tejidos se observaron en un analizador de imágenes de alta resolución integrado a una computadora (IMAGE PRO PLUS 4, MEDIA CYBERNETICS LP-1998), el cual registra directamente la imagen de las laminillas colocadas en el microscopio. Con este sistema fué posible contar las células cebadas. Los resultados se expresaron como frecuencia de MC en el epitelio (MC/mm) y densidad de MC en LP de la vellosidad, LP de criptas y submucosa (MC/mm^2). Para obtener la frecuencia se contaron las MC en todo el epitelio de la vellosidad y se midió la longitud de este en micras, se dividió el número de células entre la longitud en micras y se multiplica por mil para obtener MC/mm ; mientras que para obtener la densidad se contaron las células en un área determinada en micras, se dividió el número de MC entre el área en micras y se multiplicó por 1,000,000 obteniendo MC/mm^2 .

El análisis estadístico se realizó comparando las muestras fijadas en carnoy, PLP y congelada mediante la prueba t-student además se corrió una prueba de Andeva con corrección de Tukey, bajo un modelo factorial $2 \times 2 \times 4 \times 3$ y sus interacciones para lo cual se utilizó el programa SAS en su versión 6.12; la formula fue la siguiente:

$Y_{ijkl} = \mu + R_i + C_j + Z_k + D_l + I_{ijkl} + \epsilon_{\mu}$ donde Y_{ijkl} es cada una de las variables estudiadas; μ es una media general, R_i son las regiones del intestino delgado duodeno e ileon ($i=1,2$), C_j son los cerdos controles e infectados ($j=1,2$), Z_k son las nichos de cada una de las regiones del intestino delgado como es Epitelio, LP de la vellosidad, LP de criptas y Submucosa ($k=1,2,3,4$), D_l son los días post-infección que son 1, 15 y 40 ($l=1,2,3$), I_{ijkl} son las interacciones de todas las variables y ϵ_{μ} es un error aleatorio del modelo. Los datos se agruparon en una hoja de calculo. Las variables se colocaron en columnas; se asigno X1 para las variables R_i , X2 para C_j , X3 para Z_k , X4 para D_l y finalmente X5 para la interacción de todas las variables que fue I_{ijkl} . En la siguiente columna se colocaron las MC de todos los campos. Posteriormente se ordenaron los datos de forma ascendente para poder elevar al cuadrado los datos del epitelio y obtener así MC/mm^2 , se eliminaron los datos con valor de cero. De los datos de las MC/mm^2 se saco el logaritmo natural de todos los datos y se colocaron en la siguiente columna. Se elimina la columna de los datos de MC/mm^2 y esta hoja es la que se envía al programa SAS, donde se le pide la interacción de todas las variables que es $X1*X2*X3*X4 = X5$.

VII RESULTADOS

En la estandarización de la tinción para MC en muestras conservadas por diferentes métodos (congeladas o fijadas con Carnoy o PLP) se trabajó con duodeno de dos minicerdos de 5 semanas de edad. El patrón de referencia fueron las muestras fijadas en Carnoy; por lo tanto las muestras congeladas y las fijadas en PLP se post-fijaron en Carnoy. Se comparó la densidad de las MC en los tejidos.

De los resultados obtenidos de cada animal se obtuvo el promedio y error estándar de la media (SEM). Los resultados fueron los siguientes: CY 372 ± 26 , PLP 319 ± 17 y congeladas 359 ± 23 (Fig. 5). No hubo diferencia estadística significativa entre grupos ($P > 0.05$) como lo muestra la figura 5.

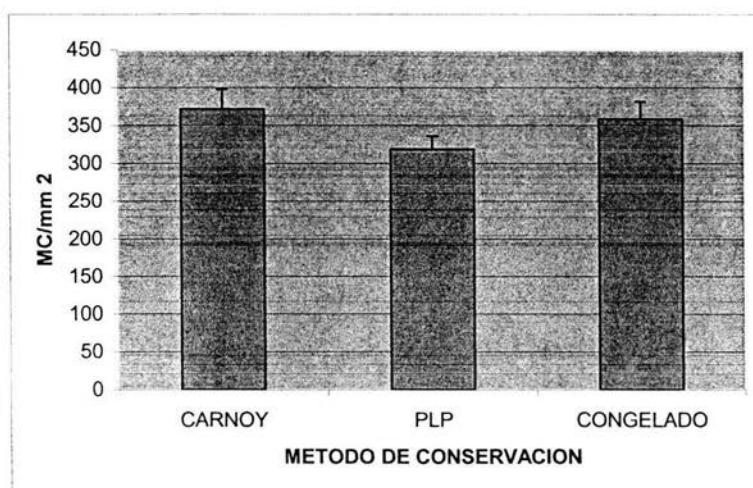


Fig. 5 Densidad de MC en duodeno porcino conservado por diferentes métodos. Las barras representan el promedio de las cuentas de al menos 10 campos microscópicos por animal ($n=2$) más el error estándar de la media.

Hecha la validación de la técnica se realizaron las tinciones en las muestras de duodeno e íleon fijadas con PLP, de los cerdos controles e infectados en los días 1, 15 y 40 del experimento. Se analizaron de cada muestra 10 campos microscópicos de la zona del epitelio de la vellosidad, la lámina propia de la vellosidad, lámina propia de las criptas y de la submucosa la cual abarcó la capa muscular y adventicia.

El desarrollo de las MC de los cerdos a diferentes semanas de edad mostró que las frecuencias y densidades son constantes en duodeno e ileon con la edad. Al compararse duodeno contra ileon en las diferentes semanas de edad se observaron diferencias estadísticamente significativas en la semana 6 de edad en el epitelio ($p = 0.029$), en la LP de la vellosidad ($p = 0.014$), en la LP de las criptas ($p = 0.008$) y en la submucosa, en la semana 6 ($p = 0.012$), en este último sitio las diferencias continuaron en la semana 8 ($p = 0.0012$) y en la semana 12 ($p = 0.0107$); evidenciándose una densidad de células menor en el ileon con excepción del epitelio en la semana 6 donde fue mayor la frecuencia de células en duodeno (Fig. 10) ver apéndice.

Con la prueba de Andeva con corrección de Tukey se mostró una diferencia significativa de 0.0001 entre duodeno e ileon; mientras que para los diferentes nichos de las regiones anteriores la significancia fue de 0.05 y entre las semanas de edad 6-8 y 6-12, teniendo un mayor número de MC en la semana 6.

Cuadro 2. Comparación de Duodeno contra ileon de los cerdos sanos en las diferentes semanas de edad. Promedios con sus respectivas SEM y prueba t de Student. * Valores con diferencia estadística significativa.

EPITELIO (Células/mm)			
	DUODENO	ILEON	Prueba t
Semana 6	0,6 ± 0,55	1,25 ± 0,5	0,029 *
Semana 8	1,6 ± 2,5	0,47 ± 0,5	0,166
Semana 12	4,8 ± 2,4	1,4 ± 0,7	0,308
LP VELLOSIDAD (Células/mm²)			
Semana 6	838 ± 287	350 ± 173	0,014 *
Semana 8	415 ± 207	302 ± 151	0,064
Semana 12	474 ± 237	124 ± 62	0,17
LP CRIPTAS (Células/mm²)			
Semana 6	613 ± 220	277 ± 98	0,008 **
Semana 8	126 ± 63	183 ± 91	0,32
Semana 12	83 ± 42	111 ± 55	0,14
SUBMUCOSA (Células/mm²)			
Semana 6	266 ± 63	122 ± 26	0,012 *
Semana 8	233 ± 56	124 ± 15	0,012 *
Semana 12	268 ± 47	158 ± 1	0,0107 **

