



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DEL INFILTRADO CELULAR QUE
RODEA LA CÉLULA NODRIZA DE *Trichinella spiralis*
POR MEDIO DE TINCIONES HISTOLÓGICAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A

MARY CARMEN DEL SOL RAMÍREZ Y RAMÍREZ



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO:

PRESIDENTE:	Profesor:	GUTIÉRREZ RAMOS ABEL
VOCAL:	Profesor:	ORTEGA SOTO ENRIQUE
SECRETARIO:	Profesor:	DE LA ROSA ARANA JORGE LUIS
1 ^{er} SUPLENTE:	Profesor:	CORDERO HERNÁNDEZ JOSÉ
2 ^{do} SUPLENTE	Profesor:	PÉREZ MONTESINOS GIBRAN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

*INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS (InDRE), DE LA SECRETARÍA DE SALUD
LABORATORIO DE HELMINTOS TISULARES.

*ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BOLÓGICAS, INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL (ENC-IPN)
DEPARTAMENTO DE GRADUADOS E INVESTIGACIÓN DE ALIMENTOS.

ASESOR DEL TEMA:

DR. JORGE LUIS DE LA ROSA ARANA

SUPERVISOR TÉCNICO:

DR. FABIÁN GÓMEZ DE ANDA

SUSTENTANTE:

pQFB. MARY CARMEN DEL SOL RAMÍREZ Y RAMÍREZ

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por sobre todas las cosas, por cobijarme con su protección, además de iluminarme con su sabiduría en la toma de decisiones a lo largo de mi vida, no dejándome ni un instante sola, por absolutamente todo lo que me ha dado y me ha permitido vivir y por supuesto porque me ha concedido cumplir esta meta profesional.

A mi padre José Trinidad Ramírez Godínez (qepd), por su ejemplo de lucha, perseverancia y superación constante, por estar siempre que lo necesité, por haber inculcado el amor al saber, conocer, trabajar y crear cosas diferentes día a día. Este logro va dedicado a ti donde tu estas. Gracias por que fuiste, eres y serás un excelente padre.

A mi madre Ma. del Carmen Ramírez Melgar, por tus sabios consejos tanto personales como profesionales, siempre tienes las palabras correctas que me infunden aliento para no rendirme y seguir adelante. Porque siempre me respaldas, por tu apoyo en la realización del trabajo experimental, por ser mi amiga y confidente porque como mama me has dado un excelente ejemplo e imagen.

Gracias a ustedes por hacer de mi una persona de bien, por la confianza que siempre supieron brindarme, por ayudarme a confiar en mi misma y en mis capacidades, por haberme sabido guiar, inculcándome los valores de vida, siempre con especial amor y respeto. En todo momento los llevo en mi corazón.

A mis hermanos Raúl Ramírez, por estar con migo cuando te necesito, por tus consejos, por no dejarme sola en el camino, por compartir juntos momentos difíciles y también alegres, te amo y admiro. A Anyhelo Moreno Castro, por tu ejemplo de constancia y disciplina en todo lo que realizas, te quiero carnalito.

A Luis Alberto Pérez Zavala, porque desde que te cruzaste en mi camino, aumentaste aún más colores en mi vida, me has acompañado y aconsejado para buscar siempre el ser mejor cada día y de no descansar hasta lograr lo que te propones. Por tu ayuda para terminar este proyecto y tus comentarios a este escrito. Te amo

A Jennifer García, Karla Hernández, Laura Becerril y Teresa Carmona, comparto y celebro con ustedes este triunfo ya que también es suyo, por sus valiosas observaciones y aportaciones. Además de que gracias a ustedes mi estancia en la Facultad fue más agradable.

Al Dr. Jorge Luis de la Rosa Arana, por su asesoría y dirección a lo largo de este proyecto. Por aceptarme en su grupo de investigación, por el tiempo dedicado a la realización y estudio de este trabajo, además por su apoyo para su edición. Gracias por compartir tus conocimientos conmigo.

Al Dr. Fabián Gómez de Anda, por darme las herramientas necesarias para llevar a buen puerto ésta labor. Tu ayuda fue fundamental en todo el proceso experimental y teórico. Mi más profundo agradecimiento, por tu apoyo y amistad.

A la Dra. Georgina Calderón Domínguez, por sus contribuciones. Por dedicarme un espacio dentro de su valioso tiempo y por su colaboración para el análisis de los resultados.

Al Departamento de graduados e investigación de alimentos de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (E.N.C.B.-I.P.N.), así como al laboratorio de Helmintos Tisulares y al Bioterio del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), por permitir la realización de este proyecto en sus instalaciones

Un agradecimiento especial a mis compañeras y amigas Seidy Zamora, Tere Corona, Rita Terán, Judith Estévez, Sonia Beltrán, Karen Carrasco y Alejandra Tinoco por sus constantes consejos y palabras de aliento.

A Juan Manuel Campos Cervantes por su apoyo, permitiéndome lograr concluir esta meta.

A Josefina Ramírez, Beatriz Ramírez, Juan Ramírez, Silverio Ramírez e Isabel Ramírez por ser un ejemplo de lucha en mi vida.

A mis amigos de esos años maravillosos; Brenda, Pamela, Stephanie, Laura, Mónica, Cinthya, Julián, Gerardo, Ulises y Rodrigo, por su constante apoyo y momentos inolvidables.

Indudablemente a la Facultad de Química y a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), mi alma mater y máxima casa de estudios, por brindarme la posibilidad de formarme profesionalmente y de la cual es un orgullo ser egresada.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....	I
ABREVIATURAS.....	II
RESUMEN.....	III
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Agente etiológico.....	1
1.2 Morfología.....	3
1.3 Transmisión.....	9
1.4 Epidemiología.....	11
1.5 Sintomatología.....	12
1.6 Diagnóstico.....	13
1.7 Mecanismos de inmunidad involucrados en la infección por <i>T. spiralis</i>	15
1.8 Tratamiento.....	19
1.9 Vacunación.....	20
1.10 Evasión de los mecanismos de la respuesta inmune.....	21
2. JUSTIFICACIÓN.....	22
3. OBJETIVO GENERAL.....	23
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
5. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO.....	24
6. METODOLOGÍA.....	25
7. RESULTADOS.....	38
8. DISCUSIÓN.....	46
9. CONCLUSIONES.....	53
10. BIBLIOGRAFÍA.....	54

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

FIGURA	NOMBRE	PÁGINA
1	Macho adulto de <i>T. spiralis</i>	4
2	Hembra adulto de <i>T. spiralis</i>	5
3	Larva recién nacida de <i>T. spiralis</i>	6
4	Larva muscular de <i>T. spiralis</i>	7
5	Célula nodriza de <i>T. spiralis</i>	8
6	Ciclo biológico de <i>Trichinella spiralis</i>	10
7	Distribución geográfica	11
8	Distribución de triquinelosis en la República Mexicana	12
9	Funciones de las células Th2 durante la infección helmíntica	15
10	Respuesta inflamatoria del hospedador a la invasión del músculo esquelético	18
11	Eosinófilos que rodean el complejo CN - LM	19
12	Pasos para la obtención de un preparado histológico con la técnica de impregnación en parafina	27
13	Crecimiento longitudinal de la LM en diafragma	39
14	Crecimiento de la LM en diafragma	40
15	Crecimiento de la célula nodriza	41
16	Eje mayor de la célula nodriza	42
17	Eje menor de la célula nodriza	42
18	Crecimiento de la cápsula de colágeno e incremento del infiltrado alrededor de la célula nodriza	43
19	Eosinófilos asociados al infiltrado celular alrededor de la célula nodriza	44
20	Eosinófilos que conforman el infiltrado celular que rodea la célula nodriza	45

CUADRO	NOMBRE	PÁGINA
1	Especie y genotipos de <i>Trichinella</i> , distribución y animales que afectan	1

ABREVIATURAS

ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
CN	Célula nodriza
DPI	Días post infección
GA	Gusano Adulto
HCl	Ácido clorhídrico
H-E	Hematoxilina – eosina
IL	Interleucina
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
LM	Larva muscular
LRN	Larva recién nacida
PBM	Proteína básica mayor
ME	Músculo esquelético
PES	Producto de excreción secreción
<i>T. spiralis</i>	<i>Trichinella spiralis</i>

RESUMEN

La triquinelosis es una enfermedad mundial zoonótica causada por la larva muscular (LM) de cualquiera de los 11 grupos genéticos del género *Trichinella*, parásito intracelular que infecta el músculo esquelético de prácticamente todos los mamíferos y lleva a cabo todos sus estados de desarrollo en un solo hospedador. El ciclo de vida del nematodo es directo, presenta dos fases; una entérica, donde pasa por cuatro estados larvarios así como por el adulto y, una fase parenteral, que incluye la migración de la larva recién nacida (LRN) por el sistema circulatorio y el establecimiento de la LM en el músculo esquelético, que se transforma en una estructura denominada célula nodriza (CN) y que se rodea de un infiltrado celular. La especie que se ha descrito en México es *T. spiralis*.

En el presente trabajo se recuperaron por digestión artificial LM de *T. spiralis* (cepa: MSUS/MEX/91/CM-91) de una rata previamente infectada, y se inocularon experimentalmente a 27 ratones hembra CD1 de seis semanas de nacidas por vía oral con aproximadamente 50 larvas viables. A partir del día 13 PI, se sacrificó por día un ratón, y se obtuvo de cada uno la lengua y el diafragma. Los 27 diafragmas rotulados se tiñeron con Giemsa, donde a partir del día 16 PI se comenzó a distinguir las LM, aunque no claramente la cápsula, y conforme pasaron los DPI la larva se fue enrollando como se demuestra en imágenes de este trabajo. En cuanto a las lenguas, después de rotularlas e incluir cada una en un cubo diferente de parafina, se hicieron cortes histológicos; una cinética fue teñida con H-E y se observó la aparición de la capsula a partir del día 16 PI, así como del infiltrado celular a su alrededor. La otra cinética fue teñida con eritrosina B, de igual forma a partir del día 16 PI se hicieron presentes los eosinófilos (color rojo brillante). Los resultados de este estudio demuestran que el infiltrado celular y desarrollo del complejo CN-LM son eventos simultáneos, lo cual es evidente a partir del día 16 PI. En cuanto a los eosinófilos se observó un comportamiento multimodal, donde predomina un bimodal que alcanzó puntos máximos los días 21 y 27. Futuras investigaciones deben encausarse a utilizar la tinción tricrómica de Masson, para identificar la cinética de aparición de colágeno (CN) en ratones BALB/c (modelo singénico), así como incrementar los días de estudio con un mayor número de ratones.



1. INTRODUCCIÓN

Muchas de las enfermedades que afectan al ser humano, como la triquinelosis, son causadas por parásitos patógenos presentes en los animales o en los productos derivados de ellos (Meslin *et al.*, 2000).

1.1. Agente Etiológico

Hoy en día se identifican once genotipos del género *Trichinella* (cuadro 1), formados por cinco especies encapsuladas (que viven dentro de la célula nodriza) que infectan sólo a mamíferos (*T. spiralis*, *T. nativa*, *T. nelsoni*, *T. britovi* y *T. murelli*) y tres no encapsuladas que infectan a mamíferos y aves (*T. pseudospiralis*) o mamíferos y reptiles (*T. papuae*, *T. zimbabwensis*). Además de otros tres genotipos cuya posición taxonómica es aún incierta (T6, T8, T9) (Pozio *et al.*, 1992).

Cuadro 1. Especies y genotipos de *Trichinella*, distribución y animales que afectan.

Especies	Formación de célula nodriza en músculo	Distribución	Hospedador
<i>T. spiralis</i>	Si	Regiones templadas y tropicales, cosmopolita	Carnívoros silvestres, caballo, cerdo, rata, omnívoros,
<i>T. nativa</i>	Si	Región nórdica, Norteamérica, Norte de Europa y Asia	Carnívoros silvestres
<i>T. britovi</i>	Si	Zonas templadas de Asia y Europa	Carnívoros silvestres, cerdo, rata, caballo
<i>T. nelsoni</i>	Si	Zona ecuatorial de África	Carnívoros
<i>T. murelli</i>	Si	Norteamérica	Carnívoros silvestres, caballo
<i>T. pseudospiralis</i>	No	Europa, Australia, Norteamérica y Asia	Mamíferos y aves
<i>T. papuae</i>	No	Nueva Guinea	Cerdos
<i>T. zimbabwensis</i>	No	África	Reptiles , mamíferos
Genotipos			
T6	Si	Sur de Canadá, Norteamérica	Carnívoros
T8	Si	África subtropical	Carnívoros
T9	Si	Japón	Carnívoros

Fuente: Pozio y Murrell, 2006.



En la transmisión de la triquinelosis, el cerdo es considerado a nivel mundial, la principal fuente de infección para humanos (Liciardi *et al.*, 2009). La crianza de cerdos en traspatios, así como la falta de control sanitario adecuado, ha permitido que en los últimos años el consumo de carne de cerdo cruda, insuficientemente cocida o productos elaborados con animales infectados, sea considerada la fuente más importante de transmisión de esta enfermedad en humanos, aunque se tienen referentes de triquinelosis humana ocasionada por el consumo de carne de caballo, oso y animales domésticos o salvajes en los cuales se encuentran encapsuladas larvas de *Trichinella*. Este fenómeno puede estar relacionado con el hecho de que el consumo de ésta carne es accesible para la población de bajos recursos que difícilmente puede consumir carne de otras especies (Jiménez *et al.*, 2005). La triquinelosis se cataloga como una enfermedad de tipo zoonótica, es decir que se trasmite naturalmente entre personas y animales vertebrados (OMS, 2006; Owen, 1835). Las enfermedades zoonóticas tienen diversos mecanismos de transmisión, que pueden ser indirectos, es decir, a través de alimentos, el agua y el medio ambiente, o directos, como la triquinelosis. (OMS, 2006; Dupouy, 2000).

Las LM ingeridas migran al intestino delgado donde se convierten en gusanos adultos (GA), luego de la fecundación la hembra larvipone a las LRN, que migran por el torrente sanguíneo y se encapsulan en el músculo esquelético. La enfermedad clínica en el hombre es altamente variable y puede presentarse desde una infección asintomática hasta una enfermedad letal (Burke *et al.*, 2008; Benenson, 1990).

La triquinelosis es considerada un problema importante en la economía de los países, ya que es un factor de riesgo en la inocuidad de los alimentos (Yang *et al.*, 2010). *Trichinella* es responsable de numerosos brotes humanos en varias partes del mundo, actualmente, existen alrededor de 11 millones de personas infectadas y aún en años recientes, la mayor parte de las infecciones se relacionaron con la especie *T. spiralis*, ya sea ocurridas en animales o humanos, donde puede sobrevivir más de 30 años como larva encapsulada (Yang *et al.*, 2010, Krauss *et al.*, 2003).



Se han registrado brotes humanos en Europa, Asia, África y América (William *et al.*, 2001). En América, los países donde se presenta con mayor frecuencia esta enfermedad son Argentina, México, Uruguay, Chile y Bolivia (Monroy *et al.*, 2000).

Este padecimiento ha sido estudiado en nuestro país desde finales del siglo XIX, y no fue hasta 1891 que se diagnosticó el parásito en cadáveres humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (Zavala *et al.*, 2004). Los estados de la República Mexicana se han clasificado por su prevalencia como alta (Durango, Zona Metropolitana del Valle de México y Zacatecas), mediana (Chihuahua, Jalisco y Michoacán) y baja (Aguascalientes, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Nuevo León, Querétaro, Sonora y Veracruz) (Ortega Pierres *et al.*, 1996). Últimamente se demostró la presencia de *T. spiralis* en derivados porcinos como chuletas crudas y chorizos en Aguascalientes, Michoacán, Estado de México, e Hidalgo (Zavala *et al.*, 2004).

En los últimos veinte años se han realizado esfuerzos para controlar la prevalencia de las enfermedades parasitarias con medidas tradicionales, como campañas higiénicas, sanitarias, tratamientos masivos, investigaciones y diagnósticos. (OMS, Ginebra 2007).

1.2. Morfología

Los helmintos del género *Trichinella* presentan tres estados de desarrollo: gusano adulto (hembra y macho), larva recién nacida y larva muscular.

1.2.1. Gusanos Adultos (GA)

1.2.1.1. Machos

Los gusanos machos miden 1500 μm de longitud por 36 μm de diámetro, la extremidad anterior es más delgada que la posterior (figura 1). Se diferencia de la



hembra por tener en la parte posterior dos pares de papilas genitales y un testículo que produce espermatozoides no flagelados con 2 a 3 cromosomas, por lo que ese determina el sexo de la descendencia. Las células somáticas presentan 5 cromosomas (Despommier *et al.*, 2005; Ribicich *et al.*, 2005; de la Rosa y Gómez, 2004).

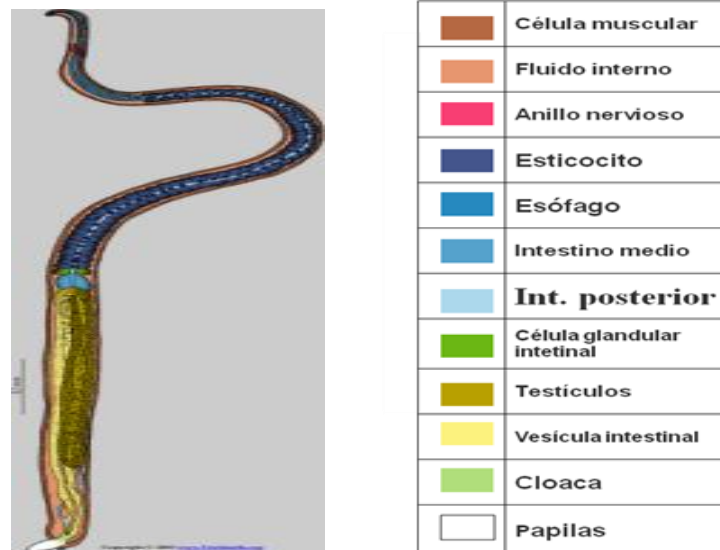


Figura 1. Macho adulto de *T. spiralis*. El gusano adulto maduro se caracteriza por tener dos pares de papilas genitales, las cuales se observan de color blanco en la parte inferior de la figura. Fuente: www.trichinella.org/biology.htm.

