



7
2 Ejm

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLAN U.N.A.M.

**ESTUDIO INMUNOLOGICO PRELIMINAR DE
LOS ANTIGENOS OBTENIDOS DE UN
EXTRACTO TOTAL SALINO DE LARVAS DE
Trichinella spiralis**

Tesis Profesional

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a n

**MA. TERESA CASTILLO ACOSTA
ROSALBA LUCINA TAVARES MUÑOZ**



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.

I N D I C E

	pag.
INDICE	1
LISTA DE FIGURAS, TABLAS Y GRAFICAS.....	3
RESUMEN	5
INTRODUCCION.....	6
-Características del Parásito.....	8
-Ciclo Biológico.....	12
-Sintomatología y Patogenia de la Enfermedad.....	15
-Diagnóstico.....	16
-Tratamiento.....	17
-Inmunidad a <u>Trichinella spiralis</u>	18
-Antígenos de <u>Trichinella spiralis</u>	23
-Respuesta Inmune a la Infección.....	25
-Transferencia de la Inmunidad.....	27
-Supresión de la Respuesta Inmune.....	29
OBJETIVOS.....	33
MATERIAL Y METODOS.....	34
-Obtención del Parásito.....	34
-Obtención de Antígenos de Larvas de <u>Trichinella spiralis</u>	37
-Determinación de Proteínas de los Antígenos de Larvas de <u>Trichinella spiralis</u>	39
-Determinación de Carbohidratos de los Antígenos de Larvas de <u>Trichinella spiralis</u>	42
-Fraccionación Cromatográfica.....	42
-Obtención de Anticuerpos Anti- <u>Trichinella spiralis</u>	45

-Electroforesis de Proteínas.....	45
-Cuantificación de Inmunoglobulinas.....	46
RESULTADOS.....	56
-Obtención del Parásito.....	56
-Obtención de Antígenos de Larvas de <u>Trichinella spiralis</u> y Naturaliza Química.....	56
-Fraccionación Cromatográfica.....	58
-Obtención de Anticuerpos anti- <u>Trichinella spiralis</u>	61
-Cuantificación de Proteínas séricas de ratas infectadas me- diante electroforesis en Acetato de Celulosa.....	61
-Cuantificación de Inmunoglobulinas.....	68
DISCUSION.....	71
CONCLUSIONES.....	75a
BIBLIOGRAFIA.....	76

	pag.
Tabla No. 9 Cantidad de Inmunoglobulinas de la clase IgA en el Suero Hiperimmune.....	63
Tabla No.10 Cantidad de Inmunoglobulias de la clase Ig M en el suero hiperimmune.....	64
GráficaNo. 7 Distribución Cromatográfica del Antígeno Sobre- nadante de Larvas de <u>Trichinella spiralis</u>	65
GráficaNo. 8 Distribución Cromatográfica del Antígeno Precipi- tado de Larvas de <u>Trichinella spiralis</u>	66
Tabla No.11 Resultados obtenidos para la detección de Anti- cuerpos Anti- <u>Trichinella spiralis</u>	67
GráficaNo. 9 Electroforesis de Proteínas Séricas de ratas Infectadas con <u>Trichinella spiralis</u>	69
GráficaNo.10 Electroforesis de Proteínas Séricas de Ratas no Infectadas con <u>Trichinella spiralis</u>	70