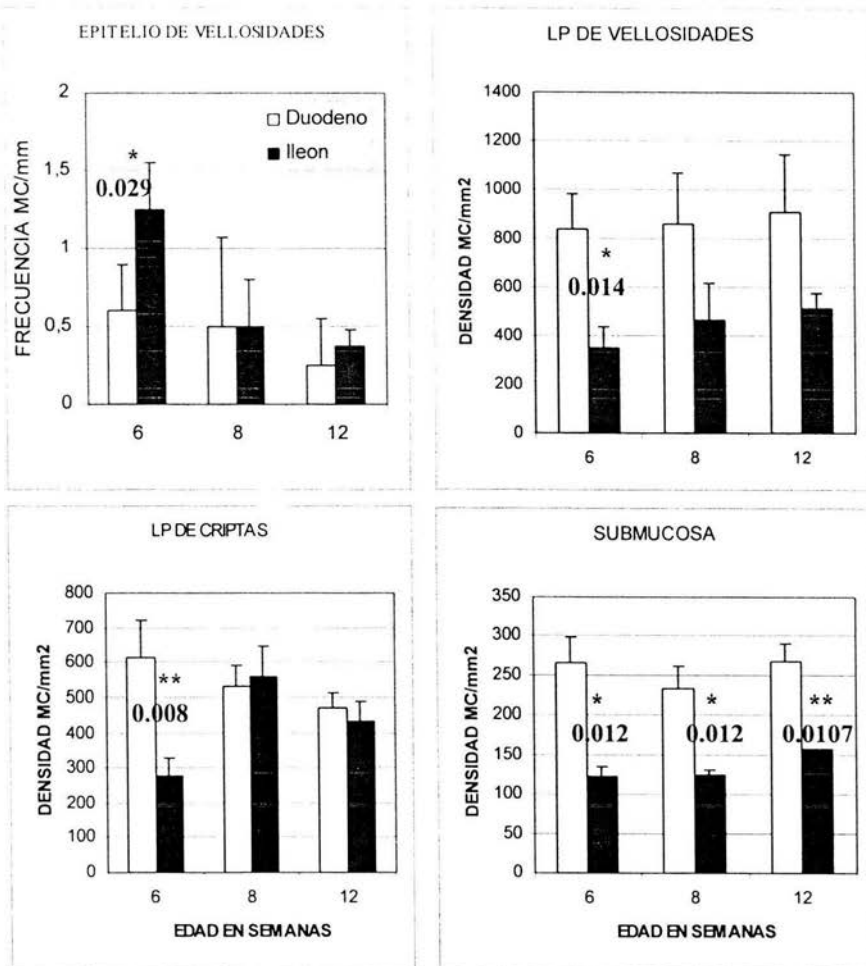


Fig. 6 Frecuencia y densidad de MC (promedio y SEM) en duodeno e íleon de cerdos sanos de 6, 8 y 12 semanas de edad. Los resultados en el epitelio de la vellosidad se reportan como MC/mm y los de LP de vellosidades, criptas y en la submucosa se reportaron como MC/mm². Cada barra representa el promedio $\pm$ SEM (error estándar de la media) del conteo de 10 campos microscópicos por muestra en cinco experimentos independientes. Las diferencias estadísticas se señalan con asteriscos.

En la infección del parásito en duodeno las diferencias estadísticas se encontraron en el día 1 PI en la LP de las criptas ($p = 0.036$) (controles 613 ± 110 MC/mm², infectados 347 ± 91 MC/mm²) y en la submucosa ($p = 0.013$) (control 266 ± 32 MC/mm² e infectados 196 ± 25 MC/mm²) como lo muestra la figura 7.

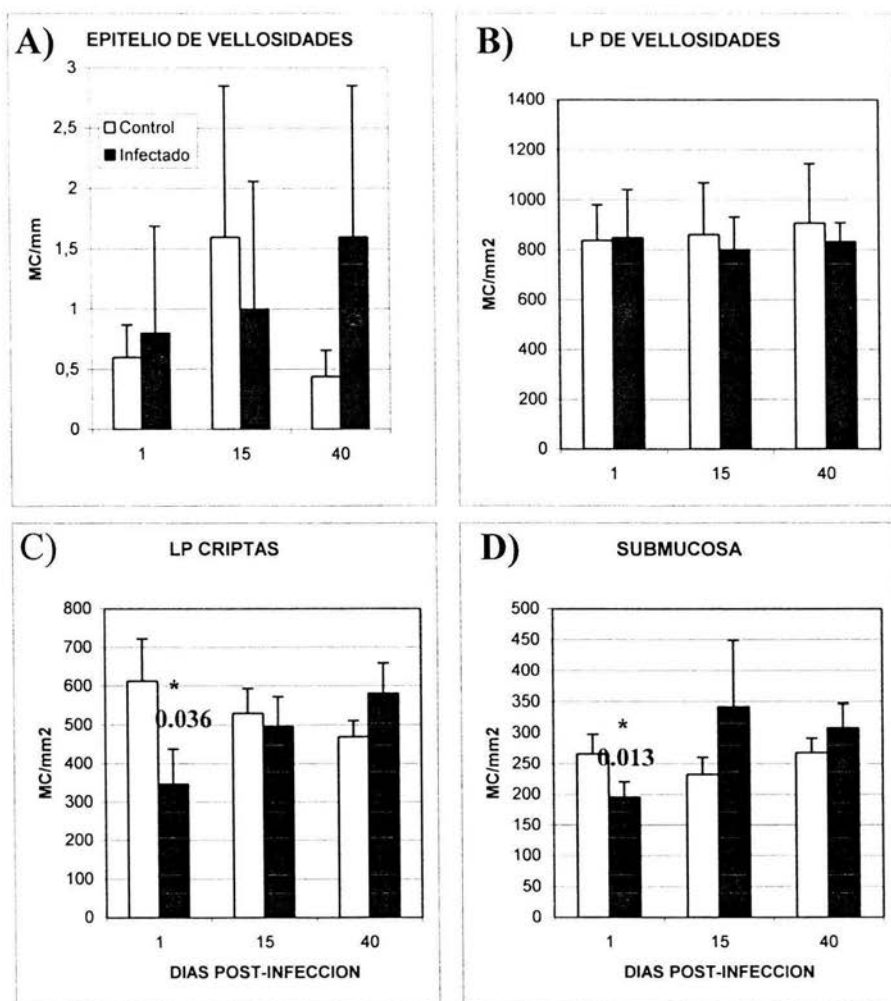


Fig. 7 Frecuencia de MC en el epitelio de las vellosidades intestinales de duodeno (A), y densidad de MC en la lámina propia de las vellosidades (B), criptas (C) y submucosa (D) del duodeno de cerdos control (barras vacías) e infectados experimentalmente con *T. spiralis* (barras llenas). Cada barra representa el promedio $\pm$ SEM del conteo de 5 experimentos independientes.

* Valores con diferencia estadística $P < 0.05$.

Mientras que en ileon las diferencias estadísticamente significativas se encontraron en el epitelio de la vellosidad los días 15 y 40 PI ($p = 0.015$ y $p = 0.05$ respectivamente) notándose un aumento de MC en los cerdos infectados como se aprecia en la figura 8. La frecuencia de MC/mm en el día 15 PI en cerdos controles fue de 0.47 ± 0.25 y en cerdos infectados fue 2.8 ± 0.89 ; en el día 40 PI la frecuencia en cerdos control fue de 1 ± 0.71 y en

cerdos infectados de 2.5 ± 0.65 como lo muestran la (fig. 8). Finalmente al día 1 PI también hubo diferencia estadística en la LP de la vellosidad ($p = 0.05$) con 350 ± 86 MC/mm² en cerdos controles y 589 ± 54 MC/mm² en cerdos infectados. Por otra parte cabe hacer mención que en íleon las MC no se mostraron dentro de las placas de peyer (zona B), sólo se localizaron en el tejido conectivo que rodea a las placas (zona interfolicular) Fig. 13. La prueba de Andeva con corrección de Tukey confirmó que no hay diferencia estadística entre los cerdos controles e infectados $P = 0.8659$ pero sí se encontraron más MC en duodeno que en íleon.

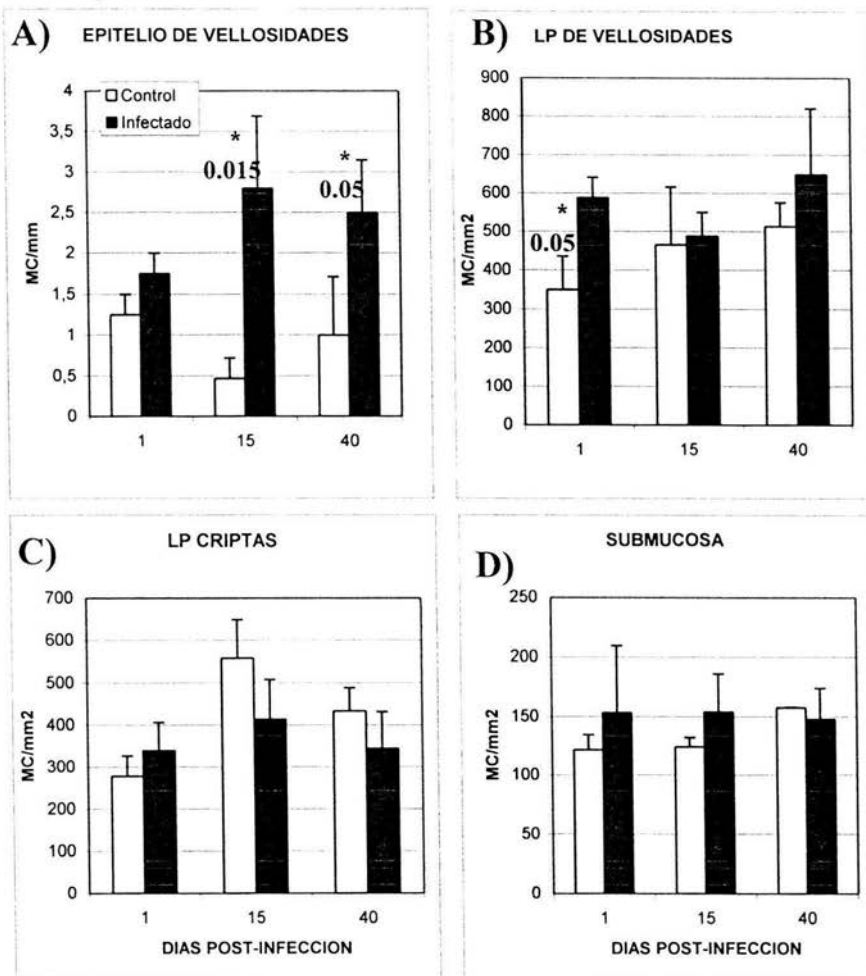


Fig. 8 Frecuencia de MC en el epitelio de las vellosidades intestinales de íleon (A) y densidad de MC en la lámina propia de las vellosidades (B), criptas (C) y submucosa (D) de cerdos control (barras vacías) e infectados experimentalmente con *T. spiralis* (barras llenas). Cada barra representa el promedio $\pm$ SEM del conteo de 5 experimentos independientes.