1.2.1.2. Hembras

Los helmintos hembras miden 3000 μm de longitud por 36 μm de diámetro. El gusano posee un solo ovario localizado en la parte posterior (figura 2) y produce óvulos de aproximadamente 25 μm de diámetro, los cuales presentan sólo 3 cromosomas. Las células somáticas de la hembra presentan 6 cromosomas. Las hembras no ponen huevos, cada hembra larvipone de 60 a 80 larvas recién nacidas (LRN), por cada 2 hembras hay un macho (Despommier *et al.*, 2005; Ribicich *et al.*, 2005, de la Rosa y Gómez, 2004).



Figura 2. Hembra adulto. El gusano hembra puede diferenciarse del macho por tener el extremo posterior romo y redondeado. En la porción ventral, la vagina se extiende en la parte posterior hasta el útero, donde se observa que contiene en su porción anterior larvas y huevos; en la región posterior, detrás del útero y cerca de la abertura anal, se encuentra el ovario. Fuente: www.trichinella.org/biology.htm.

1.2.1.3. Larvas recién nacidas (LRN)

Las LRN miden 80 μm de longitud por 7 μm de diámetro, presentan un conjunto de células germinales, pero no órganos (Lloyd, 2000; de la Rosa y Gómez, 2004). En esta fase de desarrollo migran a través de los capilares linfáticos y venosos para llegar a circulación sistémica, aquí son diseminados por todo el organismo, para establecerse en la célula del músculo esquelético, aún no se encuentra formado el esticosoma, ni se observa la presencia de órganos, sino un conjunto de células germinales (figura 3) (Capó y Despommier, 1996). Es la única fase de desarrollo del parásito que posee estiletes en la cavidad oral, en la parte anterior del esófago, lo que les permite crear aberturas de entrada en las células musculares del hospedador cuando son diseminadas sistemáticamente a tejidos y órganos durante la migración, periodo que continua hasta aproximadamente el día 20 posterior a la infección (Despommier *et al.*, 2005). No se descarta que las LRN además de estilete posean enzimas proteolíticas que ayudan a penetrar al miocito. En modelo murino se ha reportado que en promedio la hembra libera de 60 a 80 LRN en toda su vida (Moreno *et al.*, 2003).



Figura 3. Larva recién nacida de *T. spiralis*. Se observa que aún no se encuentra formado el esticosoma, ni hay presencia de órganos, sino un conjunto de células germinales. Fotografía a 100x con H-E, tomada en el laboratorio de helmintos tisulares (InDRE). Carmen Ramírez Melgar 2005. La barra mide 20 μ m.

1.2.1.4. Larvas musculares (LM)

La LM es la fase de desarrollo responsable de la transmisión de la enfermedad. Se le denomina larva muscular porque se establece en el músculo esquelético del hospedador. Anteriormente se le conocía como L1 o larva infectiva. Una vez que el hospedador potencial ingiere carne cruda o insuficientemente cocida con LM, ésta se establece en el epitelio intestinal hasta madurar a gusanos adultos, lo que les toma aproximadamente 30 horas. La LM mide 1200 μ m de longitud por 40 μ m de diámetro (de la Rosa y Gómez, 2004; Despommier *et al.*, 2005).

Anatómicamente, las LM presentan cutícula, anillo nervioso, intestino, primordio genital y esófago, que está rodeado por una estructura glandular en su extremo posterior, llamada esticosoma (figura 4). Los esticocitos son células discoideas que tienen 5 tipos de gránulos citoplásmicos y presentan al menos 5 subtipos de gránulos que se diferencian en forma y tamaño, tipo de inclusión, antigenicidad y localización dentro del esticosoma, estos gránulos son; α 0, α 1, α 2, β y γ . Los alfa esticocitos secretan polipéptidos mayores de 50 a 55 kDa y los beta un polipéptido de 48 kDa, éstas moléculas son altamente inmunogénicas, reconocidas por una gran variedad de hospedadores (Despommier y Lacceti, 1981; Mc Vay *et al.*, 1998).

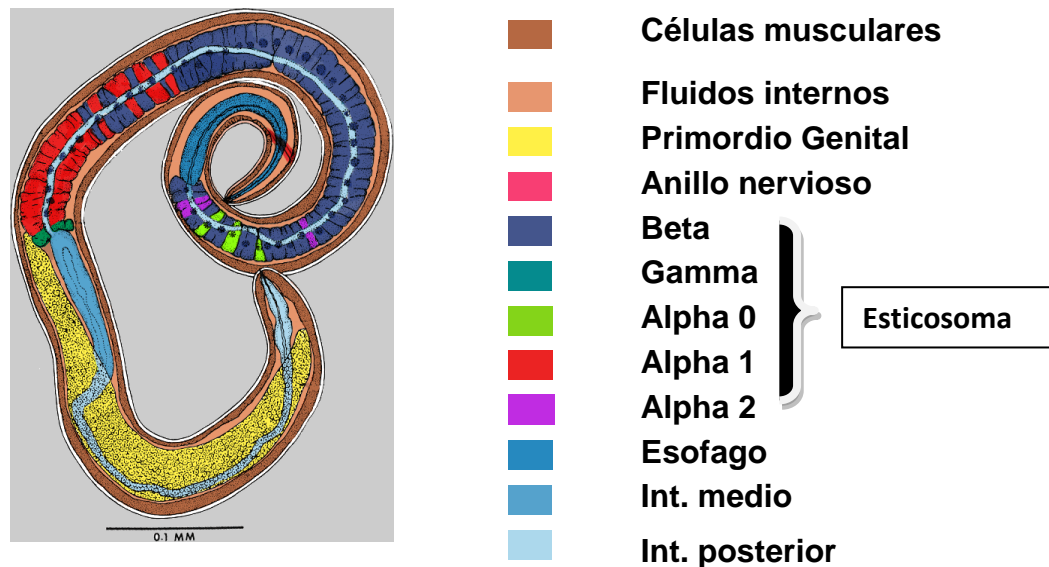


Figura 4. Larva muscular de *T. spiralis*. Presenta cutícula, anillo nervioso, intestino, primordio genital y esófago, que está rodeado por una estructura glandular en su extremo posterior llamada esticosoma, la cual, está formado por un cordón compacto de células dispuestas linealmente llamadas esticocitos (45 a 55 esticocitos), que ocupan la mitad de la región anterior de la larva y liberan los componentes de excreción/secreción del parásito, involucrados en la formación de la célula nodriza. Fuente: www.trichinella.org/biology.htm.

Dentro de los gránulos de los esticocitos, están contenidos antígenos que reaccionan con el suero del hospedador; cuando estos se degranulan, el contenido de sus gránulos es liberado hacia el lumen del tracto intestinal del parásito y son excretados. Estos productos son referidos como productos de secreción y excreción (PES) (Despommier y Muller, 1976).

1.2.1.4.1. Productos de excreción y secreción (PES)

Trichinella, como cualquier otro nematodo de la clase Trichiurata, posee un órgano excretor denominado esticosoma donde las células o esticocitos, se distinguen en cinco tipos diferentes de acuerdo a su morfología ultra estructural (Despommier, 2005). Las glicoproteínas con un peso molecular de 50-55k Da son secretadas por los alfa esticocitos, mientras que los esticocitos de 48 kDa son secretados por las células beta (Silberstein y Despommier, 1984). Los diferentes tipos de antígenos de la familia TSL, TSL-1 (45-100 kDa), TSL2 (45 kDa), TSL3 (45 kDa) y TSL-5 (35 kDa), se encuentran presentes en los PES de la LM (Ortega *et al.*, 1996). Muchas de estas



proteínas están glicosiladas con la beta tivelosa, la cual se presenta de manera única en el género *Trichinella*. Los PES también son producidos por los gusanos adultos (Despommier, 2005) pero no por la LRN por no poseer esticosoma (Gold *et al.*, 1990).

1.2.1.5. Célula nodriza (CN)

La CN es el resultado de las modificaciones por las que pasó el miocito infectado. Existen varias teorías de como sucede esto, pero la más aceptada es que los antígenos de excreción y secreción de la LM se asocian al genoma del miocito y promueve la hipertrofia del glicocalix para convertirlo en colágeno IV y VI, lo que promueve la angiogénesis (Despommier, 1998). La CN mide entre 300 y 400 μm de largo por 150 a 200 μm de ancho (figura 5), en el interior de estas células, el parásito no permanece inmóvil, sino que realiza movimientos lentos anteroposteriores y su extremidad anterior oscila constantemente como explorando el microambiente que lo rodea (Ribicich *et al.*, 2005; Despommier *et al.*, 2005). Normalmente se encuentra una LM dentro de una célula nodriza, aunque en infecciones masivas se han observado más de una LM en cada CN (Despommier, 1998; Ramírez *et al.*, 2007).

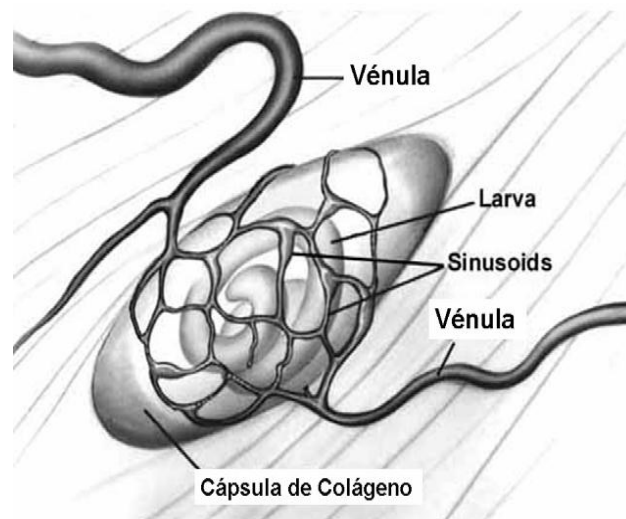


Figura 5. Célula nodriza de *T. spiralis*. Estructura que se encuentra rodeada de un plexo de vénulas formado por una acción génica provocada por el parásito; estas vénulas tienen la finalidad de eliminar los desechos metabólicos, así como de proveer nutrientes. Se ha argumentado que la célula nodriza protege al helminto del ataque del sistema inmune del hospedador y le confiere resistencia al congelamiento Fuente: www.trichinella.org/biology.htm



1.3. Transmisión

En ésta parasitosis existen tres ciclos de transmisión: el ciclo doméstico, el ciclo silvestre y el ciclo sinantrópico. El ciclo doméstico se relaciona fundamentalmente con las condiciones de los animales mamíferos criados para consumo humano, cuando éste es manejado en malas condiciones higiénicas o simplemente cuando debe buscar su propia fuente de alimentación en sitios inadecuados como tiraderos, adquiriendo así la infección, principalmente por la ingestión de ratas infectadas, las cuales, debido a sus hábitos de canibalismo, mantienen y propagan la infección. De igual forma, pueden infectarse con carnes de otros animales muertos que encuentran en los criaderos (Pozio, 2000). Los principales reservorios domésticos de *T. spiralis* son las ratas, los cerdos y el hombre. La infección en el ciclo silvestre sucede entre carnívoros que se alimentan de presas vivas o de cadáveres de animales, cuyas carnes están infectadas con larvas de *Trichinella*. En este ciclo, el hombre aparece involucrado como un hospedador accidental (Martínez, 1998; Ortega *et al.*, 2000). Entre los ciclos doméstico y silvestre, se encuentra el ciclo sinantrópico, en el que intervienen animales como las ratas que actúan como transmisor de los distintos genotipos de *Trichinella* involucrados en cualquiera de los ciclos mencionados (Martínez, 1998).

1.3.1. Ingestión y desarrollo del parásito en el humano

Se estima que la ingesta de 70 larvas viables produce la enfermedad clínica humana (Martínez *et al.*, 1986). Investigaciones realizadas por Bruschi y Murrell (2002) señalan que el inicio de la infección en el ser humano ocurre cuando se ingieren productos cárnicos de animales domésticos o salvajes en los cuales se encuentran enquistadas larvas de *Trichinella*; éstas son liberadas en el estómago por acción de las enzimas digestivas y son transportadas pasivamente por los movimientos peristálticos a las dos terceras partes del intestino delgado alcanzando la madurez entre los 2 y 6 días, posteriormente se lleva a cabo la cópula. Los machos adultos copulan aproximadamente a las 48 hrs y se lleva a cabo en la mucosa del duodeno-



yeyuno, y son expulsados del intestino delgado. Los gusanos adultos hembras liberan de 60 a 80 LRN, muchas de las cuales se depositan en forma directa en los vasos quilíferos y linfáticos, para ser transportadas por el torrente sanguíneo hasta alcanzar el conducto torácico; llegan a la vena cava, corazón, pulmón y regresan al corazón en aproximadamente 3 a 5 días DPI. Se distribuyen en todo el organismo a través de la circulación sistémica, solamente invaden la musculatura estriada donde se transforma a LM e induce la formación de la célula nodriza alrededor de la quinta semana (figura 6) (Quiroz, 1999).

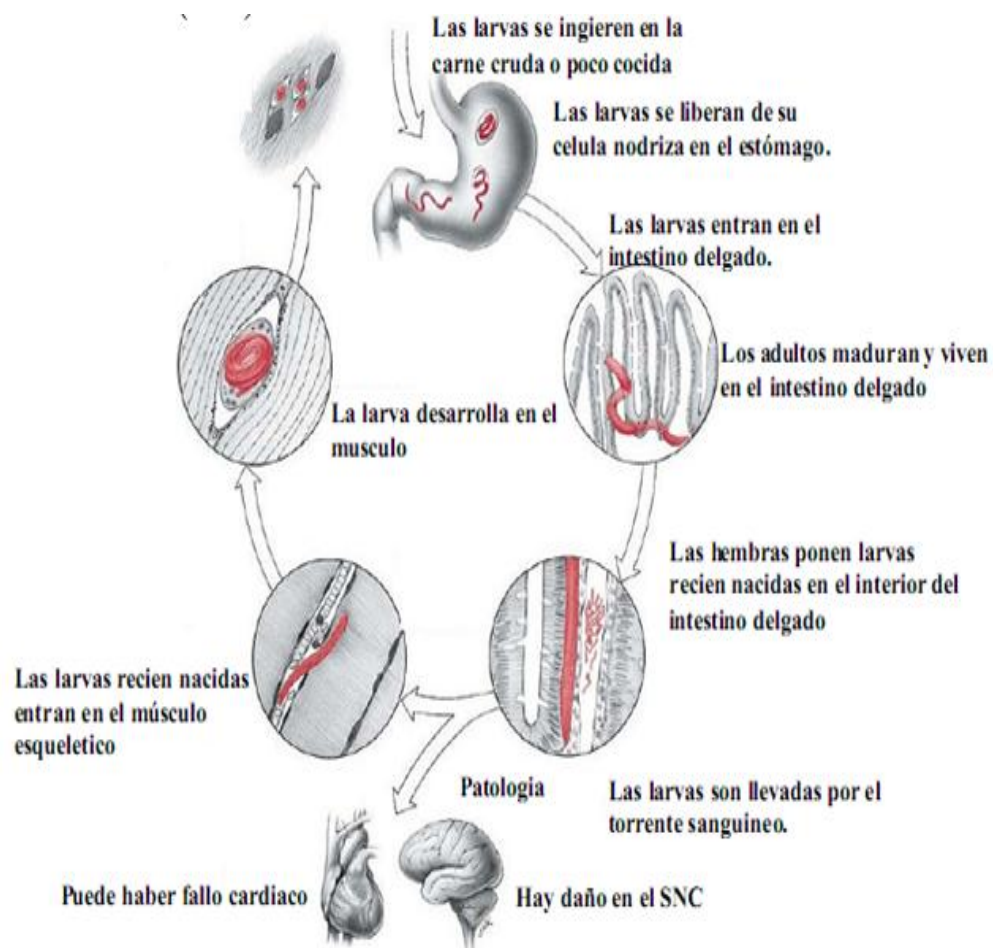


Figura 6. Ciclo biológico de *Trichinella spiralis*. Durante la fase enteral, el tejido muscular es digerido en el estómago y las LM son liberadas; las LM penetran en la mucosa intestinal del intestino delgado y llegan a la fase adulta en las 48 horas PI, dando lugar a machos y hembras; a partir del quinto día PI y hasta la segunda semana PI, las hembras liberan LRN en los vasos linfáticos. En la fase parenteral, las LRN llegan al músculo estriado y penetran activamente en la célula muscular, la larva crece hasta desarrollarse como LM, originando de esta manera la fase infectiva y, después de un período de tiempo (semanas, meses, o años), un proceso de calcificación. Fuente: www.trichinella.org/biology.htm



1.4. Epidemiología

El género *Trichinella* es responsable de numerosos brotes de triquinelosis humana en varias partes del mundo y es considerada un problema de salud pública por ser una zoonosis, por lo que es competencia de los servicios de salud de cada nación o país. En México se encuentra la NOM-017-SSA2-1994 que se encarga de recolectar información sobre los eventos de interés médico epidemiológico, así como de prevenir y controlar dichos eventos, ésta norma establece los padecimientos y riesgos que están sujetos a notificación e investigación, así como la frecuencia con que éstas deben realizarse, de acuerdo con su trascendencia e impacto en la salud de la población (NOM-194-SSA1-2004).

Se han registrado brotes humanos en Europa, Asia, África y América (figura 7) (William *et al.*, 2001) ocasionados por nuevas fuentes de infección de *Trichinella* como carne de caballo, rata de campo, perro y gato, así como por el consumo de carne de animales de caza deportiva infectados, como jabalís, zorros, ciervos y osos, permitiendo la coexistencia del ciclo de vida silvestre y doméstico del parásito, (Dupouy, 2000; Garate *et al.*, 1991).