RESUMEN

El propósito de este trabajo fué el de realizar un estudio preliminar de los antígenos inmunológicamente importantes de larvas de Trichinella spiralis, para lo cual se obtuvieron las condiciones óptimas (gran cantidad de larvas con un alto porcentaje de viabilidad) con la finalidad de poder controlar la infección e inmunización de los animales a utilizar, así como la recolección del digerido larvario. Recuperándose a las 24 horas de digestión de carne infectada con jugo gástrico artificial la mayor cantidad de larvas con un 92 % de viabilidad. Mediante técnicas físicas como congelación-descongelación, homogenización y sonicación se obtuvo un extracto total salino de larvas, obteniéndose de este dos clases de antígenos denominados antígeno S (soluble) y antígeno P (precipitado), a los que se les determinó su composición química encontrándose un 84.56 % de proteínas y 15.43 % de carbohidratos para el antígeno S; - 68.18 % de proteínas y 31.81 % de carbohidratos para el antígeno P. Cada uno de estos antígenos se fraccionó por cromatografía en Sephadex G-200 obteniéndose más fracciones del antígeno soluble (12 fracciones) que del antígeno precipitado (8 fracciones). Por técnicas de precipitación en tubo capilar y doble difusión en agarosa, se probó que 5 de las fracciones obtenidas son inmunológicamente importantes, ya que dieron prueba positiva con ambas técnicas cuando se pusieron en contacto con un suero hiperinmune, al cual se le determinó por electroforesis en acetato de celulosa la elevación de la fracción gama globulina, determinándose la concentración de inmunoglobulinas por inmunodifusión.

INTRODUCCION

Dentro de las enfermedades que causan más problemas de salud pública en nuestro país, se encuentran las enfermedades parasitarias, las cuales se presentan muy frecuentemente tanto en adultos como en niños, - aunque no todas de ellas obtienen la misma atención y conocimiento de los médicos, ya que no son las principales causantes de muerte; entre estas enfermedades, se encuentra la Triquinosis, que es una enfermedad zoonótica transmitida al hombre principalmente por el cerdo y cuyo agente etiológico es el nemátodo Trichinella spiralis, encontrándose en forma de quistes en los músculos de mayor actividad del cerdo (14).

Resulta difícil establecer la fecha de aparición de esta enfermedad tanto en el hombre como en los animales. En la historia de las viejas civilizaciones ya se hablaba de epidemias ocasionadas por la ingestión de carne de cerdo. Se supone que la Trichinella spiralis y con ella la Triquinosis, llegó a Europa y América al comienzo del siglo XIX con los cerdos, que procedentes del sur de China e India fueron importados para cruzar y mejorar las razas del ganado europeo y americano.

En el año de 1821 Tiedman (19) observó en los músculos, tejido conjuntivo y paredes arteriales de un cadáver, concreciones calcáreas de 6 a 8 mm. de diámetro comparables con quistes de Trichinella spiralis. El estudio de estas concreciones por Gmelin, demostró que su composición era de 73 % de fosfato de calcio, 7 % de carbonato de calcio y 20 % de proteínas.

El descubrimiento clínico de la Triquinosis data del año de 1860 por F. A. Zenker (39), quién junto con Virchow encontró larvas en corazón

y fluido pericárdico en necropsias. Así esta enfermedad es una parasitosis común en los Estados Unidos de Norteamérica y Canadá. En México, esta helmintiasis se conoce desde el siglo pasado, encontrándose en un alto porcentaje en los diafragmas de cadáveres humanos de enfermos que fallecieron por causas diferentes a esta parasitosis, este hecho sugiere que la Trichinosis es una infección frecuente en nuestro país con un índice bajo de mortalidad (25). La elevada incidencia de Trichinosis que se descubren postmortem contrasta con el número reducido de casos clínicos de esta parasitosis que son reportados en la literatura médica nacional

En México, la Trichinosis clínicamente manifiesta puede ser menos rara de lo que se cree, lo cual generalmente se debe a causas como las siguientes:

1) Que algunos médicos no piensen en esta enfermedad o la confundan con otros padecimientos, incluso cuando ocurren todas las circunstancias que deberían favorecer su diagnóstico como ha sucedido en algunos brotes en nuestro país (23). Esto es lamentable, porque una persona con infección intensa puede morir o su probabilidad de supervivencia disminuye notablemente si no se hace el diagnóstico y, en consecuencia no se establece el tratamiento adecuado.