- Valores con diferencia estadística $P < 0.05$.

VIII DISCUSIÓN

Experiencias previas demostraron que la tinción metacromática con azul de toluidina en muestras fijadas con PLP daban resultados inferiores a los reales (Benítez y Vega-López, comunicaciones personales). Por ello se realizaron modificaciones al procedimiento de tinción buscando su optimización para su uso en muestras fijadas con PLP. Empleando muestras de minicerdos normales de 6 semanas de edad, se hicieron pruebas paralelas de tinción con muestras congeladas y fijadas con Carnoy que es el fijador recomendado para la tinción metacromática (Enerback, 1966) y PLP. Con esas modificaciones se demostró que no hubo diferencia estadística significativa en la densidad de MC teñidas en esos tejidos ($p > 0.05$) Fig.9. De cualquier forma, la evaluación de MC en los diferentes días post-infección siempre se hizo entre animales control e infectados, por lo que los resultados, independientemente de su exactitud mostraron los cambios inducidos en la mucosa por efecto de la parasitosis.

El estudio realizado por Manica y Col., (1983) en cerdos adultos de 112 kg mostró que las células cebadas tienen forma irregular en la mucosa y esférica en la submucosa. En la submucosa fue donde se reportó el mayor volumen de MC, después en las glándulas de Brünner y finalmente en la túnica muscular, el diámetro promedio de las células cebadas fue de $13.3 \mu\text{m}$ y su núcleo de $6.9 \mu\text{m}$.

Xu y Col., 1993 realizaron cuentas de MC en cortes de yeyuno de cerdos de 6 meses de edad fijados en Carnoy. Las densidades reportadas en la mucosa y la submucosa intestinal fueron de 274 ± 14 y $265 \pm 4 \text{ MC/mm}^2$ respectivamente. En este trabajo se encontró un número mayor de MC de lo que reporta Xu, esto podría deberse a las diferencias en el sitio de conteo (yeyuno vs duodeno e íleon), la diferencia en la edad de los animales muestreados y finalmente al procedimiento de fijación de muestras.

El desarrollo de las MC con la edad no mostró diferencias estadísticamente significativas, esto puede indicar que la llegada de estas células al intestino ocurre temprano en la vida del animal al menos antes de la sexta semana de vida y se mantiene estable durante el destete o hasta que el individuo sea expuesto a una infección.

Al comparar las frecuencias y densidades de las MC entre duodeno e íleon de animales normales se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el epitelio

de la vellosidad, LP de la vellosidad, LP de criptas y submucosa (cuadro 2), en esta última la diferencia se ve en las semanas 8 y 12, mostrando un mayor número de MC en duodeno y sólo en epitelio de la vellosidad el aumento de MC en íleon (fig. 10) como lo confirma la prueba Andeva con corrección de Tukey.

Este aumento significativo de MC en la submucosa podría relacionarse con la comunicación entérica neuroinmune en respuestas de hipersensibilidad gastrointestinal donde las MC detectan antígenos y liberan mensajes químicos al sistema nervioso entérico involucrándose en una respuesta anafiláctica (Frieling y Col., 1994). Esta distribución de MC nos muestra que estas células son heterogéneas, las MC de la mucosa y del tejido conectivo no tienen la misma función las IMMC se detectan sistémicamente y en el lumen del intestino durante la infección con nemátodos, mientras las CTMC se relacionan con la comunicación entérica neuroinmune.

EFECTO DE LA INFECCIÓN

En la infección por *Trichinella spiralis* se provocan cambios celulares en el intestino. En roedores la respuesta es de tipo TH2 que se caracteriza por un aumento de eosinófilos, secreción de interleucinas a través de células T CD4⁺ con predominio de IL-4 y mastocitosis que se ve reflejada en la expulsión del parásito. La inmunidad protectora contra este parásito se ve controlada por la genética del hospedero ligada al MHC y en segundo término por otros genes que ejercen una influencia profunda en la expulsión del parásito del intestino delgado (Grencis y Col., 1991). En ratas la expulsión del parásito ocurre alrededor del día 11-12 PI, requiere de células T CD4⁺ del fenotipo CD45RC⁻ el cual aparecen durante la infección en intestino y ducto linfático. Esta subpoblación de células responde a los antígenos de *T. spiralis* *in vitro* produciendo citocinas de la línea TH2 como IL-4 e IL-5 además de producir citocinas de la línea TH1 como IFN γ y TNF α ; estas células también habitan el intestino pero no transfieren inmunidad. La expulsión del nemátodo está asociada con el incremento máximo en los niveles de IL-4 e IL-5 siendo más fuerte la respuesta de tipo TH2. Estas citocinas activan células inflamatorias como eosinófilos y MC, las cuales a su vez también producen citocinas como mediadores de la inflamación.

En cerdos no existen reportes que indiquen el papel de las MC durante la infección con *Trichinella spiralis*, sólo se han reportado linfocitos T y células que expresan moléculas clase II por Ivanoska y Col., (1990) donde reportaron un aumento de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en sangre periférica después del día 60 PI y la expresión de moléculas de clase II en células mononucleares sanguíneas (PBMC) en la infección primaria, aunque sin cambios en monocitos circulantes o en células B. Las células T de PBMC de minicerdos infectados exhibieron un aumento transitorio en la expresión del receptor IL-2, moléculas clase II y marcadores CD4 y CD8 después de la estimulación *in vitro* con antígenos de *Trichinella spiralis*.

Los resultados de este trabajo indican que en duodeno hay disminuciones de MC en la LP de las criptas y submucosa al día 1 PI (fig. 7 y 11) las cuales pudieran deberse a MC desgranuladas que con la tinción metacromática no se evidenciaron. La desgranulación de las MC se relaciona con la secreción de antígenos del parásito, los cuales pueden provocar que se desgranulen y liberen mediadores inflamatorios que atraerán a otras células inflamatorias como lo demostró Benítez (2001), quien reportó que la llegada de eosinófilos inicia en la LP de las criptas desde el primer día de la infección y en la LP de la vellosidad a partir del día 5 PI manteniéndose incrementadas en los cerdos infectados con el parásito. La llegada de eosinófilos podría deberse a la acción de las MC, células epiteliales intestinales y a los IEL las cuales secretan citocinas ante la presencia de antígenos. Las IMMC liberan citocinas como la IL-4 en la respuesta típica a nemátodos, mientras los eosinófilos liberan MBP, EDN y ECP los cuales estimulan la secreción de histamina por las MC, los IEL liberan citocina IL-5 que es quimiotáctica para eosinófilos (Befus, 1994; Kagnoff y Col., 1996).

Al día 15 y 40 PI hubo un aumento significativo de MC en el epitelio (fig. 8 y 12) de la vellosidad lo cual se podría relacionar con la liberación de las LRN de los parásitos adultos que penetran el epitelio en busca del vaso linfático para iniciar su fase sistémica. En la LP de la vellosidad de íleon al día 1 PI se pudo apreciar un aumento de MC en cerdos infectados (fig. 8), esto podría indicar que las MC no se reclutan de sangre sino que se están movilizandose desde el nicho intestinal hacia la LP de la vellosidad, puede suceder que los antígenos liberados del parásito sean arrastrados por movimientos peristálticos del intestino y ello esta reacción se detecta en un lugar donde normalmente el parásito no se

establece tempranamente. Aparentemente hubo una respuesta temprana ante el establecimiento del parásito en el intestino, que fué modulada de inmediato. *Trichinella spiralis* podría secretar antígenos similares a la somatostatina o bien provocar la liberación de esta hormona, la cual en condiciones experimentales se ha visto que disminuye la actividad de las MC previniendo la hiperplasia de MC (Saavedra y Vergara, 2003). Se confirmó con la prueba de Andeva con corrección de Tukey que no hay diferencia entre animales infectados y controles.

Analizando los resultados obtenidos del proyecto respuesta inmune intestinal en cerdos infectados experimentalmente con *Trichinella spiralis*, que incluye el estudio de linfocitos (García, 1997; Romero, 2000 y Ortiz, 2001) y eosinófilos (Benítez, 2001). Se concluye que el parásito al establecerse en el duodeno induce una respuesta inflamatoria que es modulada de inmediato por el parásito como lo revelan los resultados obtenidos por García, (1997) al no encontrar cambios en la densidad de células CD4⁺ y CD8⁺ en la LP duodenal por tinciones inmunohistoquímicas, ni respuesta proliferativa de células intestinales al cultivarse ante antígenos del parásito *in vitro*. Sin embargo, la respuesta de células inflamatorias como eosinófilos se vio desde ese día PI en la LP de las criptas, en contraste las MC se ven disminuidas en número el primer día en la LP de las criptas y en la submucosa del duodeno, pero aumentadas en la LP de las vellosidades de íleon, indicándonos que existe una respuesta inflamatoria ante la agresión del parásito; Romero (2000), por citometría de flujo reportó un incremento transitorio de células CD4⁺ en la LP de duodeno el día 2 PI que pudieran estar relacionados con respuestas tempranas a la infestación. Ortiz (2001), reportó la expresión aumentada de mRNA para IL-4 e IL-10. Al día 15 PI, en la LP de la vellosidad, los eosinófilos permanecen aumentados y también aumentan las MC en el epitelio de las vellosidades de íleon; Benítez (2001), reportó en animales infectados un aumento temprano de células CD2⁺ dentro del epitelio (IEL) seguido del incremento en la proporción de células CD8⁺ el día 15 PI que pudiera relacionarse con respuestas de células NK a la infección del epitelio y a la reacción inmune tardía contra el parásito; ese mismo día se observó un cambio en la relación linfocitos/enterocitos de 1:4 en animales normales y de 1:3 en infectados indicando el reclutamiento de células inmunes en el epitelio intestinal de cerdos infectados. Al día 25 PI, Romero (2000), por citometría de flujo reportó el incremento transitorio de células