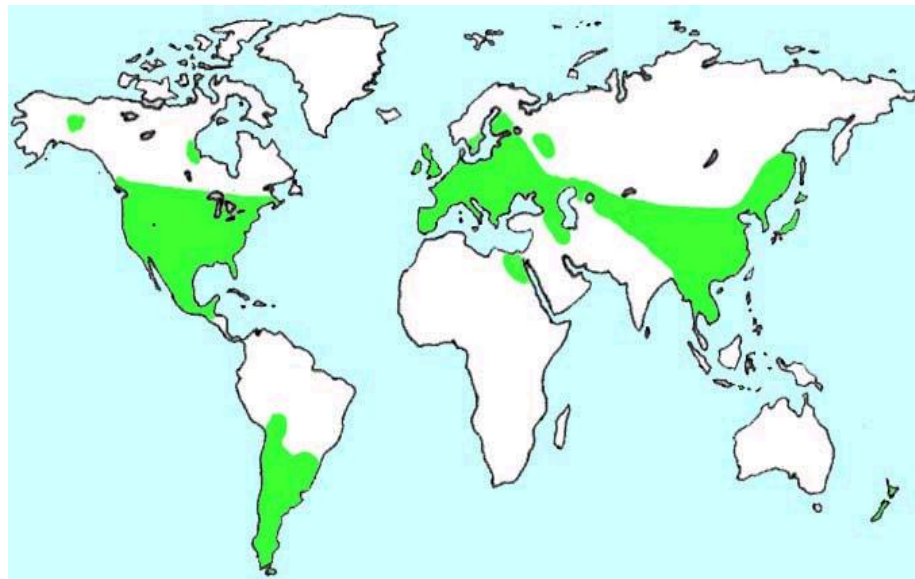


Figura 7. Distribución geográfica. Reportes de casos de *Trichinella spiralis*.
Fuente: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr19/es/index.html>



En América, los países donde se presenta con mayor frecuencia esta enfermedad son Argentina, México, Uruguay, Chile y Bolivia (Monrroy *et al.*, 2000). En México, las infecciones con *Trichinella* en humanos, cerdos, ratas, gatos y perros han sido reportadas en varios estados de la República Mexicana (figura 8).



Figura 8. Distribución de la triquinelosis en la República Mexicana. Alta prevalencia (rojo): Durango, Zacatecas y la Zona Metropolitana del Valle de México; mediana prevalencia (amarillo): Chihuahua, Jalisco y Michoacán; baja prevalencia (verde): Aguascalientes, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Nuevo León, Querétaro, Sonora y Veracruz. En azul los Estados donde se han encontrado animales infectados, alimentos infestados y estudios epidemiológicos para búsqueda de anticuerpos. En blanco donde no se ha hecho estudios. Adaptado de Ortega *et al.*, 2000.

1.5. Sintomatología

La variabilidad de signos y síntomas en la triquinelosis humana depende de la carga parasitaria con la cual se infecta el hospedador (la dosis mínima necesaria para causar triquinelosis sintomática se estima que se encuentra en el rango que va de 70 a 150 larvas), así como de su edad y sexo, estado nutricional, hormonal e inmunológico y del tejido invadido (Bruschi y Murrell, 2002).



La duración del período de incubación de la infección depende de muchas variables que incluyen la especie, la dosis y la frecuencia de consumo de carnes infectadas con LM de *Trichinella*. Este período es de aproximadamente 7 días para infecciones severas y de 16 días en infecciones de moderada intensidad. En formas benignas de 21 días. La ingestión de altas dosis de larvas se relaciona generalmente con un período de incubación corto. Alrededor de los días 7 al 14 ocurre la expulsión del parásito adulto. En el curso del período de incubación los signos y síntomas típicos de la enfermedad son precedidos por heces semilíquidas durante 4 a 5 días (Kociecka, 2000).

Las manifestaciones clínicas de la fase enteral responden a un cuadro gastroentérico caracterizado por náuseas y diarrea. En pacientes con infección moderada a severa, la infección durante la primera semana se asocia con dolores abdominales, diarreas o constipación, vómito, malestares y fiebre. La fase parenteral se relacionan con fiebre, dolor de cabeza, eosinofilia, erupción cutánea, dolor muscular intenso, además de edema periorbital y palpebral (Luna y Sánchez, 2006).

1.6. Diagnóstico

Los criterios para confirmar la sospecha clínica de la triquinelosis incluyen evaluaciones de signos y síntomas asociados al caso clínico, además se valora si la persona consumió carne, número de casos presentados en el foco de infección y pruebas de laboratorio (Gamble y Graham, 1984).

En una triquinelosis es típico que se presente eosinofilia ($1,400-8,700/ \text{mm}^3$), que es la principal y más temprana característica de laboratorio encontrada y que se correlaciona con la intensidad de la infección. Comúnmente en el suero de las personas infectadas se encuentran niveles altos de enzimas musculares (creatina fosfoquinasa [CPK], lactato deshidrogenasa [LDH] y aminotransferasas), liberadas en el momento que ocurre la destrucción del tejido muscular, causado por la penetración de las LRN (Capó *et al.*, 1998).



El diagnóstico de la infección se basa en la detección directa o indirecta del parásito en el hospedador.

1.6.1. Técnicas directas

La triquinoscopía detecta las larvas de *T. spiralis* y define la intensidad de la infección (número de larvas por gramo de tejido examinado). Para realizarla, pequeñas muestras de músculo son comprimidas entre dos laminillas de vidrio y observadas bajo un microscopio de luz (Camet *et al.*, 2002).

Las técnicas histológicas muestran fragmentos de la larva en los diferentes estados del desarrollo, la presencia de la capsula de colágeno, célula muscular infectada y el infiltrado celular. La digestión artificial de las muestras de músculo con pepsina y HCl son muy útiles para determinar la carga parasitaria y aislar las larvas para su identificación (de la Rosa, 2000).

La aplicación de la técnica de Giemsa para teñir los diafragmas infectados con *Trichinella spiralis*, permite que puedan ser fácilmente observadas las LM a simple vista como puntos de color azul, que contrasta con las áreas de color rosa que las rodea, es decir, fibras musculares no infectadas; esta técnica es útil para un diagnóstico rápido de triquinelosis post mortem en mamíferos (Ramírez *et al.*, 2007).

1.6.2. Técnicas indirectas

Para el diagnóstico serológico pueden utilizarse técnicas para la detección de anticuerpos (Ac) específicos de *T. spiralis* como son ELISA, Western blot y la inmunofluorescencia indirecta (Camet *et al.*, 2002; Figueroa *et al.*, 2000). Western blot ha demostrado recientemente mayor sensibilidad y especificidad que la técnica ELISA para el diagnóstico en sueros de origen porcino (Nöckler *et al.*, 2009).



1.7. Mecanismos de inmunidad involucrados en la infección por *T. spiralis*

En la triquinelosis, al igual que en otros modelos de helmintos, los parásitos inducen una respuesta tipo Th2 durante las primeras horas de la respuesta inmune humoral (figura 9), habiendo un incremento en las inmunoglobulinas séricas (hipergamaglobulemia), particularmente de IgE e IgG1 (Ljungstrom *et al.*, 1988).

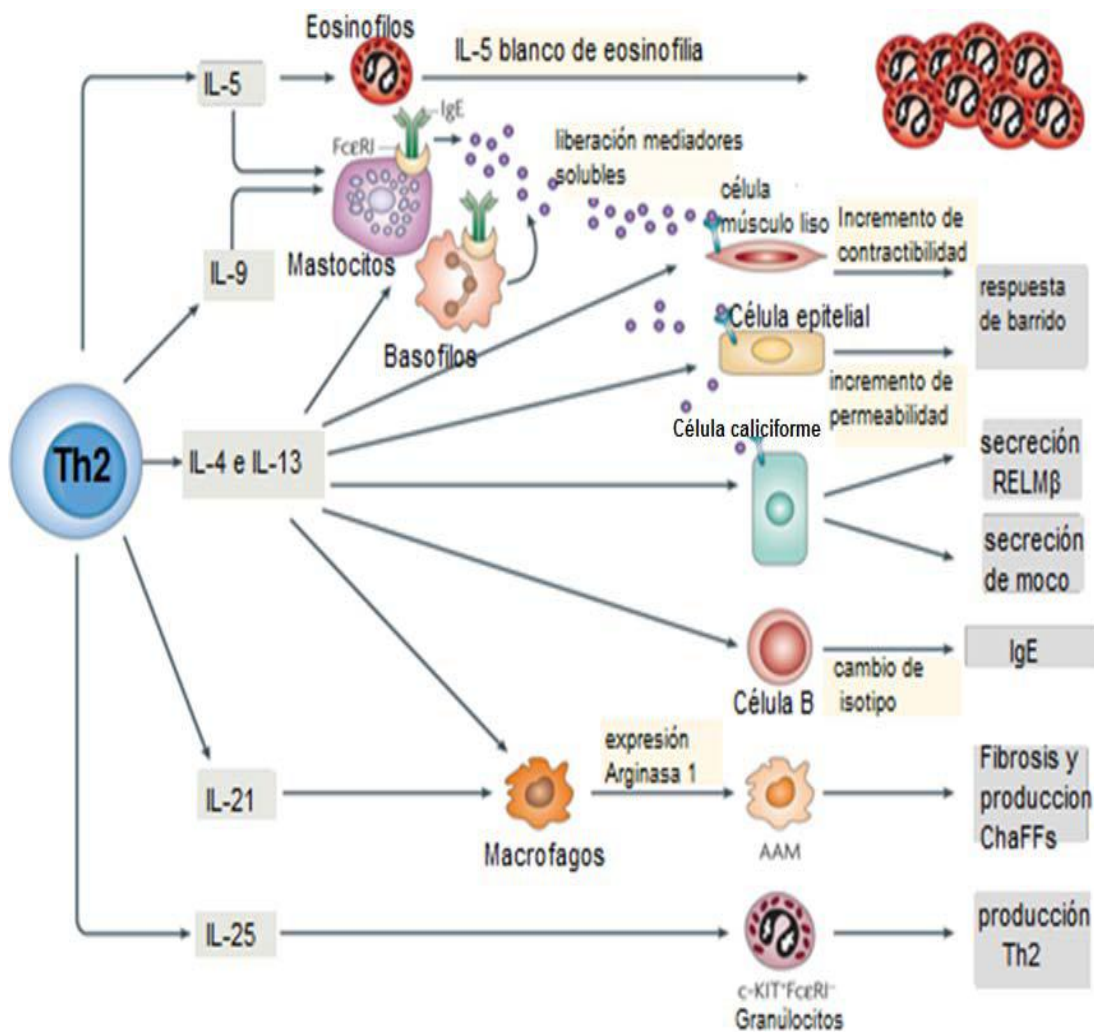


Figura 9. Funciones de las células Th2 durante la infección helmíntica. En la respuesta inmune desarrollada durante la infección con muchos parásitos nematodos que habitan el tracto intestinal se caracteriza por un incremento de las citocinas producidas por células Th2, incluyendo interleucinas (IL); IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, y más tarde IL-21, IL-31, IL-33 e IL-25, las cuales potencian el desarrollo de respuestas Th2. Asimismo, hay activación de linfocitos CD4+, granulocitos, mastocitos y macrófagos (Patel *et al.*, 2009).



1.7.1. Respuesta inmune a nivel intestinal

Los macrófagos reconocen el antígeno del gusano adulto, pero son incapaces de migrar hacia el sitio de estimulación antigénica (probablemente por la presencia de factores inhibidores de macrófagos), lo cual hace que se genere una respuesta celular de tipo TH2, lo que activa de manera alterna a los macrófagos; ésta respuesta se caracteriza por la producción de IL – 5 que activa a los eosinófilos causando eosinofilia; a su vez IL – 5 asociada a IL – 9 e IgE hacen que los mastocitos y granulocitos liberen gránulos ocasionando una respuesta alérgica. Por otro lado, IL–4 e IL – 13 activan a células B para la producción de IgE, también activan células caliciformes generando secreción de moco promoviendo la inmovilización del parásito y así facilitando su expulsión. La finalidad de la inmunidad a nivel intestinal es crear un medio ambiente poco propicio para los parásitos adultos en el tracto intestinal y así lograr su eliminación (Afzali *et al.*, 2009).

Recientemente se ha sugerido la participación de la respuesta Th17, la cual es estimulada por IL-23 y TGF β para generar IL-17, misma que es un mediador pro-inflamatorio y juega un papel importante en el mantenimiento de la inflamación intestinal crónica. A su vez, recientemente se mostró en un modelo experimental de triquinosis murina que esta citocina (IL-17) produjo un aumento significativo en la contractibilidad del yeyuno, el cual fue dependiente de la concentración de IL-17. Lo anterior sugiere que la IL-17 puede participar en la expulsión de los parásitos en intestino (Fu *et al.*, 2009).

Por otro lado se ha sugerido la participación de las células T reguladoras naturales (nTreg) en el control de la inflamación a través de mecanismos que requieren IL-10 y TGF- β . A su vez, las T reguladoras equilibran las respuestas Th1/Th2 (Beiting *et al.*, 2007; Afzali *et al.*, 2009; Bi Y *et al.*, 2010).



1.7.2. Respuesta inmune a nivel muscular

Las quimiocinas son también importantes en el curso de la infección por *T. spiralis*, particularmente la quimiocina CCL11 (Exotaxina 1), que es un potente quimioatrayente para los eosinófilos (los cuales actúan a través del receptor CCR3). CCL11 actúa en sinergismo con IL-5 para estimular la liberación de eosinófilos. La deficiencia de CCL11 resulta en un número disminuido de eosinófilos en estómago, yeyuno, íleon y colon (Dixon *et al.*, 2006).

La IL - 4 es una citocina antiinflamatoria y profibrótica del tipo Th2 que estimula y amplifica la respuesta antiinflamatoria mediante la activación de la síntesis de colágeno tipo 1 y 3 por los fibroblastos y la progresión de la fibrosis. En particular la IL - 13 e IL - 4 comparten la habilidad de inhibir a los macrófagos y producir citocinas proinflamatorias; al igual que la IL - 13 e IL - 4, la IL - 21, favorece la activación alterna de macrófagos, aumentando la expresión de arginasa - 1, protegiendo a los tejidos circundantes de procesos inflamatorios prolongados, así como también de respuestas inmunes agresivas induciendo la reparación o remodelación del tejido, en apoyo a esto la IL - 25 induce la producción de citocinas de tipo Th2 (Patel *et al.*, 2009) .

En el caso de *T. spiralis*, las células TCD4+ regulan los niveles de IL-10 y TGF- β , que normalmente controlan el nivel de inflamación circulante causada por el parásito encapsulado en músculo (Beiting *et al.*, 2007).

1.7.3. Caracterización del infiltrado celular

En las primeras semanas de la infección, los gusanos pueden ser expulsados, lo que ha generado información valiosa y conocimientos básicos sobre los mecanismos de la inmunidad del hospedador contra los patógenos intestinales.



Las larvas musculares de *Trichinella spiralis*, después de entrar en el tejido muscular, inducen a una respuesta inflamatoria que es responsable de la miositis, una de las consecuencias típicas de la infección por vía parenteral (figura 10). El daño a los tejidos se debe no sólo a los parásitos al provocar cambios en las células musculares incluyendo la pérdida de su estriación y la transformación de la CN, sino también indirectamente, a la presencia de dicha reacción inflamatoria ya que daña las células musculares, además de depender de la carga parasitaria (Beiting *et al.*, 2007).

El tipo de células presentes en el infiltrado circundante a la CN se compone principalmente de varias células efectoras, entre ellas eosinófilos, basófilos, células cebadas, macrófagos, células CD4, un menor número de células T CD8 + y linfocitos B (Caraballo y Zakzuc, 2012). En un estudio realizado por de la Rosa (2012) se determinó la presencia en el infiltrado celular de eosinófilos, mastocitos linfocitos CD4, CD8, NK, B y macrófagos rodeando a la LM.



Figura 10. Respuesta inflamatoria del hospedador a la invasión del músculo esquelético (ME). Se observa en esta fotografía tomada a 40x, durante la elaboración de este trabajo, cómo la larva muscular (LM) y célula nodriza (CN) están rodeados del infiltrado celular (IC) (preparación con hematoxilina-eosina). La barra mide 200 μ m.

Otra respuesta importante y que ha sido estudiada durante la triquinosis experimental murina es la Th17, que en estudios en modelos de triquinosis murina se ha descrito que está asociada a la expulsión de parásitos (Afzali *et al.*, 2009). Haciendo



especial hincapié en la inmunidad intestinal, IL-17 controla la hipercontractilidad pero poco se conoce por la invasión del músculo esquelético en la migración de larvas. Esta invasión, como ya se ha indicado, puede dañar las células musculares y estimular la infiltración de células inflamatorias, principalmente eosinófilos (figura 11).

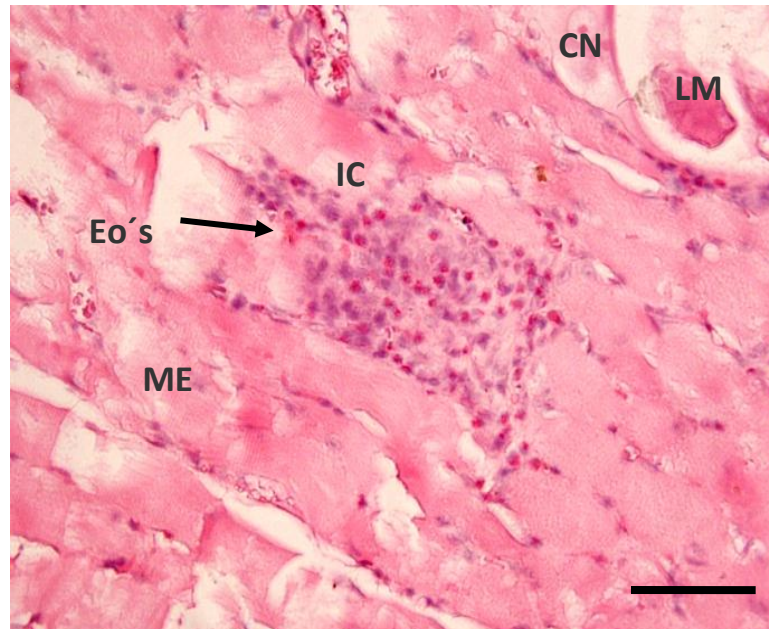


Figura 11. Eosinófilos que rodean el complejo CN - LM. Se observan en esta fotografía obtenida en la realización de este trabajo, los eosinófilos teñidos con eritrosina B, los cuales están de color rojo, a diferencia del resto de las células inflamatorias. Día 27 PI, 40x. La barra mide 100 μ m.

1.8. Tratamiento

A fin de eliminar las formas de *T. spiralis* del lumen gastrointestinal se ha implementado la aplicación de antihelmínticos en el estado de invasión intestinal como terapia efectiva, particularmente en los primeros 3 días posteriores a la infección, lo que previene la subsecuente invasión muscular y desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, la mayoría de los casos son diagnosticados meses después de la infección, cuando la larva ya está establecida en músculo, provocando que se reduzca la efectividad del tratamiento antihelmíntico sobre el curso de estados más avanzados de la enfermedad, sobre letalidad y sobre la larva ya enquistada. (Gottstein *et al.*, 2009).