2) Que México es un país en que ciertas tradiciones culturales están muy difundidas y arraigadas, y de estas, las gastronómicas están entre las más vigorosas, ya que aún personas con un nivel socioeconómico y cultural elevado tienen a este respecto gustos especiales que aumentan en alto grado el peligro potencial de ciertos alimentos, como comer cruda la carne de cerdo y sus derivados, lo que en realidad parece mucho -

En el extremo anterior del nemátodo (ver figura No. 1) está la boca, que se halla provista de estructuras para fijarse en los tejidos y penetrar en ellos; dicha boca tiene un engrosamiento capsular y detrás de la abertura bucal está el esófago que tiene en el extremo distal un bulbo muscular provisto de fuertes válvulas capaces de cerrar la abertura que conduce al intestino medio.

La cavidad bucal y el esófago están revestidos por la cutícula ya mencionada anteriormente. Hay una glándula esofágica dorsal y dos subventrales cada una de ellas con un solo núcleo, las cuales probablemente intervienen en los procesos digestivos por la secreción de sustancias lípidicas. El intestino medio está revestido por una sola capa de células cilíndricas que absorben los alimentos. El recto está situado detrás del intestino medio y en conexión con el extremo posterior del mismo, está revestido por cutícula y se abre al exterior por el ano en la cloaca, la cual es al principio el receptor de los productos de desecho.

El sistema nervioso consta de troncos longitudinales con comisuras transversas. La comisura más importante es el anillo circunoesofágico que representa el centro nervioso. A los órganos importantes, tegumentos y sobre todo a las papilas sensoriales, llegan las terminaciones nerviosas.

Como todo nemátodo parásito del hombre la Trichinella spiralis tiene los sexos separados. El macho suele ser más pequeño que la hembra y están provistos en las regiones caudales de órganos especiales que facilitan la cópula. El aparato genital del macho está formado por un tubo delicado que desde su extremo interno (inserción) hasta su terminación se diferencia sucesivamente en testículo, vaso deferente, vesícula seminal y conducto eyaculador; este tubo está doblado sobre sí mismo una o más -

veces en la cavidad del cuerpo y se abre en la cloaca. El conducto eyaculador está cubierto de glándulas prostáticas y el aparato eyaculador accesorio está formado por 1 ó 2 espiculas.

El aparato genital de la hembra es sencillo, en su inserción en la pared del cuerpo hay un túbulo delicado y filiforme, el ovario, que generalmente aumenta de diámetro al acercarse al oviducto, el túbulo se diferencia sucesivamente en oviducto, receptáculo seminal, útero ovoeyector y vagina.

Los adultos machos llegan a medir de 1.4 a 1.6 mm. de longitud por 40 a 60 micras de diámetro, las hembras llegan a medir de 2.8 a 3.2 mm. de longitud por 90 a 130 micras de diámetro (14).

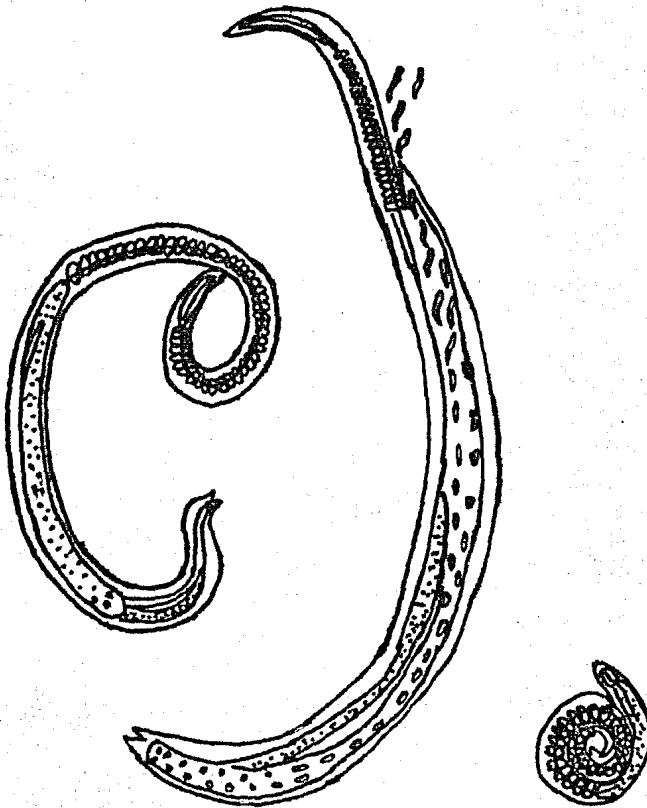
El metabolismo de los carbohidratos que lleva a cabo la Trichinella spiralis, procede esencialmente de la fermentación de los ácidos grasos, la cual resulta en una producción de ácido n-valérico. La oxidación de los lípidos bajo condiciones aeróbicas parece ser la fuente de energía principal para la motilidad de las larvas. Aunque se ha detectado la utilización anaeróbica de glucógeno como fuente de energía y la glucosa que utilizan dichos parásitos se metaboliza a lactato siguiendo la vía de Embden-Meyerhoff.