CD2⁺ y CD8⁺ en los nodos linfáticos mesentéricos (NLM); Piña-Escobedo encontró respuesta de IgG e IgA antiparásito al día 25 PI en suero y mucosa intestinal lo cual confirma que la respuesta que se está montando es tardía y del tipo TH2. Esta respuesta inmunológica no es capaz de eliminar el parásito tempranamente, finalmente al día 40 PI hubo un aumento de MC en el epitelio de íleon. Antes del día 40 PI no se detecta la hiperplasia de MC que pudiese llevar a la expulsión temprana del parásito como ocurre con los roedores, esto podría deberse a que *Trichinella spiralis* secreta antígenos parecidos a la somatostatina o bien activarla para evitar la hiperplasia de MC y se establezca una verdadera respuesta inflamatoria (MC, linfocitos, citocinas) que ayude a la expulsión del parásito.

Dentro de las perspectivas del estudio de las MC se deberán realizar técnicas de coloración para MC que permitan evidenciarlas aún desgranuladas, por otra parte sería conveniente estudiar el fenotipo de MC involucradas en la infección por el parásito, para determinar su papel en la protección del individuo.

IX CONCLUSIONES

- La modificación de la técnica metacromática de azul de toluidina para MC en muestras fijadas con PLP, permitió la detección de MC en esos tejidos.
- La llegada de las MC al intestino ocurre temprano en la vida del animal y se mantiene estable durante el destete.
- Las diferencias significativas en la frecuencia y densidad de MC en los diferentes nichos de duodeno comparado con el íleon nos indican que no son iguales.
- La infección con *Trichinella spiralis* induce una respuesta inflamatoria temprana evidenciada por la disminución de MC en LP de criptas y submucosa duodenal y aumento de MC en epitelio de vellosidades de íleon. Sin embargo estos cambios no parecen suficientes para ayudar a la expulsión del parásito antes del día 40 PI.
- Este modelo de estudio de inflamación intestinal deberá ampliarse en tiempo por lo menos hasta el día 60 PI en que se han reportado cambios celulares intestinales y con respecto a las MC se deberán realizar otros tipos de tinciones que permitan evidenciar las MC desgranuladas y el fenotipo de MC que están involucradas en la respuesta a la agresión del parásito.
- Este modelo de infección intestinal porcino tiene ventajas sobre los de laboratorio ya que permite comprender mejor la estructura, maduración y funcionamiento del sistema inmune intestinal porcino en infecciones parasitarias de importancia veterinaria y humana.

X BIBLIOGRAFÍA

- Abbas Abul K, Lichtman Adrew H, Pober Jordan S (2000). Effector mechanisms of immunoglobulin E initiated immune reactions. Biology of mast cells, basophils and eosinophils. En Cellular and Molecular Immunology. 2a. Ed. U.S.A. pp 284-292.
- Abraham SN y Malaviya R (1997). Mast cells in infection and immunity. J. Immunology **65** : 3501-3508.
- Alcántara PP, De la Rosa AGL y Correa BMO (1992). Triquinelosis: Una parasitosis fuera de serie. Ed. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE) México **16**: 1-56.
- Askenase PW, Theoharides TC, Bondy PK y Tsakalos ND (1982). Differential release of serotonin and histamine from mast cells. Nature **297**: 229-231.
- Bailey M, Hall L, Bland PW y Stokes CR (1994). Production of cytokines by lymphocytes from spleen, mesenteric lymph node and intestinal lamina propria of pigs. Immunology **82** : 577-583.
- Baker DG, Bryant JD, Urban Jr. JF y Lunney JK (1994). Swine immunity to selected parasites. Veterinary Immunology and Immunopathology **43**: 127-133.
- Befus AD (1994). Inflammation: Mast Cells: En Handbook of mucosal immunology. Ogra Peary L, Jerry R Mc Ghee, Warren Strober, Michael E Lamm, John Bienenstock, Jiri Mestecky. 2a. Ed. Academic Press. San Diego California pp. 307-314.
- Benítez Barreto Héctor Alonso (2001). Análisis de poblaciones celulares del sistema inmune intestinal de cerdos jóvenes ante la infección experimental con *T. spiralis*. En tesis para obtener el título de Licenciado en Biología. FES- Iztacala UNAM, Edo. Méx., pp. 37-50.
- Benyon R C, Bissonnette EY y Befus AD (1991). Tumor necrosis factor-alpha dependent cytotoxicity of human skin mast cells is enhanced by anti-IgE antibodies. J. Immunology **147** : 2253-2258.
- Bianchi ATJ, Zwart RJ, Jeurissen SH y Moonen- Leusen HWM (1992). Development of the B- and T-cell compartments in porcine lymphoid organs from birth to adult life: an immunohistological approach. Vet. Immunol. Immunopathol. **3** : 201-221.
- Bienenstock J, Ernst PB y Underdown BJ (1987). The gastrointestinal tract as an

- immunologic organ; state of the art. *Ann. Allergy*. **59** : Part II 17-20.
- Bissonnette EY y Befus A (1990). Inhibition of mast cell- mediated cytotoxicity by interferons alpha/beta, and gamma. *J. Immunology* **145**: 3385-3390.
 - Bourne FF, Pickup J y Honour JW (1971). Intestinal immunoglobulins in the pig. *Bioch. Biophys.* **29** : 18-25.
 - Bowman D Dwight (1995). Phylum Nematoda. *Parasitology for veterinarians*. 6a.Ed. W.B. U.S.A. Saunders company. pp 223-226.
 - Bressler R B, Thompson HL, Keefer I M y Metcalfe D D (1989). Inhibition of the growth of IL-3-dependent mast cells from murine bone marrow by recombinant granulocyte- macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunology* **143** :135- 139.
 - Brim TA, Vancott JL, Lunney JK y Saif LJ (1995). Cellular immune responses of pigs after primary inoculation with porcine respiratory coronavirus or transmissible gastroenteritis virus and challenge with transmissible gastroenteritis virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **48** : 35-54.
 - Broide DH, Wasserman SI, Alvaro-Garcia I, Zvaifler NJ y Firestein GA (1989). Transforming growth factor- β selectively inhibits IL-3 dependent mast cell proliferation without affecting mast cell function or differentiation. *J. Immunology* **143** : 1591-1597.
 - Brown PJ y Bourne FJ (1976a). Distribution of immunoglobulin staining cells in alimentary tract, spleen and mesenteric lymph node of the pig. *Am. J. Vet. Res.* **37** : 9-10.
 - Brown PJ y Bourne FJ (1976b). Development of immunoglobulin containing cell populations in intestine, spleen and mesenteric lymph node of the young pig as demonstrated by peroxidase-conjugated antisera. *Am. J. Vet. Res.* **37** : 1309-1314.
 - Castro GA, Hessel JJ y Whalen G (1979). Altered intestinal fluid movement in response to *Trichinella spiralis* in immunized rats. *Parasite Immunology* **1** : 259-266.
 - Caulfield JP, Lewis RA y Austen KF (1980). Secretion of dissociated human pulmonary mast cells: evidence for solubilization of granule contents before discharge. *J Cell Biol.* **85** : 299-312.
 - Craig, SS, Schechter NM y Schwartz LB (1988). Ultrastructural analysis of human

T and mast cells identified by immunoelectron microscopy. Lab. Invest. **58** : 682-691.

- Craig, SS, Schechter NM y Schwartz LB (1989). Ultrastructural analysis of maturing human T and mast cells *in situ*. Lab. Invest. **60** : 147-57.
- Crapper RM, Clark-Lewis I y Schrader JW (1984). The *in vivo* functions and properties of persisting cell-stimulating factor. Immunology **53** : 33-42.
- Dennis DT, Despommier DD y Davis N (1970). Infectivity of the newborn larva of *Trichinella spiralis* in the rat. J. Parasitology **56**: 974-977.
- Despommier DD (1993). *Trichinella spiralis* and the concept of niche. J. Parasitology **79** : 472-482.
- Enerback L (1966). Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 1. Effects of fixation. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica **66** : 289-302.
- Finkelman FD, Wynn TA, Donaldson OD y Urban JF (1999). The role of IL-3 in helminth induced inflammation and immunity against nematode infections. Immunoparasitology Today **11** : 420-426.
- Frieling T, Palmer JM, Cooke HJ y Wood JD (1994). Neuroimmune communication in the submucous plexus of guinea pig colon after infection with *Trichinella spiralis*. Am. J. Physiol. **267**: G709-G715.
- Galli SJ, Tsai M y Wershil BK. (1993). The c-kit receptor, stem cell factor, and mast cells. What each is teaching us about the others? Am. J. Pathology **142** : 965-974.
- Galli SJ y Hammell (1994). Mast cell and basophil development. Curr. Opin. Hematol. **1** : 33-39.
- Galli SJ (1997). Complexity and redundancy in the pathogenesis of asthma: reassessing the roles of mast cell and T cells. J. Exp. Med. **186** : 343-347.
- Galli SJ (2000). Mast cells as sentinels of innate immunity. Curr. Biology **10** : R93-R95.
- Gamble HR, Murrell KD y Marti HP (1986). Inoculation of pigs against *Trichinella spiralis* using excretory –secretory antigens. Am. J. Vet. Res. **47**: 2396-2399.