Los fármacos de elección por su efectividad para la infección por *T. spiralis* más utilizados en México son albendazol y mebendazol. El albendazol es un antihelmíntico de amplio espectro. Después de la administración por vía oral se absorbe y experimenta rápidamente metabolismo de primer paso en el hígado hacia el metabolito sulfóxido de albendazol. El sulfóxido se une predominantemente a proteínas, distribuyéndose bien en los tejidos y es excretado por la orina (Rosenthal y Goldsmith, 2005). En adultos, la dosis recomendada es de 400 mg, 2 veces al día durante 10-15 días (Camet *et al.*, 2002).

El mebendazol es un benzimidazol sintético con un gran espectro de actividad contra helmintos. El medicamento absorbido (menos del 10%) se une a proteínas plasmáticas y se convierte rápidamente en metabolitos sin actividad (principalmente durante su primer paso en el hígado). Se excreta predominantemente en la orina. La dosis usada para la triquinelosis es de 200-400 mg por 3 días y posteriormente 400-500 mg por 10 días. (Rosenthal y Goldsmith, 2005).

También es conveniente la administración simultánea de corticoesteroides para el alivio de la fiebre y los efectos colaterales de la inflamación, debido al daño celular que resulta de la penetración de LRN a los tejidos. El uso de prednisona ha mostrado tener buenos efectos para aliviar los síntomas de la triquinelosis (Capó y Despommier, 1996)

1.9. Vacunación

Se han llevado a cabo varios intentos para inducir protección contra la infección por *Trichinella*, con resultados prometedores, pero hasta el momento no hay una vacuna disponible. Se han empleado desde LM vivas, atenuadas por radiación o congeladas, con las cuales se obtiene una protección parcial en ratones o cerdos infectados de manera experimental; sin embargo, ésta estrategia en estudios de campo no ha tenido resultados exitosos (Bruschi y Murrell, 2002). Otros estudios llevados a cabo con antígenos de LRN indican que pueden ser un candidato vacunal para cerdos



(Marti y Murrell, 1986). Sin embargo, se ha documentado que la obtención de las LRN es limitada porque depende de la recuperación de GA, de los cuales sólo es posible recuperar 10% del número de LM inoculadas en la infección experimental (Despommier, 1998).

De la Rosa Arana *et al.*, 2012, soportan la idea de que tanto el levamisol como el *Staphylococcus* pueden ser usados como adyuvantes para mejorar la respuesta humoral y al mismo tiempo se demuestra que el IFN-g puede ser implicado en el mecanismo de protección contra *T. spiralis*, donde se induce una respuesta Th1 en la inmunización de ratas con antígenos de excreción y secreción de la LM comparando efectos de levamisol, fracción bacteriana de *Staphylococcus* y adyuvantes de Freund.

1.10. Evasión de los mecanismos de la respuesta inmune

La evasión de la respuesta inmune de manera general se divide en dos clases: 1) antígeno-dependiente, reclusión anatómica, antígenos estado-específicos, liberación de antígenos y mimetismo molecular, y 2) los que modulan la respuesta inmune del hospedador. Los mecanismos de evasión más relevantes son los que se refieren a la dependencia de antígeno, a la reclusión anatómica y a los antígenos que son estado-específicos (Bruschi, 2004). En el caso de la reclusión anatómica, las LM encapsuladas en las fibras musculares pueden liberar antígenos y así estimular la respuesta inmune del hospedador, ya que el parásito está protegido de los efectores moleculares y celulares; este tipo de evasión se conoce como “secuestro de una vía”. Respecto a los antígenos estado-específicos, los anticuerpos contra el estado adulto no reconocen a la LRN; los anticuerpos específicos para los antígenos de superficie de la LRN aparecen hasta la cuarta semana de infección, cuando el parásito no puede ser atacado porque ya se encuentra dentro de la célula nodriza (Bruschi y Murrell, 2002).



2. JUSTIFICACIÓN

Este proyecto se basa en la necesidad de caracterizar el tiempo de aparición del infiltrado celular y el desarrollo de la larva a nivel muscular de la célula nodriza de *Trichinella spiralis* y la aparición del infiltrado celular que la rodea, así como sus medidas durante su crecimiento del día 16 al 39 PI. La mayoría de los estudios que caracterizan la respuesta inmune en la triquinelosis se han enfocado a la fase intestinal, quizá asociado al interés del estudio de la inmunidad de mucosas y donde se ha descrito una reacción inflamatoria inducida por las interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13 con presencia de células cebadas y eosinófilos que provocan contracciones que terminan con la expulsión del gusano adulto; sin embargo, esta reacción no evita la larviposición de las larvas recién nacidas (LRN) que migran hasta invadir el músculo esquelético donde se convierte en larvas musculares (LM). Poco se conoce sobre la actividad de las células que median la respuesta inmune en la fase muscular aunque se sabe que está caracterizada por un aumento de anticuerpos IgG e IgE en la tercera-cuarta semana de infección; éstos anticuerpos son capaces de eliminar a las LRN in vitro por una acción ADCC, pero no in vivo porque cuando se encuentran en circulación las LRN ya han penetrado al miocito. Con respecto a la respuesta tisular, los reportes describen la patología del miocito y la formación de la célula nodriza, así como la presencia de un infiltrado celular, constituido principalmente por eosinófilos y células CD4, que se presentan de manera abundante a los 40 DPI, pero no se conoce si el infiltrado se forma de manera simultánea al crecimiento de la célula nodriza o aparece posterior al desarrollo de dicha estructura parasitaria en donde se desconoce si la proporción de eosinófilos es constante durante la formación del infiltrado.



3. OBJETIVO GENERAL

Determinar la cinética de aparición y crecimiento de la larva muscular, formación de la célula nodriza y del infiltrado celular alrededor de la cápsula de colágeno de *Trichinella spiralis*, por medio de tinciones de hematoxilina-eosina, eritrosina B y Giemsa.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.1. Propagar la cepa de *Trichinella spiralis* en ratones hembras CD1 de seis semanas de nacidas.
- 4.2. Observar el crecimiento de la larva muscular en diafragma del día 13 al 39 PI por medio de Giemsa.
- 4.3. Observar el desarrollo de la célula nodriza de *Trichinella spiralis* y la aparición del infiltrado celular a su alrededor por medio de técnicas histológicas tiñendo con hematoxilina-eosina y eritrosina B.



5. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO





6. METODOLOGÍA

6.1. Propagación de la cepa

La cepa MSUS/MEX/91/CM-91 se propagó en el bioterio del InDRE mediante pases entre ratas y ratones. Las ratas de 6 semanas de edad y aproximadamente 300 ± 10 g de peso se infectaron oralmente con 23 LM por gramo de peso, equivalente a $7,000 \pm 125$ LM, suspendidas en un amortiguador de fosfatos (0.01M) adicionado con NaCl (0.15M) a pH 7.2 (PBS) y se administraron con una micropipeta por vía oral. Cada rata recibió 0.15 mL. A las seis semanas de infección, de una de las ratas se recuperaron las larvas por digestión artificial y se infectaron por vía oral a 27 ratones hembra CD1 de seis semanas de nacidas y 20 gramos de peso con 50 LM (equivalente a 2 LM por gr de peso), con las LM restantes se infectaron ratas para la conservación de la cepa (de la Rosa, 2000).

6.2. Digestión enzimática

Una de las ratas infectadas previamente con larvas musculares de *Trichinella spiralis* (MSUS/MEX/91/CM-91), se mató por el método físico de dislocación cervical de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Se observó en el microscopio su diafragma entre dos portaobjetos con los extremos pegados por tela adhesiva (triquinoscopía), presionando fuertemente con la finalidad de extenderlos y por lo tanto adelgazarlos para corroborar la existencia de LM. Una vez confirmada la infección de la rata, se retiró piel, vísceras y se cortaron las patas, cabeza y cola, para posteriormente molerlo en trituradora de carne. Por cada 100 g de muestra se colocó en un matraz Erlenmeyer un litro de agua destilada más pepsina al 1% (10g) y ácido clorhídrico concentrado al 1% (10mL), ésta solución se incubó en una estufa a 37 °C con agitación continua con una barra magnética en el fondo durante 4 horas (Gamble *et al.*, 2000; NOM-194-SSA1-2004).



6.3. Obtención de LM

La digestión enzimática se pasó a través de una gasa, cayendo el líquido en un embudo de separación, y dejándola ahí que sedimentara durante 1 hora. En el fondo del embudo se sedimentaron las larvas, formando un botón de color rosa, el cual se extrajo para colocarlo en un tubo de centrifuga. Se hicieron lavados con PBS pH 7.2 y se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos, descartando el sobrenadante; dichos lavados se hicieron hasta que las larvas quedaron libres de tejido muscular, ya que con una pipeta Pasteur se retiraron los restos de tejido muscular; capa café posicionada sobre el botón rosa (larvas musculares). Se agitó el tubo cónico y se tomaron 5 μ L con micropipeta para observar al microscopio y verificar que las larvas obtenidas eran viables, al observarse en movimiento (de la Rosa, 2000; NOM-194-SSA1-2004).

6.4. Infección de ratones

Después de confirmar la viabilidad de las LM, se tomaron 3 muestras con una micropipeta, cada una de 5 μ L, se agitaron durante 3 segundos el tubo en cada ocasión; se colocaron las 3 gotas en un portaobjetos para cuantificar las larvas musculares, donde la cantidad de dichas larvas en cada gota no tuvo una variabilidad mayor a 5 unidades. Se sacó la media y se realizó una regla de tres para determinar la cantidad de microlitros para obtener 50 LM. Una vez determinada la cantidad de microlitros (30 μ L) con las larvas requeridas, se infectaron 27 ratones hembras CD1 de 6 semanas de nacidas, las cuales se sacrificaron una diariamente a partir del día 13 post infección para adquirir lengua y diafragma (de la Rosa, 2000).

6.5. Obtención de regiones anatómicas

Se sacrificó diariamente un ratón por dislocación cervical para no contaminar el tejido (NOM-062-ZOO-1999), obteniendo la lengua, la cual, fue colocada en un casete para inclusión debidamente rotulado con papel albanene, dejando en formol al 10%



solución salina 0.85% durante 18 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo, dicha región anatómica se lavó con agua de la llave 5 veces, para después dejarlas 30 minutos en agua destilada. Finalmente, para preservar la morfología normal se sumergieron las piezas en el conservador (alcohol al 70 %) por un periodo de 18 horas como mínimo de tiempo antes de iniciar la inclusión en parafina (Gaviño *et al.*, 2000).

6.6. Técnica histológica

Se llama técnica histológica a la serie de pasos que han de darse para obtener un preparado observable con el microscopio óptico (figura 12). Un corte histológico es una rebanada de tejido cuyo grosor varía entre 0,5 y 10 o más micrómetros (μm). Para la preparación de uno de tales cortes se congela una pieza de tejido o bien se impregnan con algún material que sirva de soporte y luego se corta con un aparato denominado micrótopo. Se pueden lograr cortes de 2 a 3 μm de grosor a partir de tejido impregnado con parafina. Los cortes se colocan y aseguran sobre un portaobjetos de vidrio y se tiñe con uno o más colorantes para aumentar la visibilidad de los distintos componentes celulares e intercelulares (Bacha, 2001).

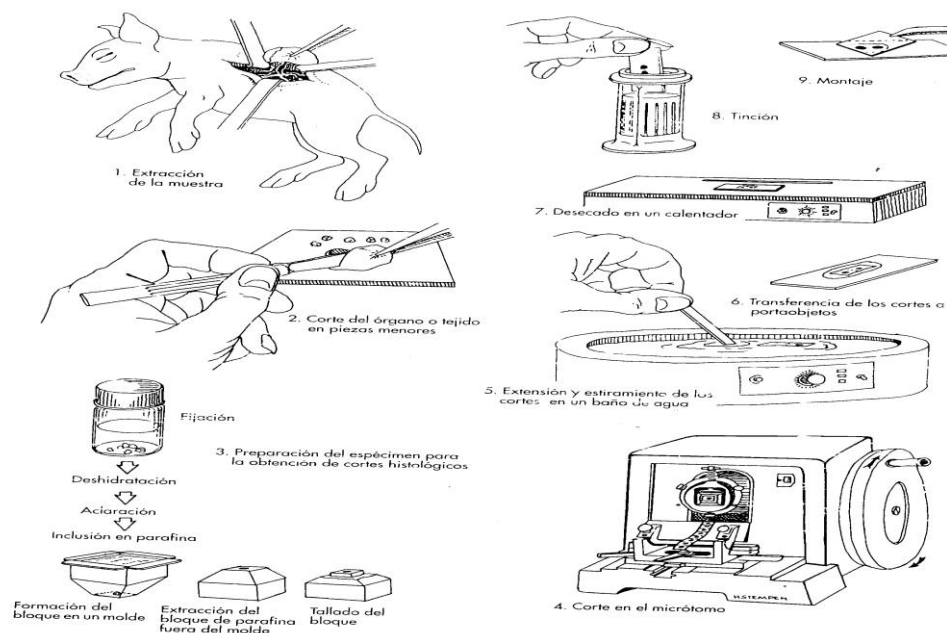


Figura 12. Pasos para la obtención de un preparado histológico con la técnica de impregnación en parafina (Bacha, 2001).



6.6.1. Inclusión en parafina

Primero se rotularon tres recipientes con la leyenda “parafina 1”, “parafina 2” y “parafina 3”, en los cuales se fundió la parafina en una estufa regulada a 56°C. Ya fijado el tejido, se procedió a la inclusión en parafina. Para que la parafina líquida penetrara completamente en el tejido, se sustituyó el agua por un solvente orgánico, lo que se consiguió mediante la deshidratación de los tejidos en alcoholes. Se preparó un carril de deshidratación, el cual constó de 2 frascos con OH al 80%, 2 frascos con OH al 96%, y 2 frascos con OH al 100%. Posteriormente, como sustancia intermediaria para aclarar los tejidos, se transfirieron a 2 frascos con xilol al 100%; con la translucidez de las piezas se cercioró la penetración de la sustancia intermediaria en los tejidos. Este paso (denominado aclaración) es esencial antes de impregnar el tejido deshidratado con parafina ya que el alcohol y la parafina son inmiscibles.

Los casetes para inclusión con lengua se sumergieron durante 30 minutos en cada uno de los frascos. Éstas, una vez escurridas del xilol al 100%, se transfirieron a “parafina 1”, después de 30 minutos se sacaron y se dejaron en “parafina 2” para favorecer una buena impregnación y nuevamente se dejaron 30 minutos, durante la impregnación, la parafina fundida reemplaza por completo al xilol. Este procedimiento se realizó a una temperatura ligeramente superior a la del punto de fusión de la parafina. Después se abrió el casete para inclusión y se realizó corte longitudinal y transversal de la lengua (Gaviño *et al.*, 2000; Atlas, 2011).

Tras el embebimiento completo de las muestras se vertió una pequeña cantidad de parafina líquida del recipiente 3 en un cubo de acero inoxidable de 2.5 cm por lado, se introdujeron los cortes tanto transversal como longitudinal de la lengua, para después completar con la misma parafina tres cuartas partes de molde. Se rotuló el cubo de parafina con papel albanene indicando el número de ratón y se dejó solidificar un día a temperatura ambiente. Finalmente, para sacar la parafina solidificada del molde, se presionó del lado del papel albanene (Atlas, 2011).



6.6.2. Portaobjetos con gelatina histológica

Se lavaron con agua y jabón perfectamente los portaobjetos a utilizar, posteriormente se desengrasaron con una mezcla de alcohol al 70% y éter al 30%. Por cada 50 mL de agua destilada tibia, se colocaron 250 mg de gelatina más 25 mg de sulfato de amonio de potasio, se disolvió bien e introdujo en dicha solución cada uno de los portaobjetos por 60 segundos aproximadamente. Se dejaron secar y guardaron para su posterior uso. Estos portaobjetos funcionaron como adhesivo entre el cristal y el corte histológico (de la Rosa, 2000).

6.6.3. Cortes histológicos

Se realizó una serie de procesos sobre el bloque de parafina antes de hacer el primer corte útil a la muestra. En primer lugar se retalló el bloque hasta hacer una pirámide truncada, considerando la cara que se puso en contacto con la cuchilla. Una vez retallada la pirámide, la muestra queda dentro de ella pero no está en contacto directo con la cara superior o de corte, por lo fue necesario un proceso de desbastado, es decir, la eliminación del espesor de parafina que hay entre la superficie del bloque y la muestra (Atlas, 2011).

Otro aspecto que se tomó en cuenta antes de empezar a cortar en el micrótomó de rotación fue la orientación de la cuchilla respecto a la superficie de corte de la pirámide.

Se colocó y aseguró el bloque de parafina en el micrótomó, el cual es un aparato mecánico en donde se obtienen secciones de un grosor de micrómetros (5 a 20 μm), en este caso fueron de 7 μm . Con cada vuelta del micrótomó el cubo de parafina avanzó sobre la cuchilla y se obtuvo una nueva rebanada. Cada una sucesiva se adhirió al precedente formando así una tira continua de corte. Posteriormente se separaron con cuidado y con ayuda de pinces uno o dos cortes de la tira y se



depositaron sobre la superficie de un baño de agua a 45 °C. Esto ablandó a la parafina y estiró el corte eliminando las arrugas, debido al calor y a la hidrofobicidad.

Es importante quitar las burbujas formadas en el fondo del baño antes de comenzar. Ya estiradas las tiras del corte, se tomaron con la ayuda de un portaobjetos previamente tratado con gelatina histológica para su fácil adherencia y se dejaron secar. Posteriormente se colocó en una estufa a una temperatura de 56 °C durante toda la noche, y así con cada uno de los cubos se obtuvieron 8 laminillas. Una vez secos, los portaobjetos con las secciones estaban listos para el procesamiento siguiente (Gaviño *et al.*, 2000).