Algunos de los componentes importantes de la Trichinella spiralis son los citocromos a³, b, c, así como enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos, presencia de hemoglobina, RNA y DNA (20).

La larva muscular madura posee una estructura denominada esticocoma, que es un órgano que consiste de una sola pieza de aproximadamente 45 a 55 esticocitos, tiene una forma discoide la cual se localiza en la mitad anterior del cuerpo de la larva. La función del esticocoma en la vida del parásito no está completamente conocida, sin embargo se sabe que

FIGURA No. 1

TRICHINELLA SPIRALIS



ADULTOS

LARVA ENQUISTADA

MACHO

HEMERA

los esticocitos contienen antígenos que reaccionan con sueros de huéspedes inmunes. Estos antígenos del esticocito pueden estar contenidos en los gránulos secretorios alfa y beta, ya que se ha demostrado que estos dos tipos de gránulos difieren en su morfología y densidad de equilibrio en un gradiente de sacarosa (8). Se ha demostrado que cada uno de estos contiene antígenos que son idénticos a los productos de excreción-secreción de la larva muscular madura.

El esticosoma es un órgano que está presente en todos los estados larvarios y adultos de los nemátodos que pertenecen a la superfamilia Trichuroidea. El del adulto comprende aproximadamente una quinta parte de la longitud del cuerpo, mientras que la larva muscular madura llena por entero la cara anterior del gusano. Se cree que el esticocito tiene una función glandular secretoria, secretando productos cuya naturaleza es parcialmente conocida incluyendo proteínas con un alto peso molecular mayor de 20 000 Dts (9).

Ciclo biológico.— El hombre adquiere la Triquinosis por el consumo de carne cruda o mal cocida de cerdos infectados con Trichinella spiralis, la cual contiene a dichos parásitos en su etapa larvaria enquistados. Una vez que se consume la carne, los quistes son liberados del tejido muscular en el estómago, algunas larvas se desenquistan por acción del jugo gástrico, liberándose la mayor parte de ellas en el duodeno, empezando en este su desarrollo. Algunas larvas se eliminan con las heces en estado viable e infectante en trozos de carne no digerida; los animales que los ingieren se infectan de la misma manera que si hubiesen comido la carne triquinosa.

El desarrollo del parásito comprende tres períodos críticos para el huésped que son : 1) Incubación, 2) Migración y 3) Enquistamiento.

1) Período de Incubación.— Este período comienza después de la ingestión y liberación de las larvas enquistadas, estas pasan al duodeno — (fase entérica) de donde penetran al epitelio (fase parenteral). En este primer estadio las larvas mudan 4 veces dentro de las 36 horas y se transforman en un adulto dentro del epitelio en que se encuentran. Una vez convertidas en adultos se aparean y depositan las larvas recién nacidas dentro de este, lo cual ocurre 5 ó 6 días después de la infección. Durante este período la actividad biológica del parásito es dirigida hacia tres metas principales que son : a) crecimiento. b) desarrollo y c) reproducción.