- García Lynne S y Bruckner David A (1993). *Diagnostical medical parasitology*. Ed. 2nd. American Society microbiology (ASM) Washington D.C pp. 213-219.
- García Reyna Patricia Beatriz (1997). Efecto de la infección experimental con *T. spiralis* sobre las poblaciones celulares del sistema inmune intestinal porcino. En tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias (Microbiología). FES-Cuautitlan Izcalli UNAM, Edo. Méx., pp. 1-47.
- Gordon JR y Galli SJ (1991). Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor alfa (TNF α) /cachectin by mouse mast cells stimulated via the Fc ϵ RI. A mechanism for the sustained action of mast cell-derived TNF α during IgE-dependent biological responses. *J. Exp. Med.* **174** : 103-107.
- Grecis RK, Hültner L y Else KJ (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**: 329-332.
- Grecis RK (1997). Th2 mediated host protective immunity to intestinal nematode infections. *Philosophical Transactions of Royal Society London.* **352** : 1377-1384.
- Hamaguchi, Y, Kanakura Y, Fujita J, Takeda S, Nakano T, Tarui S, Honjo T y Kitamura Y (1987). Interleukin 4 as an essential factor for in vitro clonal growth of murine connective tissue type mast cells. *J. Exp. Med.* **165** : 268-273.
- Haverson K, Bailey M, Higgins VR, Bland PW y Stokes CR (1994). Characterisation of monoclonal antibodies specific for porcine monocytes, macrophages and granulocytes from peripheral blood and mucosal tissues. *J. Immunological Meth.* **170** : 233-245.
- Huntley JF, C Gooden GF, Newlands A, Mackellar DA, Lamas D, Wakelin M, Tuohy RG, Woodbury y HRP Miller (1990). Distribution of intestinal mast cell proteinase in blood and tissues of normal and *Trichinella* infected mice. *Parasite Immunology* **12** : 85-95.
- Ivanoska D y Cuperlovic K Lunney JK (1990). Peripheral blood mononuclear cell subsets during *Trichinella spiralis* infection in pigs. *Res, Vet. Sci.* **49** (1) : 92-97.
- Jarret EEE y Haig, DM (1984). Mucosal mast cells in vivo and in vitro. *Immunology Today* **5** : 115-119.
- Kagnoff Martín F, Hiroshi Kiyono, Lars Eckman, Suk-Kyan Yang, George Huang, Hyun C Jung, Sharon L Reed y Hoshua Fiener (1996). Intestinal epithelial cells: An integral component of the mucosal immune system. En : *Essentials of mucosal immunity*. Academic Press. U.S.A. pp. 63-71.

- Kambarage D, Bland P y Stokes C (1994). The accessory cell activity of porcine intestinal macrophages in the induction of T-cell responses. *J. Vet. Med. Sci.* **56** : 1135-1138.
- Khan WI, Blennerhasset CMA, KL Matthaei y SM Collins (2000). Stat 6 dependent goblet cell hyperplasia during intestinal nematode infection. *Parasite Immunology* **11** : 420-426.
- Kirshenbaum AS, Kessler SW, Goff JP y Metcalfe DD (1991). Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *J. Immunology* **146** : 1410-1415.
- Kiyono H, Bienenstock J, Mc Ghee JR y Ernst PB (1992). The mucosal immune system: features of inductive and effector sites to consider in mucosal immunization and vaccine development. *Reg. Immunology* **4** : 54-62.
- Klein LM, Lavker RM, Matis W L y Murphy GF (1989). Degranulation of human mast cells induces an endothelial antigen central to leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86** : 8972-8976.
- Korenaga M, Watanabe N, Abe T y Hashiguchi Y (1996). Acceleration of Ig E responses by treatment with recombinant interleukin-3 prior to infection with *Trichinella spiralis* in mice. *Immunology* **87** : 642- 646.
- Leal-Berumen I, Snider DP, Barajas López C y Marshall JS (1996). Cholera toxin increases IL-6 synthesis and decreases TNF-alfa production by rat peritoneal mast cells. *Immunology* **156** : 316-321.
- Leman Allen D, Straw Barbara C, Mengeling William L, Allaire Sylvie D y Taylor David J (1992) *Disease of swine*. Ed. 7th University Iowa. AMES USA. pp.724-726.
- Lin Tong-Jun, Befus A Dean (1999). Mast cell and Eosinophils in mucosal defenses and pathogenesis. En *Handbook of Mucosal Immunology*. Ogra Pearay L., Mc Ghee Jerry R., Strober Warren, Lamm Michael E., Bienenstock J, Mestecky Jiri . Eds. Academic Press, San Diego California pp 469-482; 709-718.
- Manica Cerne, S Bavdek y L Senk (1992). Mast cells in the duodenal wall of the pig (*Sus scrofa domestica*). 1. Influence of fixative solutions on the stain properties of mast cells. 2. Volume density, distribution, shape and size of mast cells. *Veterinarski archiv* **62** (Suppl.) S9-S15 y S17-S23.
- Marti HP y Murrell KD (1986). *Trichinella spiralis*: anti-fecundity an anti-newborn larvae immunity in swine. *Exp. Parasitology* **62**: 370-375.

- Martínez-Marañón R (1985): ¿Está aumentada la triquinosis en México? ¿Podría esto ser una consecuencia inesperada en nuestro desarrollo?. Sal. Púb. México. **27** : 40-41.
- Matsuda H, Kannan Y, Ushio H, Kiso Y, Kanemoto T, Suzuki H y Kitamura, Y (1991). Nerve growth factor induces development of connective tissue-type mast cells *in vitro* from murine bone marrow cells. J. Exp. Med. **174** : 7-14.
- Miller HRP (1984). The protective mucosal response against gastrointestinal nematodes in ruminants and laboratory animals. Veterinary Immunology and Immunopathology **6** : 167-170.
- Miller RP Hugh (1996). Mucosal mast cells and the allergic response against nematode parasites. Veterinary Immunology and Immunopathology **54** : 331-336.
- Mossman TP y Subach (1996). The expanding universe of T cells subsets Th1, Th2 and more. Immunology Today **17**: 139-146.
- Murrell KD (1985). *Trichinella spiralis*: Acquired immunity in swine. Exp. Parasitol. **59** : 347-354.
- Nafziger L, Arock M, Guilloson L y Wietzerbin L (1990). Specific high-affinity receptors for interferon- γ on mast cell precursors. Eur. J. Immunology **20**: 113-117.
- O'lncá R, Ramage JK, Hunt RH y Perdue MH (1990). Antigen induced mucosal damage and restitution in the small intestine of the immunized rat. Int Arch Allergy App. Immunol. **91**: 270-277.
- Ortiz Sánchez Elizabeth (2001). Estandarización de la Técnica de hibridación *in situ* para la detección de RNAm de citocinas en intestino porcino. Tesis de Licenciatura para obtener el título de QFB. FES-Cuautitlan UNAM Izcalli, Edo. Méx., pp. 87-91.
- Pabst R, Geist M, Rothkotter HJ y Fritz FJ (1988). Postnatal development and lymphocyte production of jejunal and ileal Peyer's patches in normal and gnotobiotic pigs. Immunology **64** : 539-544.
- Pabst R y Beil W (1989). Mast-cell heterogeneity in the small- intestine of normal, gnotobiotic and parasitized pigs. Int. Arch. Aller. Appl. Immunology **88** : 363-366.
- Pastoret Paul-Pierro, Philip Griebel Hervé Bazin y André Govaerts (2000). Immunology of the pig. Mucosal immunity. Handbook of vertebrate immunology. Academic Press. pp. 402-419.