6.7. Fundamento de tinciones

La mayoría de los tejidos, sobre todo los de animales, son incoloros y por ello necesitamos teñirlos para observar sus características morfológicas. Las tinciones generales están basadas en el uso de colorantes, sustancias mediante las cuales se consigue colorear a los tejidos. Los colorantes son normalmente hidrosolubles y se caracterizan por unirse a ciertas moléculas presentes en los tejidos gracias a afinidades químicas. Se utilizan normalmente para teñir a las células y componentes tisulares que van a ser observados con el microscopio óptico y por ello se realizan habitualmente sobre secciones de tejido, siendo las más utilizadas las secciones obtenidas a partir de inclusiones en parafina (Gaviño *et al.*, 2000).

6.7.1. Giemsa

Es un colorante neutro, se dice que la coloración de Giemsa es una coloración compuesta o diferencial (ya que emplea más de un colorante), donde su unión es de carácter salino entre colorantes ácidos y básicos, formando precipitado insoluble en agua pero es estable en disoluciones alcohólicas.



La tinción de Giemsa emplea como colorante fundamental una mezcla de tiacínicos catódicos, como el azur A,B y el azul de metileno, que colorean estructuras de carácter basófilo como lo es el núcleo, la cromatina nuclear adopta la tinción azul violácea, mientras que la eosina colorea el componente extracelular (citoplasma), éstas sustancias están disueltas en alcohol metílico. Su fundamento está en la disociación controlada de las sales de eosinato, que ocurre por la mezcla de Giemsa con agua destilada (Pérez, 2008).

En específico para diafragmas infectados con *Trichinella spiralis*, la LM y célula nodriza son teñidas de color azul, mientras que las células musculares se tiñen de color rosa (Ramírez *et al.*, 2007).

6.7.2. Hematoxilina-Eosina

El histólogo tiene a su disposición numerosas tinciones, pero la más usada es una combinación que emplea hematoxilina y eosina sobre cortes de parafina. (Bacha, 2001). La hematoxilina y la eosina se utilizan en histología principalmente para poner en evidencia las características estructurales (Atlas, 2011)

La eosina es un colorante ácido (predomina densidad de carga negativa), por lo cual se asocia y colorea a estructuras catiónicas del citoplasma y matriz extracelular, tales como filamentos citoplasmáticos (como los de células musculares), membranas intracelulares y fibras extracelulares por sus aminoácidos básicos ionizados (Ross y Wojciech, 2008).

La reacción de los grupos catiónicos con un colorante ácido, recibe el nombre de acidofilia (es decir, que tienen afinidad por lo ácido). Las reacciones de los componentes celulares con los colorantes ácidos no son tan específicas ni tan precisas como las reacciones con los colorantes básicos (Ross y Wojciech, 2008).



La hematoxilina no es un colorante básico en sentido estricto, se usa con un mordente, es decir, un intermediario entre el componente del tejido y la anilina. Es por la acción del mordente que la coloración con la hematoxilina se parece a la tinción que produce un colorante básico, por lo cual se asocia y colorea estructuras aniónicas, entre los que se encuentran los grupos fosfato de los ácidos nucleicos, los grupos sulfato de los glucosaminoglucanos, y los grupos carboxilo de las proteínas. La capacidad de estos grupos aniónicos de reaccionar con una anilina o colorante básico se denomina basofilia (es decir que tienen afinidad por lo básico). Los componentes del tejido que se tiñen con hematoxilina también exhiben basofilia (Ross y Wojciech, 2008). Se tiñen de color azul y púrpura los núcleos, citoplasmas en rosa, músculo en tonos rojizos a rosados fucsia, glóbulos rojos en naranja o rojo y la fibrina en rosa intenso (Bacha, 2001).

6.7.3. Eritrosina B

Colorante ácido, sintético en forma de polvo rojo, la eritrosina B, puede ser disociada en partículas cargadas negativamente y combinarse fácilmente con los residuos de arginina en el punto isoeléctrico de la PBM que se ha determinado en alrededor de 10. Esto explicaría por qué al pH 10 este colorante tiñe selectivamente las estructuras celulares ricas en MPB, como los gránulos de los eosinófilos.

Los mecanismos químicos exactos de la eritrosina B aun no están establecidos, pero este método es un colorante selectivo que se une a los gránulos de eosinófilos, específicamente a la proteína básica mayor (PBM), la cual es un polipéptido policatiónico con un alto contenido en arginina. (Benitez *et al.*, 1987)

6.8. Procedimiento tintorial

6.8.1. Giemsa

Una vez obtenido el diafragma, se rotuló e inmediatamente se sumergió en alcohol acético formaldehído (FFA), como mínimo 4 horas a temperatura ambiente. Un día



antes de teñirlo, se cortó en pedazos más pequeños, los cuales se sumergieron en alcohol al 50 %. Ya transcurrido ese día se transfirieron a 10 ml de Giemsa (solución diluida 1:6 en 0.01M, de solución buffer de fosfatos pH 7.2 durante 45 min con movimientos lentos y constantes a temperatura ambiente. Posteriormente se pasaron los pedazos del diafragma a alcohol ácido 0.02N (HCl en 50% de alcohol etílico) por 45 segundos, a continuación se procedió a la deshidratación en alcohol de forma progresiva: 30%, 50%, 70% y 100%, se dejaron en cada uno de 2 a 3 minutos con movimiento suaves. Durante este paso se inspeccionó visualmente la muestra teñida. Una vez azules los tejidos, se transfirieron a una mezcla con volúmenes iguales de alcohol absoluto y xileno por 5 min, y finalmente se dejaron en Xileno absoluto por 5 minutos (Ramírez *et al.*, 2007).

6.8.2. Hematoxilina- Eosina

Se sumergieron las laminillas con los cortes histológicos en un carril de hidratación constituido por: Xilol al 100%, alcohol al 100%, 96%, 80%, 70%. A continuación se dejaron escurrir y se lavaron en agua destilada, posteriormente se transfirieron a Hematoxilina de 10 a 15 min, e inmediatamente se lavaron con agua de la llave, seguido de agua destilada, para después sumergirlos en Eosina de 2 a 5 minutos. Nuevamente se lavaron con agua de la llave y agua destilada, para así continuar con la deshidratación al sumergirlos en un carril constituido por alcohol al 70%, 80%, 96%, y 100%, terminando con Xilol al 100% (Atlas, 2011) .

6.8.3. Eritrosina B

Se procedió con la fijación de los frotis en formalina-alcohol al 10%, para después sumergirlos en hematoxilina de Harris durante 1 min, al término de esto se lavaron 3 veces en agua destilada. Posteriormente se tiñeron con eritrosina B al 0.015% en buffer de glicina 0.1M a pH 10 por 30 min. La diferenciación se llevó a cabo en baños con etanol al 70%



6.9. Técnica de análisis de imagen

Una imagen digital está definida por un conjunto de celdas (píxeles) distribuidas como una matriz de datos de dos dimensiones, de las cuales las dos primeras corresponden a las condiciones en línea y columna de cada celda o píxel, y la tercera, a la resolución espectral captada por el sensor (Chuvieco, 1990). Éstas imágenes pueden ser obtenidas de diversas fuentes, como con microscopio electrónico de barrido o de transmisión, microscopios ópticos, aparatos de rayos X o cámaras de video (Cheng y Da Wen, 2004). Las principales ventajas que ofrecen dichas técnicas es que son rápidas, exactas y no destructivas. Se pueden considerar mediciones de pequeños campos en imágenes con gran detalle y seguir analizando estos mismos, pero disminuyendo la escala o resolución, proporcionando datos cuantitativos requeridos para correlacionar parámetros ópticos y estructurales (Mendoza et al., 2007).

6.9.1. Etapas de la técnica de análisis de imágenes

Durante las últimas décadas, las técnicas de análisis de imagen han tenido un gran desarrollo debido a que pueden caracterizar cuantitativamente características físicas como tamaño (área, perímetro), morfología, color y propiedades de textura de cualquier imagen digital; debido a esto, cada vez son más importantes en diversas áreas (Du y Sun, 2004; Cheng y Da Wen, 2004). La técnica de análisis de imágenes consiste en cinco etapas las cuales se mencionan a continuación:

6.9.1.1. Adquisición de la imagen en forma digital

El análisis de imágenes comienza cuando se captura una imagen digital (presentación de un arreglo de píxeles) que compone una figura; ésta puede ser capturada usando una cámara digital, escáner microscópico u otro dispositivo de captura de imagen. Dependiendo del equipo la información será digital o análoga, en donde se han empleado diversas tecnologías de adquisición de imágenes, de las cuales depende la



resolución y el uso final de las imágenes obtenidas, a través de las cuales se permite evaluar características como tamaño, forma, color y textura (Du y Sun, 2004).

La iluminación es un requisito importante en la adquisición de las imágenes. Una imagen de alta calidad puede ayudar a reducir el tiempo en el procesamiento, en las siguientes etapas del procesamiento de imágenes y en consecuencia a reducir los costos del sistema del análisis de imágenes (Du y Sun, 2004; Pedreschi *et al.*, 2004).

6.9.1.2. Pre-procesamiento de la imagen

El propósito del pre-procesamiento de la imagen es obtener mejores imágenes con las mismas dimensiones de la imagen original, se pueden disminuir distorsiones o realzar algunas características de la imagen que son importantes para su futuro procesamiento y con esto crear una imagen mejor a la original. En general son métodos computacionales que permiten reducir el ruido en las imágenes y enfatizar los bordes, de modo que se resalten los aspectos de interés en la imagen. (Du y Sun, 2004).

6.9.1.3. Segmentación de la imagen

La segmentación es para extraer zonas específicas de la imagen, la divide en regiones o categorías que corresponden a distintos objetos o partes, clasificando todos los píxeles (0 es blanco y 1 negro) para así poder extraer la parte de la imagen donde se encuentra la información de interés. Lo anterior consiste en identificar regiones de la imagen con el propósito de separar aquellas regiones de interés del fondo y extraerlas para ser analizadas. Es relativamente sencillo contar objetos si la segmentación ha sido bien realizada.

Existen propuestas como la segmentación basada en umbrales o “thresholding”, y la segmentación basada en regiones. La primera consiste en segmentar objetos sólidos que poseen un contraste diferente del fondo y la segunda en separar regiones o



grupos de pixeles que tengan tonos similares en escala de grises de una sección de la imagen (Du y Sun, 2004; Pedreschi *et al.*, 2004).

6.9.1.4. Medición de las características del objeto

Después de detectar aquellas zonas de interés, el siguiente paso es la extracción de las características del objeto bajo estudio que se pueden clasificar en tres clases: geométricos (tamaño y forma), color y textura (Du y Sun, 2004).

Una vez teñido el diafragma con Giemsa y los cortes histológicos de la lengua; una cinética teñida con H-E y la otra teñida con Eritrosina B, se seleccionaron 10 larvas para su estudio y promedio por día, de cada una de las regiones anatómicas de los 27 ratones.

6.9.1.4.1. Geométricos (tamaño y forma)

Comúnmente los parámetros utilizados para medir el tamaño de un objeto son el área, parámetro, longitud y diámetro; pero la medición más conveniente para evaluar esta característica, es el área. Por otra parte el diámetro de un objeto se utiliza para discriminar entre dos objetos de forma diferente. La longitud y el ancho de un objeto pueden ser usados también para medir el tamaño de un objeto (Du y Sun, 2004).

La medición de la forma es fácil utilizando el procesamiento de imágenes. Frecuentemente los objetos de una clase pueden distinguirse de otros por su forma, ya que estas son mediciones físicas características (Du y Sun, 2004).

6.9.1.4.2. Color

Las técnicas de procesamiento de imagen permiten medir el color de imágenes digitales de forma exacta y no invasiva a partir de los valores de los pixeles de la imagen (Du y Sun, 2004).



Para realizar la medición de color en una imagen es necesario seleccionar un espacio de color; existen cuatro espacios de color que son los más utilizados: CIE Lab, RGB (red, green, blue), XYZ y el CMYK (cyan, magenta, yellow y black) (Pedreschi *et al.*, 2004).

6.9.1.4.3. Textura

Característica usada en la identificación de objetos o regiones de interés en una imagen. La textura de una imagen está caracterizada por la distribución espacial en los niveles de grises en una zona y es definida por patrones repetitivos en las variaciones en escala de grises de un pixel a otro, siendo utilizada para describir propiedades tales como regularidad u homogeneidad (Du y Sun, 2004; Pedreschi *et al.*, 2004).

6.9.1.5. Clasificación

La clasificación es la última etapa del análisis de imágenes y consiste en clasificar los objetos en grupos (tamaño, forma, color, textura), lo anterior determinado con base en las características que se midieron (Cheng y Da Wen, 2004; Pedreschi *et al.*, 2004).



7. RESULTADOS

7.1. Propagación de *Trichinella spiralis* en infección experimental

Una vez que se obtuvieron las LM de la digestión enzimática como se indicó en la sección de metodología, el paquete larvario se suspendió en 10 mL de solución salina fisiológica, se tomaron 5 µL en tres ocasiones diferentes y se contó el número de LM en un microscopio de campo claro. Se obtuvo la media y se llevo a cabo la siguiente regla de tres para determinar la dosis de infección:

$$\begin{aligned} [(9 + 10 + 9) / 3] &= 9 \text{ LM} \quad \text{----} \quad 5\mu\text{L de muestra} \\ 50 \text{ LM} \quad \text{----} \quad X &= 30 \mu\text{L de suspensión para} \\ &\quad \text{infectar a cada ratón} \end{aligned}$$

Se infectaron 27 ratones, los cuales se alimentaron *ad libitum* durante 12 días. A partir del día 13 post infección se selecciono un ratón de manera aleatoria y se mató por dislocación cervical (NOM-062-700-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio) y así sucesivamente hasta el día 39 PI.

7.2. Obtención de lengua y diafragma

A partir del día 13 PI se obtuvo lengua y diafragma de cada uno de los 27 ratones, logrando completa la cinética hasta el día 39 PI. El diafragma se empleó para tinción de Giemsa y la lengua para cortes histológicos. No hubo muertes por causas ajenas al protocolo.

7.3. Tinción con Giemsa

Cada uno de los 27 diafragma se sometió a una tinción con Giemsa para determinar el crecimiento de la LM.



Utilizando Image- Pro-Plus® (software para analizar imágenes) se midió la longitud de cada una de las 27 LM (figura 13), donde se observó que el crecimiento se da de forma proporcional y lineal conforme pasan los días post infección. En los días 13, 14 y 15, no se observó ninguna larva muscular. Cabe mencionar que la medida del día 39 PI que se obtuvo fue de $1006 \pm 18 \mu\text{m}$.

Se encontró que a partir del día 16 PI se comenzaron a diferenciar las LM que estaban invadiendo el músculo, dichas LM midieron $218 \pm 9 \mu\text{m}$, mientras que la cápsula se visualizó a partir del día 18 PI. Con el paso del tiempo se observó como las LM crecen y comienzan a enrollarse, mientras que la célula nodriza se va distinguiendo del músculo esquelético, lo que es característico del parásito (figura 14).

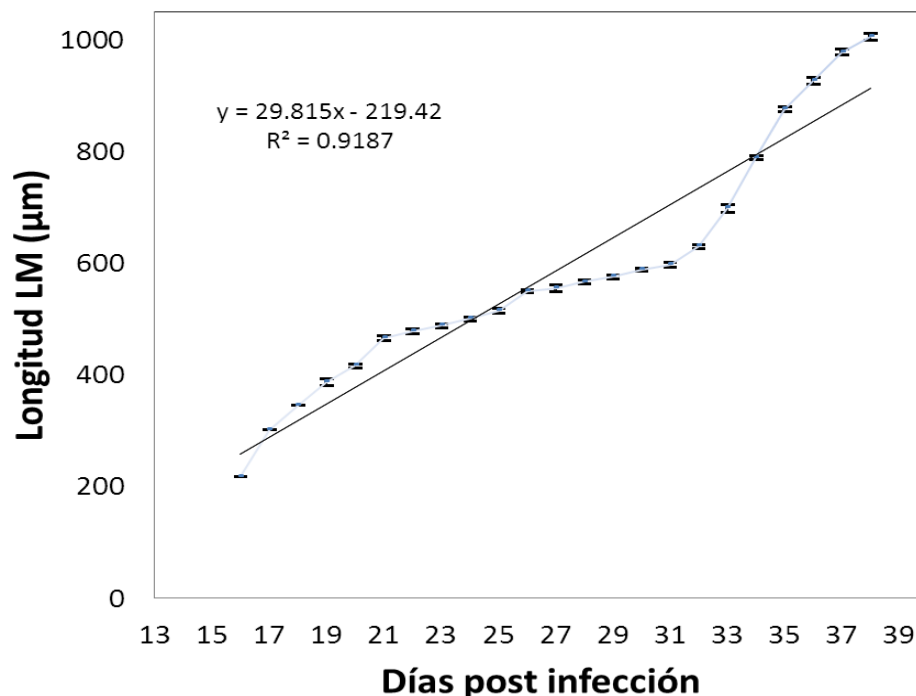


Figura 13. Crecimiento longitudinal de la LM en diafragma. Se observa la longitud de la LM en función de los días post infección. Se calculó la regresión lineal ($R^2 = 0.9187$), para determinar un crecimiento lineal, la correlación es positiva ya que conforme pasan los días PI aumenta su longitud.