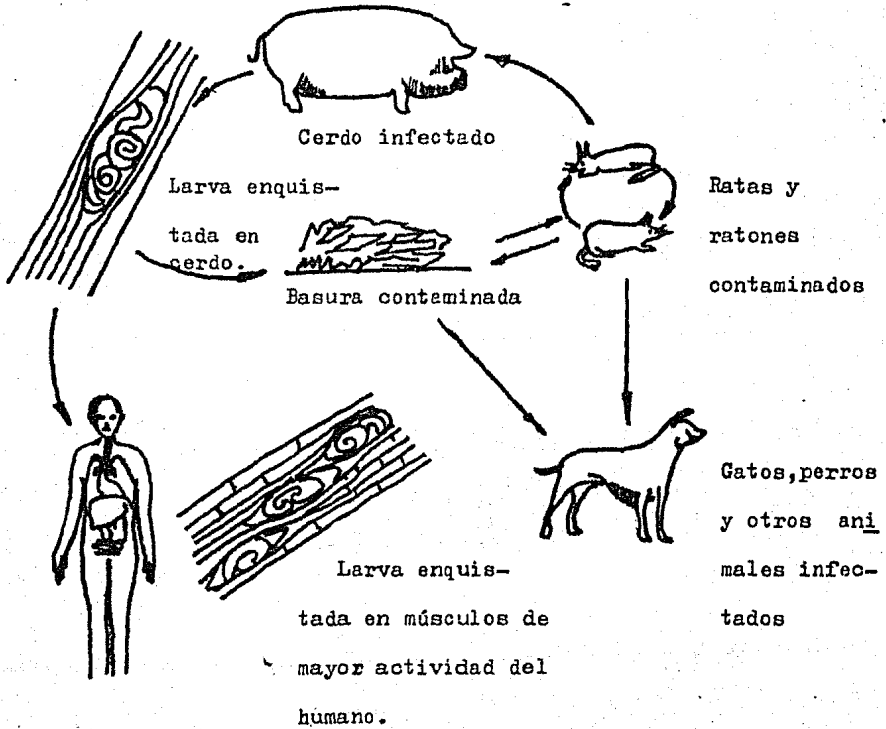
2) Período de Migración.— En este período aproximadamente 70 % de las larvas recién nacidas migran a partir del epitelio duodenal al músculo esquelético por medio del sistema circulatorio sanguíneo linfático, el otro 30 % migra por medio del sistema circulatorio portal-hepático al corazón o por medio de la cavidad abdominal y/o fluidos abdominales al músculo esquelético (17).

3) Período de Enquistamiento.— Este período comienza una vez que las larvas penetran en la fibras musculares y luego prosiguen su desarrollo. Al principio, las larvas están en los músculos paralelas a las fibras musculares, a medida que se enrollan el huésped comienza a formar — en torno a ella un quiste con pared de colágena que llega a completarse aproximadamente a los 3 meses después de la infección.

En el hombre las larvas enquistadas pueden permanecer viables — durante muchos años aunque generalmente se calcifican entre los 6 y 9 meses de haberse iniciado la infección.

FIGURA No. 2

CICLO BIOLÓGICO DE *Trichinella spiralis*



Sintomatología y Patogenia de la Enfermedad.- En el transcurso del período de incubación se produce gran irritación del epitelio duodenal y yeyunal y en todos los sitios de la pared intestinal en los que penetran las larvas.