- Parrot DMV (1987). The structure and organization of lymphoid tissue in the gut. Food allergy and intolerance. J Brostoff y SF Challacombe (Eds.). Bailliere Tindall, WB Saunders, Londres, Reino Unido. pp 3-26.
- Perdue MH, Ramage JK, Burget O, Marshall J y Masson S (1989). Intestinal mucosal injury is associated with mast cell activation and leukotriene generation during *Nippostrongylus* induced inflammation in the rat. *Gastroenterology* **34** : 724-731.
- Perdue MH. Marshall J y Masson S (1990). Ion transport abnormalities in inflamed rat jejunum: involvement of mast cells and nerves. *Gastroenterology* **98** : 561-567.
- Pozio E y Bruschi F (1994). Updating on trichinellosis. *Parasitology Today* **10**: 44-46.
- Prodeus AP, Zhou X, Maurer M, Galli SJ y Carroll MC (1997). Impaired mast cell-development natural immunity in complement C3-deficient mice. *Nature* **390** : 172-175.
- Ramage JK, Hunt RH y Perdue MH (1988a). Changes in intestinal permeability and epithelial differentiation during inflammation in the rat. *Gut* **29** : 57-61.
- Ramaswamy K, Negrao-Correa D y Bell R (1996). Local intestinal immune responses to infection with *Trichinella spiralis*: Real-time, continuous assay of cytokines in the intestine (afferent) and efferent thoracic duct lymph of rats. *J. Immunology* **156** : 4328-4337.
- Romero Ramírez Héctor (2000). Análisis por citometría de flujo de las poblaciones celulares del sistema inmune porcino ante la infección experimental con *Trichinella spiralis*. En Tesis de Licenciatura para obtener el título de QFB. FES-Cuautitlán UNAM Izcalli, Edo. Méx., pp. 77-81.
- Rothkötter HJ, Ulbrich H y Pabst R (1991). The postnatal development of gut lamina propria lymphocytes: number, proliferation and T and B cell subsets in conventional and germfree pigs. *Pediatr. Res.* **29** : 237-242.
- Sachs DH, Germana S y El- Gamil M. (1988). Class II genes of miniature swine. *Immunogenetics* **28** : 22-32.
- Saavedra Y y Vergara P (2001). Somatostatin inhibits mucosal mast cell degranulation in normal conditions and during mast cell hyperplasia. *Parasite* **8**: S114-S116.
- Schneider E, Piquet-Pellorce C y Dy M (1990). New role for histamine in

interleukin-3-induced proliferation of haematopoietic stem cells. *J. Cell Physiology* **143** : 337-343.

- Schrader JW (1986). The panspecific hemopoietin of activated T lymphocytes (interleukin-3). *Annu. Rev. Immunology* **4** : 205-230.
- Schwartz L y Huff T (1994). Biology of mast cells and basophils in: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW, eds. *Allergy: principles and practice*, 4th edn. St, Louis: CV Mosby. pp135-168.
- Scudamore CL, Thomson EM, Mc Millan I, Newlands GEJ y Miller HRP (1995). Release of the mucosal mast cell granule chymase, rat mast cell protease-II, during anaphylaxis is associated with rapid development of paracellular permeability to macromolecules in rat jejunum. *J. Exp. Med.* **182**: 1871-1881.
- Shelburne CP y JJ Ryan (2001). The role of Th2 cytokines in mast cell homeostasis. *Immunological Revs.* **179** : 82-93.
- Sheldrake R.F, Romalis LF y Saunders MM (1991). Origin of antibody in porcine bile after intraperitoneal immunisation. *Res. Vet. Sci.* **50** : 242-244.
- Trebichavsky I, Sinkora J, Reháková Z, Splíchal I, Whyte A, Binns R, Posp R y Tucková L (1995). Distribution of gamma/delta T cells in the pig fetus. *Folia Biologica* **41**: 227- 237.
- Trepel, F (1974). Number and distribution of lymphocytes in man: a critical analysis. *Klin. Wochenschr.*, **52** : 511-515.
- Tsai BM, Shih L-S, Newlands GFJ, Takeishi T, Langley KE, Zsebo KM, Miller HRP, Geissler EN y Galli SJ (1991). The rat *c-kit* ligand, stem cell factor, induces the development of connective tissue-type and mucosal mast cells in vivo. Analysis by anatomical distribution, histochemistry, and protease phenotype. *J. Exp. Med.* **174** : 125-131.
- Urban JF, Madden KB, Svetic A, Cheever A, Trotta PP, Gause WC, Katona IM y Finkelman FD (1992). The importance of the TH2 cytokines in protective immunity. *Immunology Rev.* **127** : 205.
- Vega-López M.A, E Telemo, M Bailey, K Stevens y CR Stokes (1993). Immune cell distribution in the small intestine of the pig; immunohistological evidence for an organized compartmentalization in the lamina propria. *Vet. Immunology. Immunopathology.* **37** : 49-60.
- Vega-López MA, Bailey M, Telemo E y Stokes CR (1995). Effect of early weaning on the development of immune cells in the pig intestine. *Vet. Immunology.*

Immunopathology. **44** : 319-327.

- Vega-López MA, Arenas-Contreras G, Bailey M, González-Pozos S, Stokes CR, Ortega G y Mondragón-Flores R (2001). Development of intraepithelial cells in the porcine small intestine. *Developmental Immunology*. **8** (2) : 147-158.
- Weidner N y Austen KF (1990). Evidence for morphodiversity of human mast cells. An ultrastructural mast cells from multiple body sites. *Lab. Invest.* **63**: 258-263.
- Whary MT, Zarkower A, Confer FL y Ferguson FG (1995). Age-related differences in subset composition and activation responses of intestinal intraepithelial and mesenteric lymphocyte lymphocytes from neonatal swine. *Cellular Immunology* **163** : 215-221.
- Wilders MM, Drexhage HA, Weltevreden EF, Mullink H, Duijvestijn A y Meuwissen SCM (1983). Large mononuclear Ia positive veiled cells in Peyer's patches. 1. Isolation and characterisation in rat, guinea-pig and pig. *Immunology* **48** : 453-460.
- Wilson AD, Stokes CR y Bourne FJ (1986). Responses of intraepithelial lymphocytes to T -cell mitogens: a comparison between murine and porcine responses. *Immunology* **58** : 621- 625.
- Wilson AD, Haverson K, Bland PW, Stokes CR y Bailey M (1996). Expression of class II MHC antigens on normal pig intestinal endothelium. *Immunology* **88** : 98-103.
- Xu LR, MM Arr, AP Bland y GA Hall (1993). Histochemistry and morphology of porcine mast cells . *Histochemical Journal* **25** : 516-522.
- <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasito/nematodos/img/trichinlarva2UPTON.jpg>

XI APENDICE

Se obtuvieron larvas musculares de *Trichinella spiralis* (mantenida en el laboratorio por pases continuos en ratas) a partir de tejido muscular de ratas Wistar infectadas experimentalmente, de acuerdo a la técnica descrita por Dennis y Cols en 1970. Las ratas se sacrificaron bajo anestesia general utilizando cloroformo, se obtuvo el músculo esquelético y tejido óseo que se maceró finamente en una procesadora de alimentos. El macerado se incubó en solución al 1% de pepsina en HCl al 1% a razón de 10 ml/g de carne, con agitación constante (200 rpm) a 37° C por 3 hr. Transcurrida la incubación, la mezcla se pasó a través de un tamiz y se vertió en un embudo en cuyo extremo se colocó una manguera unida a un tubo Falcon de 15 ml para que permitiera la sedimentación de las larvas enquistadas. El sobrenadante del tubo se decantó y las larvas enquistadas del fondo se lavaron con amortiguador de fosfatos salino (PBS) por centrifugación a 1800 X g por 3 minutos en una centrífuga clínica (Damon IEC/División) hasta que el sobrenadante estuviera claro. Del paquete de larvas se hizo una dilución 1:100 en bacto agar al 0.2% y se tomaron alícuotas de 10 µl para su conteo. Finalmente se determinó el número de larvas por gramo de macerado para utilizarse en la infección de los animales durante el experimento.

REACTIVOS

PARAFORMALDEHIDO LISINA PERYODATO (PLP)

1) Tampón de lisina-fosfato

a) Monohidrocloreuro de lisina	0.2 M	3.62 g
agua destilada	Cbp	100 ml

b) Na₂HPO₄ 0.1 M

Na₂HPO₄ . 2H₂O 1.78g (1.42 con sal anhidra)

Agua destilada cbp 100 ml

Mezclar una parte de a y una de b; ajustar el pH a 7.4 con ácido clorhídrico.

2) Paraformaldehído al 8%

8 g paraformaldehído

cbp agua destilada 100 ml

Disolverlo en la parrilla a una temperatura de 60-65°C en agitación, agregar unas gotas de hidróxido de sodio 10N hasta que se aclare. Dejar enfriar la solución y agregar 5.4 g de glucosa por cada 100 ml.

PROCEDIMIENTO: Justo antes de usar , mezclar 3 partes de 1 y una parte de 2, añadirle meta-peryodato de sodio hasta alcanzar una concentración final de 0.01 M.

CARNOY

-Alcohol metílico 100% 60 ml

-Cloroformo 30 ml

-Ácido acético glacial 10 ml

AZUL DE TOLUIDINA DE LILLIE

1.- Azul de Toluidina o tionina 0.5 g

Solución amortiguadora 100 cc o ml

Para preparar la solución amortiguadora se mezclan 9.5 ml de acetato de sodio (en concentración de 0.8 mg/ml en agua destilada) y 7 ml de HCl al 37 % en 500ml de agua destilada.

El azul de Toluidina se disuelve en 100ml de solución amortiguadora.

AGUA ACIDULADA

-Agua destilada 100 ml

-Ácido clorhídrico concentrado 10 ml

Para las muestras fijadas en Carnoy

-Calentar la laminilla en la estufa a 57 grados por 15 minutos.

Se desparafinizó como se indica

- Xilol 1 por 15min,
- Xilol 2 por 5 min.
- Alcohol absoluto 1 por 5 min
- Alcohol absoluto 2 por 5 min.
- Alcohol 90% 1 por 5 min
- Alcohol 90% 2 por 5 min.

- Alcohol 70 % hasta cambiar la densidad de la laminilla.
- Agua destilada hasta cambiar la densidad de la laminilla.
- Azul de Toluidina de Lillie por 40 minutos.
- Revelar con agua acidulada un pase.
- Montar en micromount.