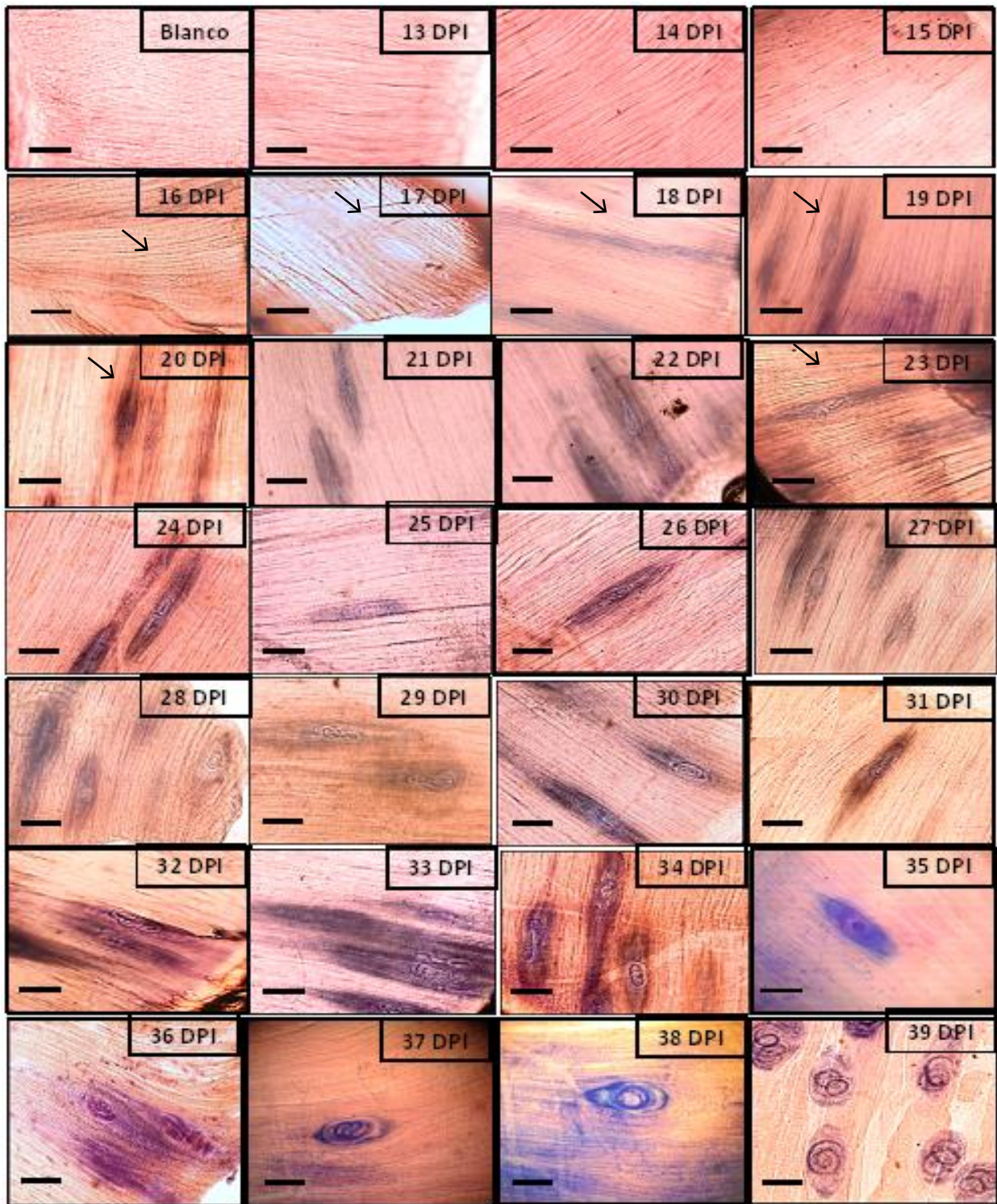


Figura 14. Crecimiento de la LM en diafragma. Los diafragmas de cada uno de los ratones infectados experimentalmente fueron teñidos con Giemsa y se observó al microscopio óptico a 20x. Se muestra el crecimiento de la LM y célula nodriza del día 16 al día 39 PI. Las LM se tiñen de azul y el músculo esquelético de rosa. La barra mide 200 μm y se indica en cada una de las fotografías el día post infección en que se tomó la muestra.



7.4. Tinción con hematoxilina - eosina

Se realizaron cortes histológicos de 7 μm de grosor de cada una de las lenguas de los 27 ratones y se tiñeron con hematoxilina-eosina para identificar tanto la aparición como el crecimiento de la cápsula así como el incremento del infiltrado celular una vez que la LRN penetra a células musculares, el crecimiento de la capsula se observa a partir del día 16 PI, y la presencia de las primeras células que forman el infiltrado celular, conforme pasa el tiempo va aumentando y concentrándose principalmente en los dos polos. Otro aspecto que es claro es la forma ovoide que va tomando la capsula conforme pasan los días (figura 18).

Utilizando Image- Pro-Plus® (software para analizar imágenes) se midió tanto el eje mayor como el eje menor de la célula nodriza, así como con image-j® se midió el área de esta. Con los datos obtenidos se elaboraron 3 gráficas (Figura 15, 16 y 17), donde se observa su crecimiento.

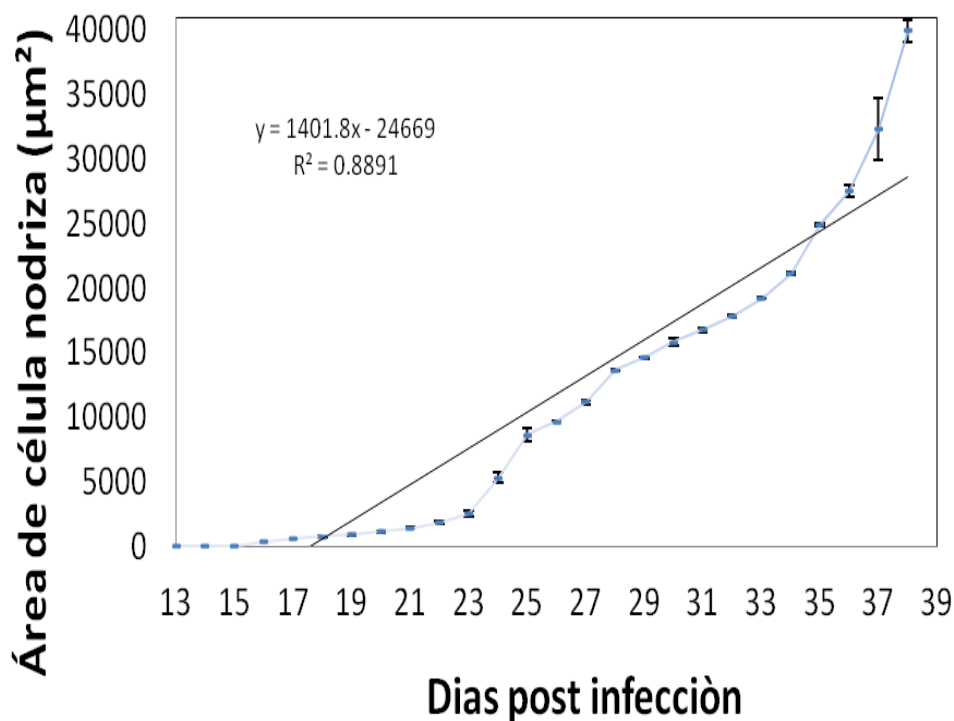


Figura 15. Crecimiento de la célula nodriza. Se muestra el área de la célula nodriza (μm^2) en función de los días post infección. Con los datos se obtuvo una correlación lineal de $R^2 = 0.8891$, $n=10$.

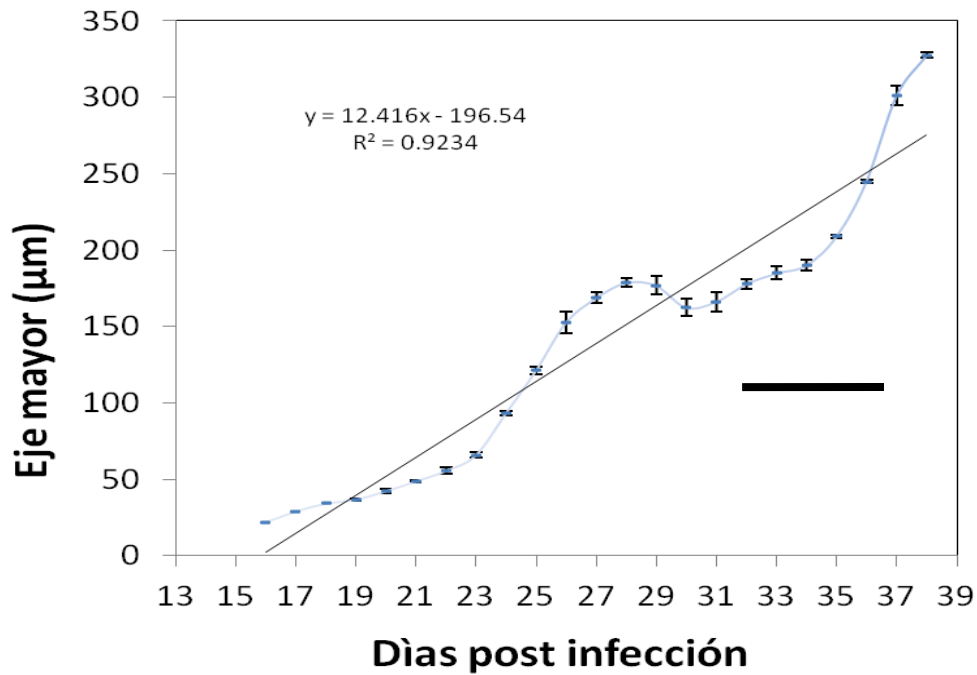


Figura 16. Eje mayor de la célula nodriza. Se muestra el crecimiento en el eje mayor de la célula nodriza en función de los días post infección. Se calculó la regresión lineal ($R^2= 0.9234$), para determinar un crecimiento lineal, la correlación es positiva, $n=10$.

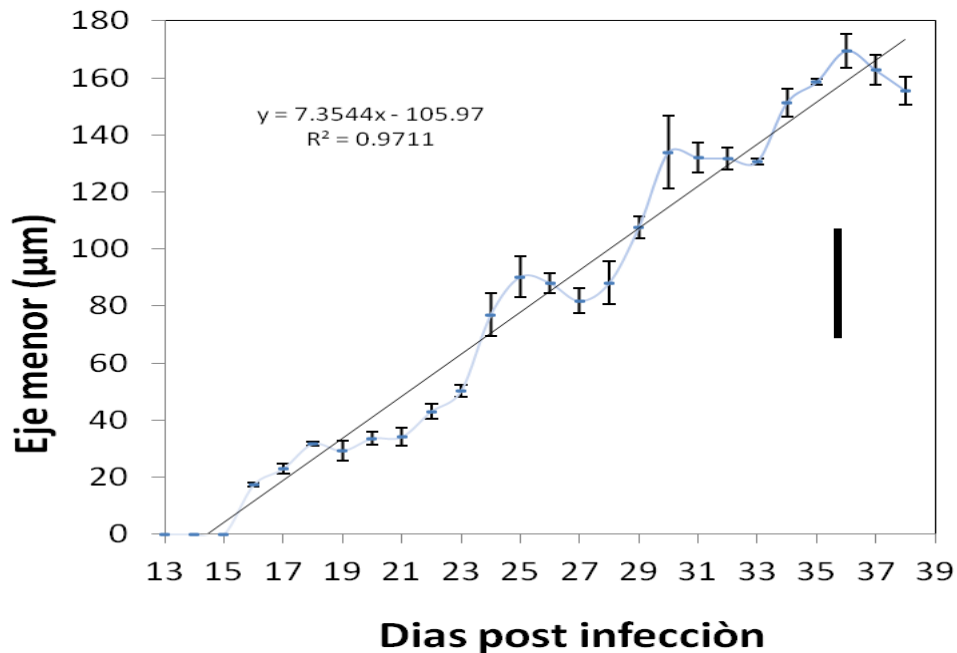


Figura 17. Eje menor de la célula nodriza. Se muestra el crecimiento en el eje mayor de la célula nodriza en función de los días post infección. Se calculó la regresión lineal ($R^2= 0.9711$), para determinar un crecimiento lineal, la correlación es positiva, $n=10$.

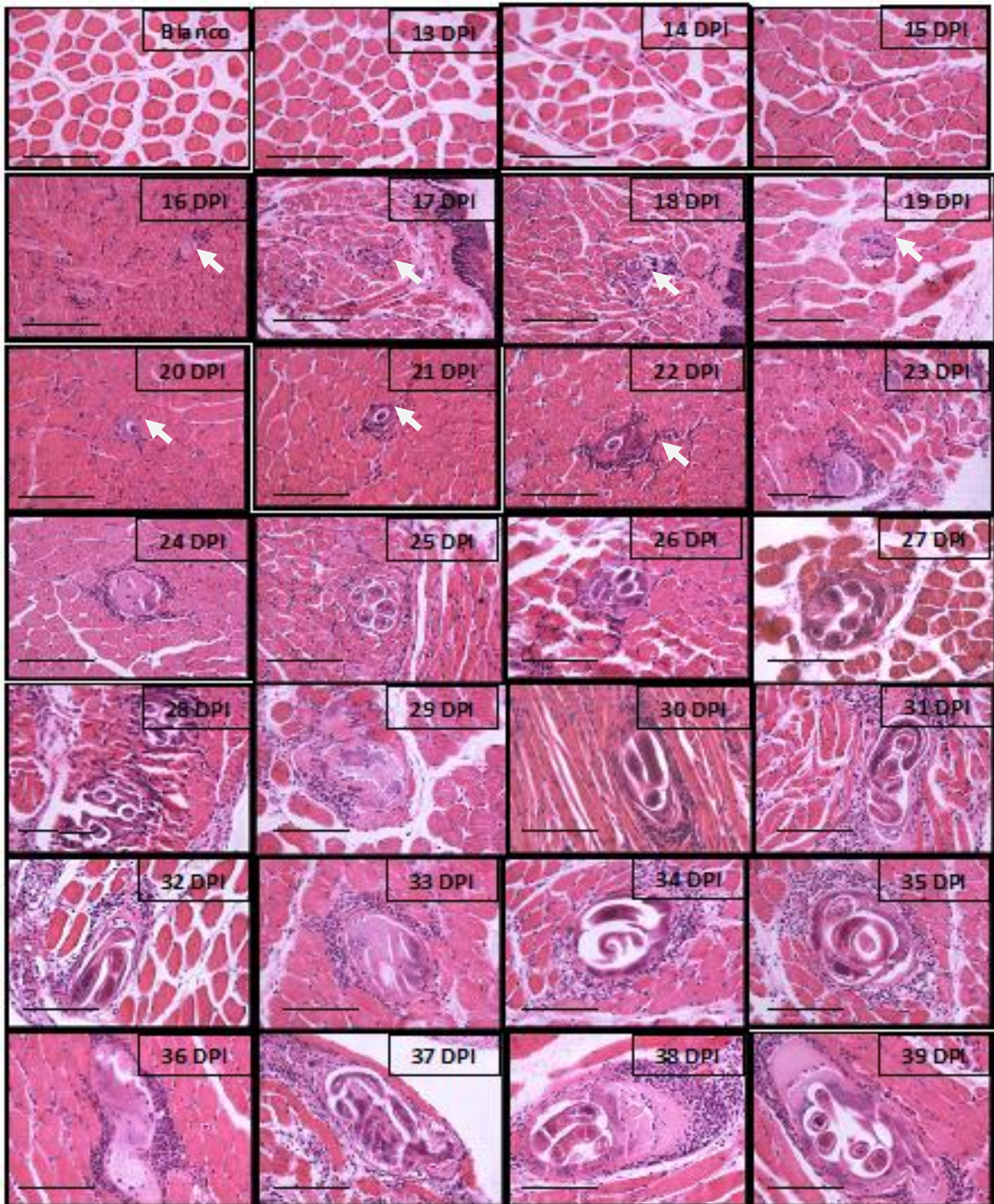


Figura 18. Crecimiento de la cápsula de colágeno e incremento del infiltrado alrededor de la célula nodriza. Tinción de hematoxilina y eosina, observados por microscopio óptico a 40x. Se muestra el crecimiento de la célula nodriza la cual está teñida de morado claro, el infiltrado celular se distingue como púrpura fuerte y finalmente el tejido muscular se tiñó de color rosa. La barra mide 200 μ m y se indica en cada fotografía el día post infección en que se tomó la muestra.



7.5. Tinción con eritrosina B

Un segundo conjunto de cortes histológicos de cada una de las 27 lenguas, se tiñeron con eritrosina B para identificar la aparición alrededor de la CN de eosinófilos, los cuales se distribuyen principalmente en los polos, por lo que el conteo se realizó en esa zona dentro de una área de $10\,000\ \mu\text{m}^2$ utilizando Image- Pro-Plus®. En los días 13, 14 y 15 PI (figura 20), no se encontraron eosinófilos ni presencia del complejo LM-CN, ya que aún no se ha invadido el miosito. Fue a partir del día 16 PI que se hicieron presentes dichos eosinófilos y se observaron de color rojo intenso. Conforme pasan los días de infección aumenta el tamaño del complejo CN-LM, observándose el efecto contrario en los eosinófilos (figura 20). En la (figura 19) predomina un bimodal con picos máximos los días 21 y 27, probablemente se debe a que el sistema inmune promueve su producción para defensa del hospedador, aunque en ambos máximos se observa un descenso considerable tal vez sea cuando degranulan ya que al no haber presencia de arginina (principal componente de la PBM) cuyo colorante (eritrosina B) es selectivo a ésta (Benítez *et al.*, 1987), los eosinófilos dejan de ser visibles. Este comportamiento se repitió en toda la cinética, donde se observó una tendencia multimodal, pero descendiendo la cantidad de eosinófilos, posiblemente cuando el hospedador deja de producirlos debido a la toxicidad que le provocan.

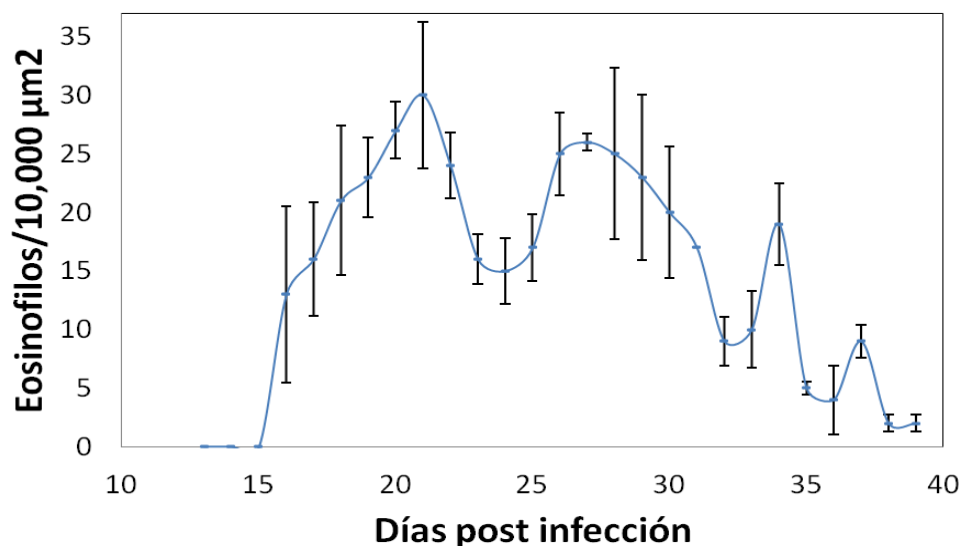


Figura 19. Eosinófilos asociados al infiltrado celular alrededor de la CN. Presencia de eosinófilos en $10,000\ \mu\text{m}^2$ de área alrededor de la CN en función de los DPI. Se observa a lo largo de la cinética una tendencia multimodal, predominando un bimodal con puntos máximos los días 21 y 27. $n=10$.