Para las muestras fijadas en PLP

- Calentar en la estufa a 57 grados por 15 minutos.
 - Xilol 1 por 15min
 - Xilol 2 por 5 min.
 - Alcohol absoluto 1 por 5 min
 - Alcohol absoluto 2 por 5 min.
- Carnoy frío por una hora
- Alcohol 70 % hasta cambiar la densidad de la laminilla.
- Agua destilada hasta cambiar la densidad de la laminilla.
- Azul de Toluidina de Lillie por 40 minutos.
- Revelar con agua acidulada un pase.
- Montar en glicerol-PBS 1:1

Para las muestras congeladas

- Lavar el tejido con PBS por 5 minutos.
- Fijar con Carnoy frío por 15 minutos
- Baños con alcohol al 70% 1 y 2.
- Baños con agua destilada.
- Azul de toluidina de Lillie 40 minutos.
- Revelar con agua acidulada un pase.
- Montar con micromount.

CARNOY

PLP

CONGELADAS

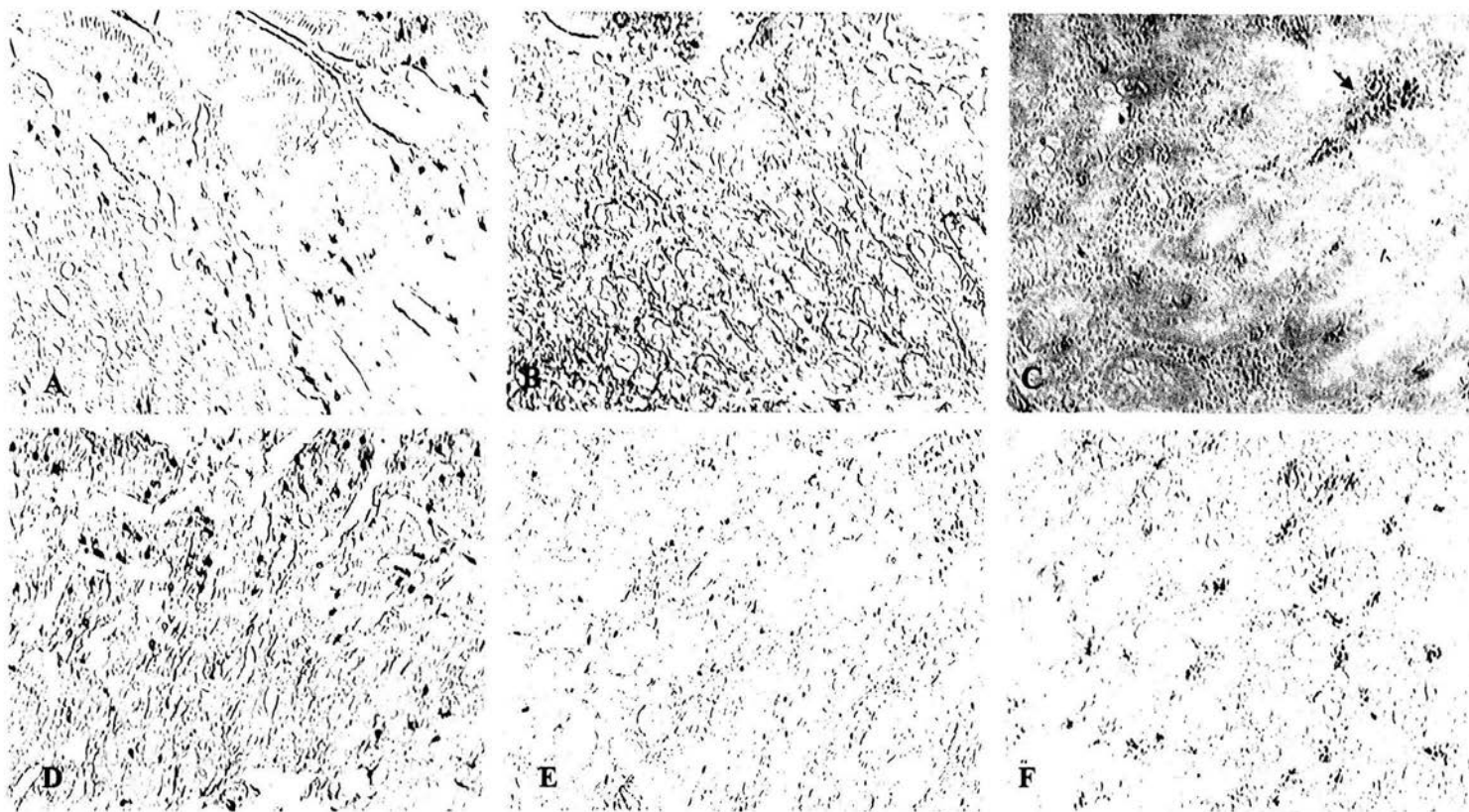


Fig. 9 MC en duodeno de cerdos conservados de diversa manera. A y D) Tejidos fijados con Carnoy las MC se encuentran tanto en las vellosidades y criptas de los minicerdos; B y E) fijadas con PLP se ve la misma distribución, pero teñidas con menor intensidad y C y F) Tejidos congelados se ve la misma distribución pero se aprecian cúmulos de MC que en las muestras fijadas con Carnoy no se observan. Aumento 10X, tinción metacromática de azul de toluidina.

VELLOSIDADES

CRIPTAS

SUBMUCOSA

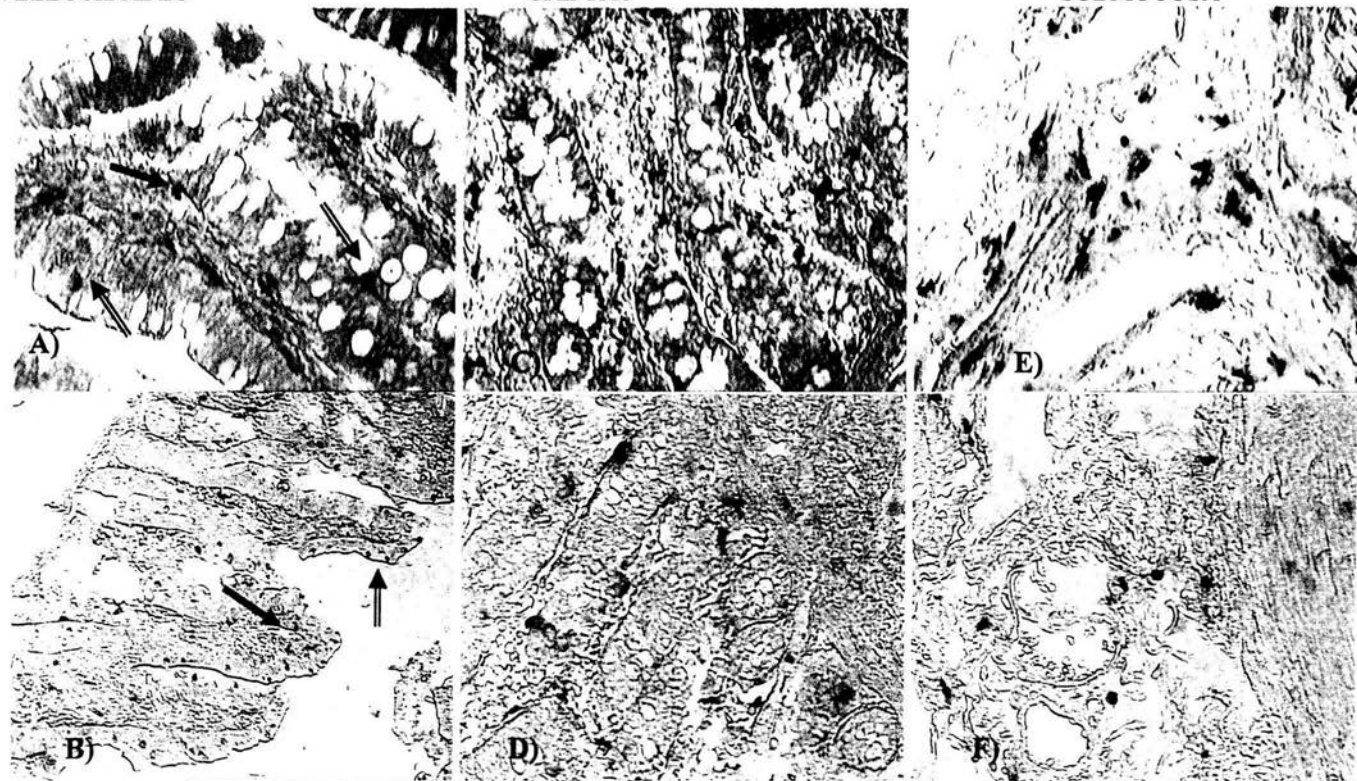


Fig. 10 . MC de duodeno e ileon teñidas con azul de toluidina en cerdos de 6 semanas de edad. A) Vellosidad de duodeno, se aprecian las MC en la LP de la vellosidad (20X), B) Vellosidad de ileon, las MC se aprecian tanto en epitelio flecha blanca, como en LP de la vellosidad (10X); C) Criptas de duodeno (20X), las MC se aprecian en la LP en mayor cantidad con respecto a ileon (D); E) Submucosa de duodeno (20X), las MC se encuentran en el tejido conectivo perivascular en mayor número con respecto a ileon (F). En la submucosa en las semanas 8 y 12 sucede la misma distribución que en la semana 6 de edad.