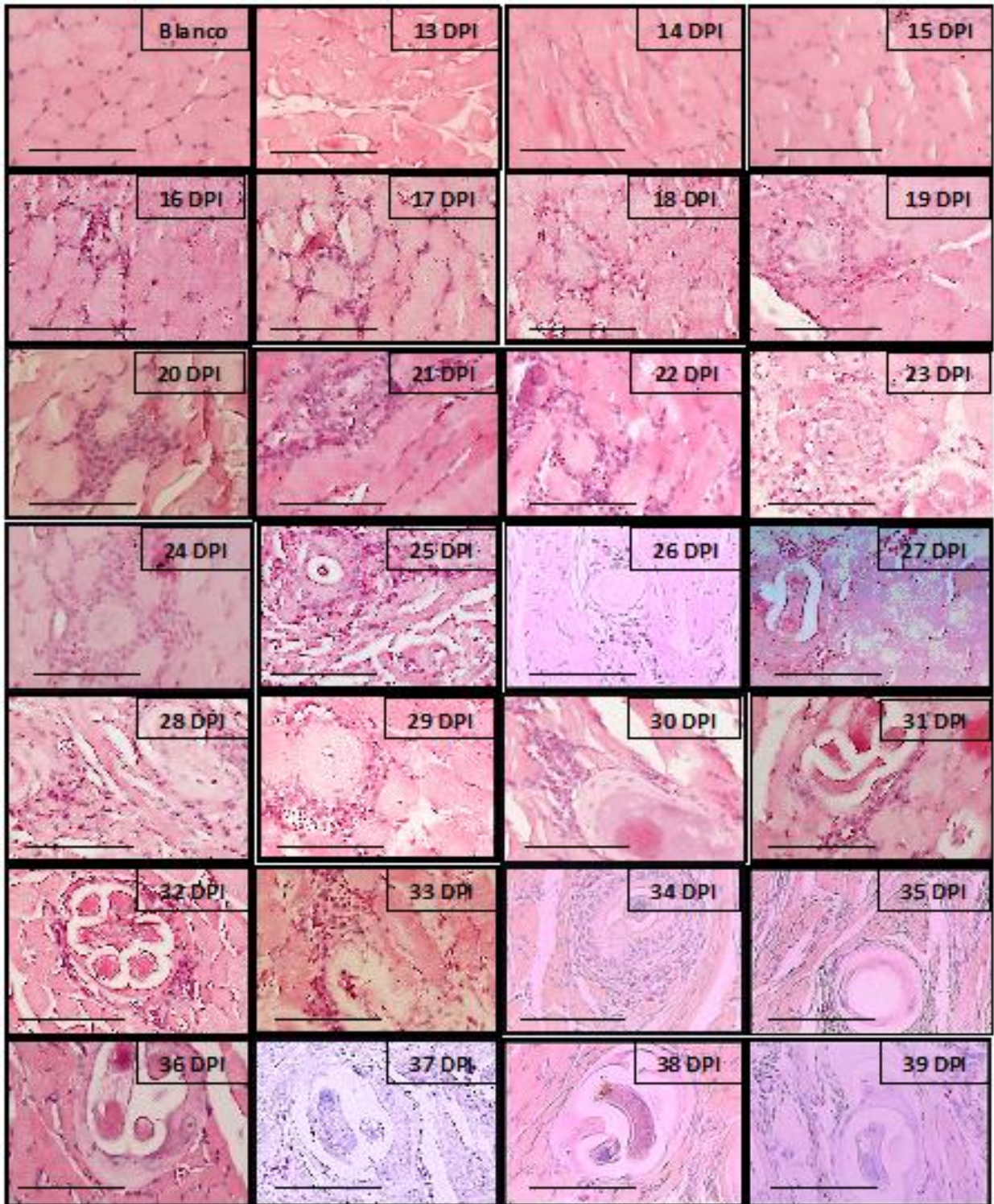


Figura 20. Eosinófilos que conforman el infiltrado celular que rodea la célula nodriza. Corte transversal de lengua de ratón infectada y teñido con eritrosina B. Se muestra la aparición de eosinófilos (teñidos de rojo) alrededor de la célula nodriza. La barra mide 200 μ m y se indica en cada fotografía el día post infección en que se tomó la muestra.



8. DISCUSIÓN

8.1. Propagación de *Trichinella spiralis* e infección experimental

En este trabajo se empleó un modelo murino de infección experimental con el cual se han estudiado aspectos cinéticos e inmunológicos de la triquinelosis. En este trabajo se emplearon 27 ratones hembras CD1 de 6 semanas de nacidas, libres de parásitos y otros agentes infecciosos, ya que se producen en ambientes de alta bioseguridad, con las facilidades del bioterio del InDRE. Se ha documentado que la cepa CD1, es ampliamente utilizada en infecciones experimentales con helmintos, por su facilidad de montar una respuesta TH2, mientras que otras cepas de ratones como el Balb/c que está asociado a trabajos de enfermedades crónico degenerativa y donde se estimule una respuesta inmune tipo TH1, ha sido menos empleado pero no descartado (Bruschi *et al.*, 2009; Ramírez *et al.*, 2007; Fabrizio y Chiumiento, 2011).

La vía de infección en este trabajo fue oral, considerando la naturaleza del ciclo biológico de *T. spiralis* que implica esta entrada. Es por esto que el inicio de la infección se da una vez consumida la carne cruda infectada con larvas (Bruschi y Murrell, 2002). El establecimiento temprano del parásito en el tracto intestinal del hospedador hace que la mayoría de los estudios que caracterizan la respuesta inmune en la triquinelosis se hayan enfocado a la fase intestinal, quizá asociado al interés del estudio de la inmunidad de mucosas y donde se ha descrito una reacción inflamatoria inducida por las interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13 con presencia de células cebadas y eosinófilos que provocan contracciones que terminan con la expulsión del gusano adulto; sin embargo, ésta reacción no evita la larviposición de las larvas recién nacidas (LRN) que migran hasta invadir el músculo esquelético donde se convierten en larvas musculares, y en ello da comienzo la fase parenteral de la infección (Patel *et al.*, 2009; Anthony *et al.*, 2007).

En este trabajo se infectaron ratones con 50 LM, lo equivalente a una infección baja (2LM/g), ya que en el caso de la triquinelosis, se consideran infecciones leves



aquéllas en las que existen de 1 a 50 LM por gramo de músculo; moderadas, de 50 a 100 LM, y graves de 100 LM a más (Vignau, 2004). Las LM se obtuvieron de ratas Winstar previamente infectadas con la cepa MSUS/MEX/91/CM-91. Datos del laboratorio indican que de una rata infectada con 7,000LM (equivalente a una dosis masiva de 25 LM por gramo de peso), se obtienen 100, 000 LM. Como en este trabajo se pretendía identificar de manera individual a cada LM, se hicieron infecciones experimentales de tan solo 2.5 LM por gramo de peso, lo que permitió identificar de manera individual a las CN y LM tanto en las tinciones con Giemsa, como en las histológicas.

8.2. Obtención de lengua y diafragma

La fase de la triquinosis denominada de migración, implica el desplazamiento de las LRN por la sangre y su instalación en las masas musculares, aquí el problema básico es la liberación de productos del metabolismo de las larvas que generan toxicidad y un proceso inflamatorio; en el ser humano esta fase está asociada al edema de extremidades y edema palpebral bilateral, que luego de un par de días remite suponiendo la cura del padecimiento, pero en realidad es el inicio de la penetración en las células musculares por parte de las LRN (Despommier *et al.*, 2005). En cuanto a la fase de la enfermedad de encapsulamiento, se asienta definitivamente el proceso inflamatorio y se agravan los efectos de la toxicidad afectándose el sistema nervioso (Beaver, 1985), mientras que las larvas se desarrollan en larvas musculares y se encuentran dentro de la cápsula de colágeno, protegida de la respuesta inmune del hospedador y rodeada de vénulas recién formadas. En este punto la estructura se conoce como CN y se rodea de un infiltrado celular. El paciente refiere dolor muscular y presenta fiebre intermitente (Despommier *et al.*, 2005, Chávez *et al.*, 2006).

En este trabajo se obtuvieron lengua y diafragma de cada uno de los ratones infectados. Se decidió por diafragma y lengua, pues se conoce que generalmente la LM de *Trichinella spiralis* es donde se instala y donde se encuentra en mayor proporción con respecto al resto del cuerpo (Despommier, 1998). De hecho en



porcino y caballo, estas regiones anatómicas son las de elección para realizar el diagnóstico post mortem (NOM-194-SSA1-2004).

8.3. Tinción de Giemsa

La tinción de Giemsa para muestras de diafragmas infectados con *Trichinella spiralis* ha sido de utilidad para observar a simple vista el complejo CN-LM como puntos de color azul, que contrasta con las áreas de color rosa que rodean la larva, es decir por las fibras musculares no infectadas, esta técnica es útil para un diagnóstico rápido de triquinosis post mortem en mamíferos (Ramírez *et al.*, 2007).

Se logró obtener la cinética completa de diafragmas teñidos con Giemsa, donde se observó el crecimiento y su característica a enrollarse de la larva muscular dentro de la célula nodriza. Conforme pasan los días post infección, se observa mas claramente como se tiñen de color azul la larva y la capsula (figura 14), mientras que las células musculares aparecen de color rosa.

La LM mide 1200 μm de longitud por 40 μm de diámetro (Despommier *et al.*, 2005). En este trabajo la primera medida de longitud que se obtuvo fue del día 16 p.i con $218 \pm 9 \mu\text{m}$ y la última fue de $1006 \pm 18 \mu\text{m}$ del día 39 PI. La diferencia de tamaño entre lo previamente reportado y lo obtenido puede referirse a que en la actualidad existe un gran número de cepas de *T. spiralis* con diferencias marcadas de morfología y biología; en este trabajo se empleo la cepa MSUS/MEX/91/CM-9, la cual se ha mantenido en el InDRE, ENCB, CINVESTAV y CMSXXI, desde 1960 y obtenida por el profesor de la Jara (ENCB) y Martínez Maraña (InDRE), desde entonces tipificada (Arribas *et al.*, 1993).

8.4. Tinción con Hematoxilina-Eosina

En la triquinosis, al igual que en otros modelos de helmintos, los parásitos inducen una respuesta tipo Th2, durante las primeras horas de la respuesta inmune humoral



los mastocitos y basófilos pueden ser importante fuente de dichas citocinas (Ljungstrom *et al.*, 1988). Se conoce sobre la actividad de las células que median la respuesta inmune en la fase muscular aunque se sabe que esta caracterizada por un aumento en las inmunoglobulinas séricas (hipergamaglobulemia), particularmente de IgG e IgE en la tercera-cuarta semana de infección; éstos anticuerpos son capaces de eliminar a las LRN in vitro por una acción ADCC IgG1 (Ljungstrom *et al.*, 1988), pero no in vivo porque cuando se encuentran en circulación se distribuyen en todo el organismo a través de la circulación sistémica, las LRN ya han penetrado al miocito e invaden la musculatura estriada donde se transforma a LM e induce la formación de la célula nodriza alrededor de la quinta semana (Quiroz, 1999).

Con respecto a la respuesta tisular, los reportes describen la patología del miocito y la formación de la célula nodriza, así como la presencia de un infiltrado celular, constituido principalmente por eosinófilos y células CD4 (regulan los niveles de IL-10 y TGF- β , que normalmente controlan el nivel de inflamación circulante causada por el parásito encapsulado en músculo), que se presentan de manera abundante a los 40 días pos infección (Beiting *et al.*, 2007), pero no se conoce si el infiltrado se forma de manera simultánea al crecimiento de la célula nodriza. Lo que se observó en este trabajo fue que el infiltrado celular aparece el día 16 de forma simultánea al desarrollo conforme aparece la LM y célula nodriza (figura 16).

Lo que se conoce en cuanto a la invasión de las larvas musculares es que daña las células musculares y estimula la infiltración de células inflamatorias, principalmente eosinófilos. Las larvas musculares de *Trichinella spiralis*, después de entrar en el tejido muscular, inducen a una respuesta inflamatoria que es responsable de la miositis, una de las consecuencias típicas de la infección por vía parenteral (Bruschi y Chiumiento, 2011).

El tipo de células presentes en el infiltrado circundante a la CN se compone principalmente de varias células efectoras, entre ellas eosinófilos, basófilos, mastocitos (células cebadas), macrófagos, capaz de invadir el citoplasma de la CN,



también de las células CD4, células T, un menor número de células T CD8 + y linfocitos B (Caraballo y Zakzuk, 2011). Sin embargo no se ha caracterizado apropiadamente. Datos obtenidos recientemente en el laboratorio de Helmintos Tisulares en el InDRE indican que se determinó la presencia en el infiltrado celular de linfocitos CD4 (32%), macrófagos (15%), NK (14%), eosinófilos (9%), células B (8%), CD8 (7%), y mastocitos (1%) rodeando a la LM (de la Rosa *et al*, 2012).

Se obtuvo lengua de cada uno de los 27 ratones, los cuales fueron incluidos en parafina, y teñidos con hematoxilina-eosina, usada principalmente para poner en evidencia las características estructurales, en donde se observa el crecimiento del área de la capsula, midiendo el día 16 PI $334 \mu\text{m} \pm 13$, mientras que el día 39 PI aumentó a $39964 \mu\text{m} \pm 846$ y como va alargándose hasta formar un ovoide, se puede identificar al infiltrado celular de color púrpura, ya que se tiñeron los núcleos, esto debido a que se colorearon por acción de la hematoxilina, ya que se asocia y colorea estructuras aniónicas, es decir que tienen afinidad por lo básico (Bacha, 2001). El tejido muscular (estructura catiónica) fue teñido de color rosa, ya que la eosina es un colorante ácido, es decir predomina la carga negativa, es una reacción acidófila, pues tiene afinidad por lo ácido (Bacha, 2001).

La medida del eje mayor de la célula nodriza del día 16 p.i fue de $22 \mu\text{m} \pm 1$, y del día 39 p.i fue 328 ± 11 , mientras que del eje menor del día 16 PI fue de 17 ± 1 y del día 39 PI fue de 156 ± 5 . En la bibliografía las medidas reportadas son entre 300 y 400 μm de largo por 150 a 200 μm de ancho. Normalmente se encuentra una LM dentro de una célula nodriza aunque en infecciones masivas se han observado más de una LM en una célula nodriza (Despommier, 1998; Ramírez *et al.*, 2007).

8.5. Tinción con Eritrosina B

La mayoría de los estudios que caracterizan la respuesta inmune en la triquinelosis se ha enfocado a la fase intestinal (Patel *et al.*, 2009; Anthony *et al.*, 2007), la que comprende del día 1 al 15. Sólo existe infiltrado de poblaciones celulares y presencia



de hembras gestantes que van a liberar a LRN, éstas se desplazan desde las vellosidades hacia la submucosa y pasan a la circulación vía porta (Despommier *et al.*, 2005). Debido a que los macrófagos se activan de manera alterna, ésta respuesta se caracteriza por la producción de IL – 5 que activa a los eosinófilos causando eosinofilia (Patel *et al.*, 2009)

Otra respuesta importante que ha sido estudiada durante la triquinosis, es la Th17, que estudios en modelos de triquinelosis murina se ha descrito esta asociada a la expulsión de parásitos (Afzali *et al.*, 2009). Haciendo especial hincapié en la inmunidad intestinal, la IL-17 controla la hipercontractilidad pero poco se conoce por la invasión del músculo esquelético en la migración de larvas. Luego de 10 DPI, se observa eosinofilia en sangre, que es una respuesta típica de infecciones causadas por nematodos. En el caso de los pacientes con triquinelosis, se puede alcanzar un valor de 8,000 células por microlitro (Bruschi y Murrell, 2002).

A nivel tisular los eosinófilos se concentran alrededor de la célula nodriza y de acuerdo a la eosinofilia que caracteriza la enfermedad se ha propuesto que el infiltrado celular que rodea a la célula nodriza básicamente se compone de eosinófilos. Sin embargo los datos de este trabajo demuestran que durante la formación del infiltrado celular la proporción de eosinófilos no es constante, ni es el principal componente, concordando a lo enunciado por de la Rosa (2012), sino que a lo largo de la formación del infiltrado se constituye como una población de células dinámicas. La presencia de eosinófilos se encontró a partir del día 16 PI. Durante toda la cinética, en la figura 19 se observaron 4 picos y 3 valles, en donde predominan picos máximos los días 21 y 27 PI, debido a que el sistema inmune promueve su producción para defensa del hospedador, posteriormente se observa un descenso considerable (Grove *et al.*, 1977), el cual vuelve a subir el día 26 PI, bajando nuevamente en el día 32 PI, aumentando el día 34 PI, volviendo a disminuir, los días 35 y 36 PI, y finalmente hay un aumento el día 37 para bajar los días 38 y 39 PI. Este comportamiento sugiere una reducción de eosinófilos en el área de inflamación alrededor de la célula nodriza (Grove *et al.*, 1977). El descenso de eosinófilos a partir



del día 21 PI probablemente se deba a que los eosinófilos al rodear a la LM degranulan y liberan peróxido de hidrógeno, el cual como se sabe es nocivo tanto para los helmintos como para el tejido del hospedador, provocando así una toxicidad hacia este último (H. Isabel 1999), y por lo tanto la disminución de eosinófilos, además al no haber presencia de arginina (principal componente de la PBM) cuyo colorante (eritrosina B) es selectivo a esta y los eosinófilos dejan de ser visibles (Benítez *et al.*, 1987) por la degranulación que se presume ocurre, observándose los valles.

Sin embargo, un estudio recientemente demostró que los eosinófilos favorecen el crecimiento y la sobrevivencia del parásito *Trichinella spiralis*, ya que en cepas de ratones en los que el linaje de eosinófilos se abatió, las larvas musculares se murieron (Fabre *et al.*, 2009).