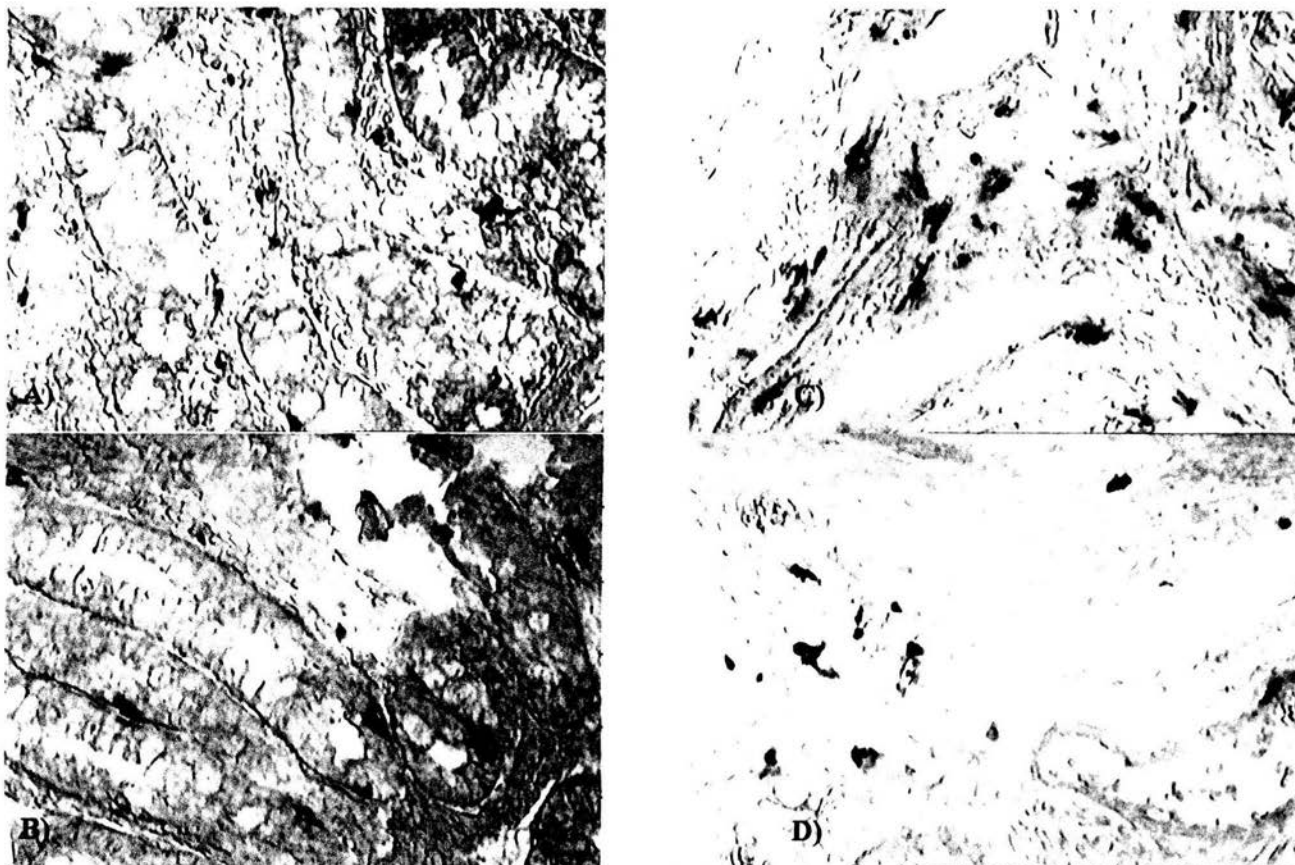


Fig. 11. MC en duodeno de cerdos control e infectados con *Trichinella spiralis*. Tinción de azul de toluidina. Criptas de duodeno al día 1 PI (20X): A) cerdo control B) cerdo infectado se aprecia una disminución de MC en los cerdos infectados. Submucosa de duodeno al día 1 PI (20X): C) cerdo control, D) cerdo infectado con *Trichinella spiralis* las MC se encuentran en tejido conectivo perivascular, se aprecia una disminución de MC en los cerdos infectados.

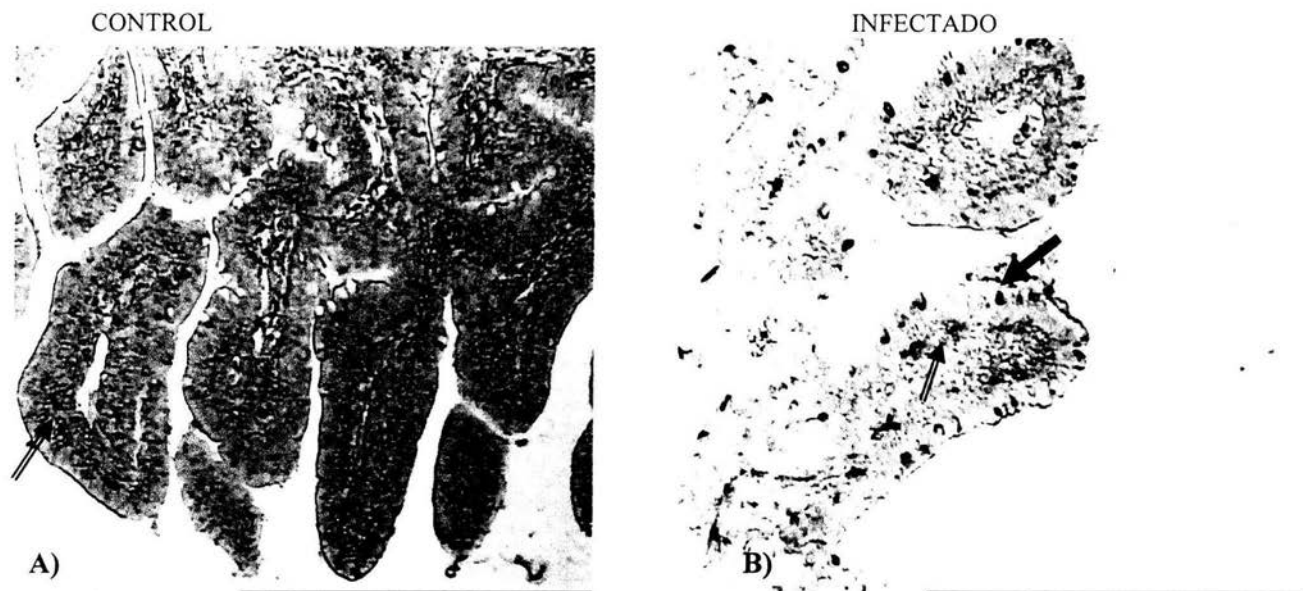


Fig. 12. MC en vellosidades de ileon teñidas con azul de toluidina (10X): A) Día 1 PI cerdos controles las MC se encuentran en la LP de la vellosidad (flecha blanca). B) cerdos infectados se aprecia un mayor número de MC en la LP de la vellosidad con respecto al epitelio (flecha negra).

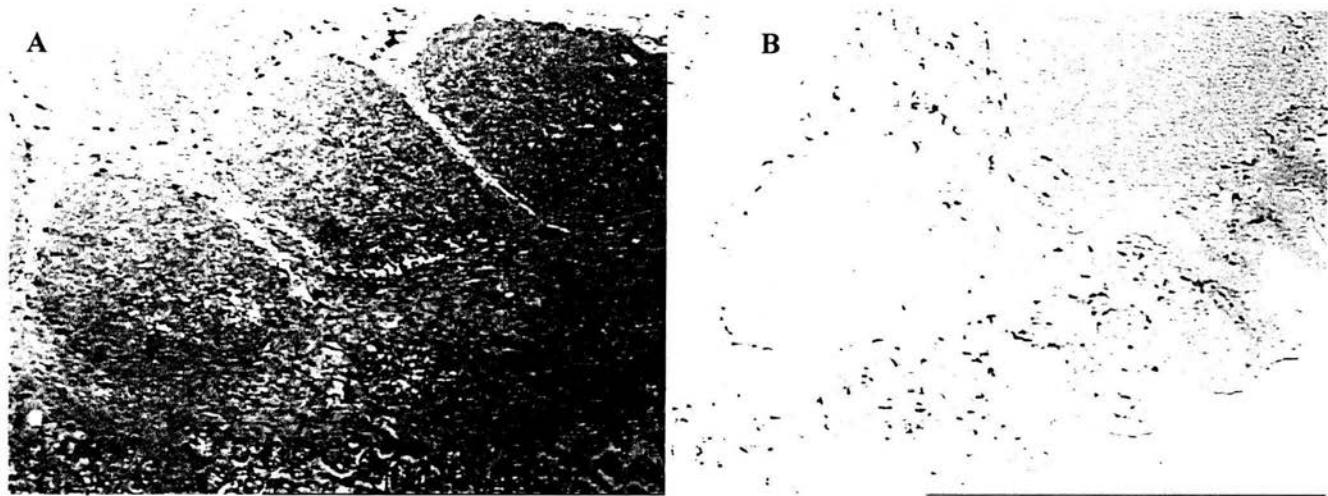


Fig. 13 A) MC en placas de Peyer de ileon (5X) de cerdo control al día 5 postinfección 2. B) Placas de peyer de ileon del cerdo control del día 15 postinfección del experimento 4. En ambas imágenes observamos que las MC solo permanecen en el tejido conectivo que rodea a los folículos linfoides.