Los resultados de este estudio demuestran que el infiltrado celular y penetración de la LRN son eventos simultáneos, lo cual es evidente a partir del día 16 PI. En cuanto a los eosinófilos se observó una tendencia multimodal, donde predomina un bimodal, alcanzando puntos máximos los días 21 y 27 PI. Futuras investigaciones deben encausarse a utilizar la tinción tricrómica de Masson, para identificar la cinética de aparición de colágena, así como incrementar los días de estudio y muestrear determinados días con un mayor número de ratones.

La técnica de tinción empleada constituye un método eficaz y confiable para este trabajo, lo que permitió la identificación específica de eosinófilos. Los mecanismos químicos exactos de la eritrosina b aun no están establecidos, pero este método es un colorante selectivo, que se une a los gránulos de eosinófilos, específicamente a la proteína básica mayor (PBM), la cual es un polipéptido policatiónico con un alto contenido en arginina (Benítez, *et al.*, 1987).



9. CONCLUSIONES

- La tinción de Giemsa demostró ser apropiada para observar el crecimiento lineal de la larva muscular.
- La aparición del infiltrado celular y el desarrollo del complejo CN-LM son eventos simultáneos, lo cual es evidente en las cinéticas pictográficas a partir del día 16 PI.
- La tinción de eritrosina B es una técnica adecuada para teñir los eosinófilos, los cuales mostraron una tendencia multimodal, predominando un bimodal con puntos máximos los días 21 y 27 PI.



10. BIBLIOGRAFÍA

1. Afzali B., Mitchell P., Lechler Rl., John S., Lombardi G. 2009. Translational Mini-Review Series on Th17 Cells: Induction of interleukin-17 production by regulatory T cells. *Clinical and Experimental Immunology*. 159: 120-130.
2. Anthony R., Rutitzky L., Urban J., Stadecker M., Gause W. 2007. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol*.7(12): 975-987.
3. Arribas B, Siles M, Bólas A.R. Martínez Fernández, 1993. Randomly y amplified DNA polymorphism within *Trichinella* species and isolates. En Proceedings of the Eighth International Conference on Trichinellosis.
4. Atlas Histología Vegetal y Animal, Técnicas Histológicas, 2011. Disponible en: <http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/1-proceso.php>
5. Bacha William J., Bacha Lidia M., 2001. Atlas color de Histología Veterinaria 2ª Edición, InterMedica, Buenos Aires Argentina.
6. Beiting D., Gagliardo L., Hesse M., Bliss S., Mexkill D., Aplpleton J. 2007. Coordinated control of immunity to muscle stage *Trichinella spiralis* by IL-10, regulatory T cells, and TGF- β . *The Journal of Immunology*.; 178: 1039-1047.
7. Benenson Abrams S. 1990. Trichinellosis. Control of communicable diseases in man. Apha, editor. 15th ed. Washington, D.C., p. 446-448.
8. Benítez B.L., Pérez A.L. and Freyre H.R. 1987. Tinción histoquímica para la proteína básica mayor mediante eritrosina B alcalina, en granulocitos eosinófilos y espermatozoides. *Archivos de investigación médica, México* 18:213.
9. Bi Y., Lui G., Yang R. 2010. Reciprocal modulation between TH17 and other helper T cell lineages. *Journal of Cellular Physiology*.
10. Bruschi F y Murrell D,. 2002 .New aspects of human triquinelosis: the impact of new *Trichinella* species. *Postgrad Med J*.78 pp.15-22.
11. Bruschi F., 2004. Focus on immunology of trichinellosis. *Medicinal Chemistry Reviews*, 1(2):1-7
12. Bruschi F., Marucci G., Pozio E., Masetti M. 2009 Evaluation of inflammatory responses against muscle larvae of different *Trichinella* species by an image analysis system. *Vet Parasitol*. 23;159(3-4):258-62.
13. Bruschi F, Chiumiento L, 2011. *Trichinella* inflammatory myopathy: host or parasite strategy? *Parasites & Vectors*, 4:42



14. Burke R., Masuoka P. and Murrell D. 2008. Swine Trichinella Infection and Geographic Information System Tools. *Emerging Infectious Diseases*. 14(7): 1109-1111.
15. Camet, Jean Dupouy, Kociecka, Wanda, Bruschi, Fabrizio, Fernandez, Francisco Bolas y Pozio, Edoardo. 2002. Opinion on the diagnosis and treatment of human trichinellosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*,3(8):1117-1130.
16. Capo Virginia y Despommier, Dickson D. 1996. Clinical Aspects of Infection with *Trichinella* spp. *Clinical Microbiology Reviews*,9(1):47-54.
17. Capo Virginia, Despommier, Dickson D, Polvere RI. 1998. *Trichinella spiralis*: vascular endotelial growth factor is p-regulated within the nurse cell during the early phase of its formation. *J Parasitol*.84(2):209-14.
18. Caraballo Luis y Zakzuk Josefina, 2012. Consideraciones sobre la evolución de la respuesta inmunitaria Th2 y su posibles relaciones con parasitosis y alergia, *Biomédica*:32, 145 -157.
19. Chavéz Guajardo E, Saldivar Elias S, Muñoz Escobedo J, Moreno García M. Trichinellosis una zoonosis vigente. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET* 2006; 3(5):1-19.
20. Cheng Jin Du and Da Wen Sun. 2004. Recent developments in the applications of image processing techniques for food quality evaluation. *Trends in Food Science & Technology* 15 (5) 230–249.
21. Chuvieco E. 1990, “Fundamentos de Teledetección Espacial; Ediciones Rialp, S.A; Madrid, España, 45p.
22. De la Rosa J. 2000. Zoonosis: Manual de procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. México. Ed. Comunicación gráfica y representaciones PJ S.A. de C.V. pp 122.
23. De la Rosa Jorge Luis y Gómez Alberto. *Trichinella* y triquinosis. 2004. *Parasitología médica de las moléculas a la enfermedad*. Ed. Mc Graw Hill. México. p. 219-225.
24. De la Rosa Jorge Luis, Rafael Campos Rodríguez, Víctor Rivera Aguilar, Alejandro Escobar Gutiérrez, Ángel MiliarGarcía, 2012. Comparative effects of levamisole, Staphylococcus, and Freund's adjuvant on rat immunization with excretory and secretory antigens of *Trichinella spiralis* muscle larvae. Springer,
25. Despommier Dickson D. y Muller Miklos. 1976. The Stichosome and Its Secretion Granules in the Mature Muscle Larva of *Trichinella spiralis*. *The Journal of Parasitology*,62(5):775-785.



26. Despommier D.D., Gwadz W. R., Hotez J. P., Knirsch A. Ch. 2005. Parasitic Diseases: Chapter V, The Nematodes: *Trichinella spiralis*. Apple Trees Production, L.L.C. 5Th edition. New York. pp: 135-142.
27. Despommier D.D., 1998. How does *Trichinella spiralis* make itself at home?. *Parasitology Today*, 14(8):318- 323
28. Despommier DD., Laccetti A. 1981. *Trichinella spiralis* Partial Characterization of antigens isolated by immune affinity chromatography from the large- particle fraction of the muscle larvae. *Journal. Parasitol.* 67: 3. 332-335
29. Dixon H., Blanchard C., deSchoolmeester M., Yuill N., Christie J., Rothenberg M., Else K. 2006. The role of Th2 cytokines, chemokines and parasite products in eosinophi recruitment to the gastrointestinal mucosa during helminth infection. *Eur. J. Immunol.*36: 1753-1763.
30. Du C. J. y Sun D. W. 2004. Recent developments in the applications of image processing techniques for food quality evaluation. *Trends in food Science and Technology* 15:230-249.
31. Dupouy Camet J. 2000. Trichinellosis: a worldwide zoonosis. *Veterinary Parasitology.* 93: 191 200
32. Estados Unidos Mexicanos-Secretaría de salud. 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-1994, Para la Vigilancia Epidemiológica.
33. Estados Unidos Mexicanos. 1999. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999; Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
34. Estados Unidos Mexicanos. 2004. Norma Oficial Mexicana NOM-194-SSA1-2004. Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias.
35. Fu Y., Wang W., Tong J., Pan Q., Long Y., Qian W., Hou X. 2009. Th17:A New Participant in Gut Dysfunction in Mice Infected with *Trichinella spiralis*. *Mediators of Imflamation.*517052.
36. Fabre Valeria., Beiting P. Daniel., Bliss K. Susan,. Gebreselassie G. Nebiat., Gagliardo F. Lucille., Lee A. Nancy., Lee J. James. And Appleton A. Judith. 2009. Eosinophil deficiency compromisos parasite survival in chronic nematodo infection. *The jornaul of Immunology.* 182:1577-1583.
37. Fabrizo Bruschi y Lorena Chiumiento, *Trichinella* inflammatory myopathy: host or parasite strategy? *Parasites y Vectors* 2011, 4:42
38. Figueroa Blanca., Aguilar Rosa., Garfias., Bautista Ramón Carlos., Rojas Julia., Nova., De Rodríguez M. Enrique, Ixta Olga & Gómez Federico Martínez. 2000.



- Experimental Swine Trichinellosis: Use of Dot-ELISA and Western Blot with Excretion/Secretion Antigens (ES) from Infective Larvae to Detect Anti-Trichinella spiralis Antibodies. *Revista Latinoamericana de Microbiología*,42:57-62.
39. Gaviño. T. G., Juárez L. C., Figueroa. T. H., 2000. Técnicas biológicas. Selectas de laboratorio y de campo. Editorial LIMUSA, México, D.F.
40. Gamble HR., Graham CE. 1984. A monoclonal antibody-purified antigen for the immunodiagnosis of trichinosis. *Am J Vet Res.* 45: 67-73.
41. Gamble H.R., Bessonov A., Cuperlovic K., Gajadhar A.A., van Knapen F., Nočckler K., Schenone H., Zhu X., 2000. Recommendations on methods for the control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption. *Vet. Parasitol.* 93, 393–408.
42. Garate T., Albarrán E., Bolsa-Fernández F., Martínez-Fernández A. R. Parkhouse R. M. E. 1991. DNA polymorphisms within Spanish *Trichinella* isolates. *Parasitology Research.* 7: 602-605.
43. Gold A.M., Despommier D.D. and S.W. Buck. 1990. Partial characterization of two antigens secreted by L1 larvae of *Trichinella spiralis*. *Molecular Biochemistry Parasitology*, 41(2):187-96.
44. Grove David I., Mahmoud Adel A. F., Kenneth H S. Warren. 1977. Eosinophils and resistance to *Trichinella spiralis*. *The Rockefeller University Press* vol. 145 no. 3: 755-759
45. Gottstein B., Pozio E. and Nöckler K. 2009. Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control of Trichinellosis. *Clin Microbiology Rev.* jan; 22(1):127-145. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr19/es/index.html>.
46. Jiménez Cardoso E., CaballeroGarcía M., UribeGutiérrez G., TrejoHernández E. and GayJiménez F. 2005. Frequency of *Trichinella spiralis* in blood and muscles of hogs from two slaughter houses (industrial and rural) in the State of Mexico, Mexico. *Vet Méx.* 36(3):269-278.
47. Kociecka Wanda. 2000. Trichinellosis: human disease, diagnosis and treatment. *Vet Parasitol.* 93: 365-383.
48. Krauss H., Weber A., Appel M., Enders B., Isenberg HD., Schiefer HG., Slenczka W., Graevenitz AV., Zahner H. 2003. Zoonoses Infectious Diseases Transmissible from Animals to Humans. Third Edition, American Society for Microbiology: 377-382.
49. Liciardi M., Marucci G., Addis G., Ludovisi A., Gomez Morales MA., Deiana B., Cabaj W., Pozio E. 2009. *Trichinella britovi* and *Trichinella spiralis* mixed infection in a horse from Poland. *Veterinary parasitology.* 161 (3-4): 345-348.



50. Ljungstrom., Hammarstrom L., Kociecka W., Smith C. I. E. 1988. The sequential appearance of IgG Subclasses and IgE during the course of *Trichinella spiralis* infection. *Journal of Experimental Immunology*, 74:230-235.
51. Lloyd J. R. 2000. Triquinelosis: Cátedra de Invertebrados. Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue, Buenos Aires, Argentina. Disponible en <http://www.uncoma.edu.ar>.
52. Luna Sánchez Sergio H., Sánchez Rodríguez. 2006. Triquinelosis Humana .Archivos de Medicina, año, vol. 2, número 004 .Asociación Española de Médicos Internos Residentes Madrid, España.
53. Marti H. P., Murrell K. D. 1986. *Trichinella spiralis*: antifecundity and antinewborn larvae immunity in swine. *Experimental Parasitology*, 62(3):370-375.
54. Martínez R. 1998. Situación de la triquinosis en Chile Escuela de Salud Pública en el Departamento de Epidemiología, Ministerio de Salud. <http://epi.minsal.cl/epi/html/public/triauinosis.htm>.
55. Martínez Pantaleón., O. B., Viguera Rendon A., Carvajal Gutiérrez A. M., Flores Pérez A., Abraham Jalil A. 1986. Triquinosis: Boletín Médico, Hospital Infantil de México. 43: 181-183.
56. Mc Vay SC., Tsung A., Appleton J. 1998. Participation of Parasite Surface Glycoproteins in antibody Mediated Protection of epithelial cells against *Trichinella spiralis*. *Infection and Immunity*.66:5. 1941- 1945.
57. Mendoza F., Dejmek P., y Agukera J. 2007. Colour and image texture analysis in classification of commercial potato chips. *Food Research International*, 40; 1146-1154.
58. Meslin X. F., Stohr K., Heymann D. 2000. Public health implications of emerging zoonoses. *Rev. sci. Off. Int. Epiz.* 19: 310-317.
59. Monroy H., FloresTrujillo M., Benítez E., Arriaga C. 2000. Swine trichinellosis in slaughterhouses of the metropolitan area of Toluca. *Parasite*. 8:S249-S251.
60. Moreno García Alejandra., García Mayorga Elda., Reveles Hernández Gabriela & Muñoz Escobedo Jesús. 2003. Características de *T. spiralis* en fase intestinal en modelo murino. *Revista Virtual Visión Veterinaria*, 3(1).
61. Nöckler K, Reckinger S, Broglia A, Mayer-Scholl A, Bah P. Evaluation of a Western Blot and ELISA for the detection of anti-*Trichinella*-IgG in pig sera. *Veterinary Parasitology* 2009; 163: 341–347
62. Organización Mundial de la Salud. 2006. Control de las enfermedades zoonóticas desatendidas: desafíos y camino a seguir. Disponible en http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_01_Zoonoses_Feb06_sp.pdf.



63. Organización Mundial de la Salud. 2007. Ginebra. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr19/es/index.html>.
64. Ortega Pierres G., Yépez Mulia L., Homan W., Gamble H. R., Lim P. L., Takahashi Y., Wassom D. L., Appleton J. A. 1996. Workshop on detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: a platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. *Parasite Immunology*, 18:273-284
65. Ortega Pierres M. G., Arriaga C., Yépez Mulia L. 2000. Epydemiology of trichinellosis in México, Central and South America. *Veterinary Parasitology*. 93: 201-225.
66. Owen R. 1835. Description of a microscopic entozoan infesting the muscle of the human body. *Trans. Zool. Soc* ,1: 315-324.
67. Patel N., Kreider T., Urban J., Gause W. 2009. Characterization of effector mechanisms at the host:parasite interface during the immune response to tissue-dwelling intestinal nematode parasites. *Int J Parasitol*.39(1): 13-21.
68. Pedreschi F., Mery D., Mendoza F., y Aguilera, J. 2004, Classification of potato chips using pattern recognition. *Journal of Food Science*, 69 (6): E1-E5
69. Pérez Pérez José Manuel, 2008. Técnicas de colecta y tinción de parásitos, Práctica 3 Laboratorio de Microbiología, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/15558712/Tecnicas-de-colecta-y-tincion-de-parasitos-Microbiologia-II>.
70. Pozio E., La Rosa G., Murrell K D. and Lichtenfels J R . 1992. Taxonomic revision of the genus *Trichinella*. *J. parasitol*. Vol 78. No4. 654-659.
71. Pozio E. 2000. Factors affecting the flor among domestic, synanthropic end sylvatic cycles of trichinella. *Veterinary Parasitology*. 93: 241-262.
72. Pozio E., Murrell KD. 2006. Systematics and Epidemiology of *Trichinella*. *Advances in Parasitology*. 63:367-439.
73. Quiroz, R. H. 1999. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Ed. Uteha. México pp: 534-538.
74. Ramírez Melgar C ., Gómez Priego A ., De la Rosa JL . 2007, Application of Giemsa stain for easy detection of *Trichinella spiralis* muscle larvae.
75. Ribicich M. M., Gamble H. R., Rosa A., Bolpe J., Franco A. 2005. Trichinellosis in Argentina: an historical review. *Vet Parasitol*. 13:137-42.
76. Ross Michael H., Wojciech Paulina. 2008. Histología, Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular, 5ª Edición, Editorial Médica Panamericana, China.



77. Rosenthal Philip J. y Goldsmith Robert S. 2005. Farmacología clínica de los antihelmínticos. En: Moderno, EM, editor. Farmacología básica y clínica. 9 ed. México, p. 873-884.
78. Silberstein D. S., Despommier D.D., 1984. Antigens from *Trichinella spiralis* that induce a protective response in the mouse. *Journal of Immunology*, 32(2):898-904
79. Vignau María Laura. 2004. Triquinosis. Buenos Aires, Argentina. Disponible en: <http://www.faba.org.ar/fabainforma/385/acta00.htm>.
80. William M. S., Margo J. P., Kocan A. A. 2001. Parasitic diseases of wild mammals. Ed. Library of Congress Cataloging in Publication Data. Iowa State University Press, United States of America. pp: 380-396.
81. Yang J., Gu Y., Yang Y., Wei J., Wang S., Cui S., Pan J., Li Q., Zhu X. 2010. *Trichinella spiralis*: immune response and protective immunity elicited by recombinant paramyosin formulated with different adjuvants. *Experimental Parasitology*. 124: 403-408.
82. Zavala T., Sánchez Vega J., Ruiz Sánchez D., Calderón Romero L., García Yañez Y., Alonso J., Martínez Chacón J., Rivas C. 2004. Estado actual de nuestros conocimientos sobre trichinellosis en la república mexicana, reporte de nuevas localidades infectadas. *Rev Fac Med UNAM*; 74(3):96-100.