Generalmente a las 24 horas del contacto o menos se originan los síntomas de vómito, diarrea o disentería tóxica, cólicos y sudores profusos, en algunos casos aparecen máculas de color escarlata o un exantema máculo-papular en la piel del tronco y extremidades. Los síntomas por parte del aparato respiratorio, que comienza del segundo al sexto día se mejan una infección bacteriana de este aparato, esto se observa en el 30 % de los pacientes en los que la Triquinosis produce síntomas clínicos

En el período de migración hay infiltración de los músculos, mialgias, dificultad de la respiración, masticación y deglución; algunas veces se observa parálisis espástica de los músculos, en particular de las extremidades. En algunas ocasiones, en este período aparece edema que se observa especialmente alrededor de los ojos, en las mejillas, sienes y manos, producido por la migración de las larvas a través de los vasos sanguíneos de estas regiones; es frecuente la linfadenopatía y los ganglios linfáticos son a veces muy dolorosos a la palpación y es típica la fiebre remitente hasta de 40 a 41 °C. En ocasiones las glándulas parótidas y sublinguales son el foco inflamatorio de mayor importancia, lo cual hace sospechar de una parotiditis. En algunos pacientes se encuentra hiperplasia de la médula ósea con un aumento de los mieloblastos, en sangre periférica se encuentra leucocitosis con predominio de eosinófilos que van de un 20 a 75 % (38).

El daño al corazón constituye una de las complicaciones más gra-

vas y relativamente comunes de la Triquinosis. En algunos casos, más bien raros se ha observado trombosis entérica, también puede presentarse encefalitis y meningitis, trastornos oculares, sordera y esclerosis amiotrófica (12,23).

Durante el período de enquistamiento se observa degeneración o tumefacción de las fibras musculares adyacentes, engrosamiento y alteraciones del sarcolema con hipertrofia, fragmentación de la fibras y depósito de la membrana capsular interna seguida de la formación de un quiste. Durante este período puede haber caquexia, edema tóxico o deshidratación extrema, también hay síntomas de afección del sistema nervioso a consecuencia de las lesiones que puede causar en el encéfalo, ya que puede alojarse en diversos tejidos incluso en el miocardio y encéfalo, así como en líquido cefalorraquídeo (1,24).

Diagnóstico.— El mejor diagnóstico para la detección de Triquinosis resulta de un alto grado de sospecha basado en los antecedentes clínicos observados (edema, fiebre, mialgias, etc.) combinado con determinaciones séricas seriadas y biopsia muscular (34).

Se ha encontrado que la técnica de micro-ELISA de dobles anticuerpos aplicada a Triquinosis experimental en ratas proporciona un buen medio para detectar el estado de infección por Trichinella spiralis, encontrándose un tiempo óptimo de sacrificio de 24 horas (15,32).

La prueba de floculación con bentonita generalmente es positiva 17 días después de la infección, los resultados negativos deben ser interpretados por los datos clínicos. La demostración de la larva enquistada es definitiva para saber si hay infección, sin embargo algunos pacientes pueden tener infección sin enfermedad clínica (27,28).

La prueba de floculación con bentonita con una fracción antigénica proteica soluble en ácido (antígeno de Melcher) y pruebas de fijación de complemento con un antígeno larvario crudo se ha reportado que dan resultados similares en 1331 sueros humanos, los resultados de las dos pruebas en 206 pacientes fueron comparados con observaciones hechas en casos clínicos y con otras pruebas de laboratorio, se observó una relación entre los descubrimientos serológicos y de la Triquinosis clínica (26).

Tratamiento.- El tratamiento de elección cuando se ha detectado la ingestión de carne infectada, es mediante la administración de mebendazol en dosis de 25 mg/kg. de peso corporal repartido en dos dosis.

La acción antihelmíntica del mebendazol contra larvas enquistadas de Trichinella spiralis se caracteriza por una posible colaboración del antihelmíntico con la defensa inmunitaria. La acción del mebendazol consiste en la alteración del estroma citoplasmático muscular que rodea a la larva convirtiéndola en un foco antigénico sobre el que se desencadena la defensa inmunitaria, a continuación del tratamiento surge un proceso rápido de hipersensibilidad celular que transforma cada quiste en un granuloma parasitario. El mebendazol altera la permeabilidad de la matriz quística, con lo cual pasan al exterior del quiste los antígenos funcionales larvarios y consecuentemente los anticuerpos anti-Trichinella spiralis circulantes.

Después del tratamiento se observan quistes rodeados de una cápsula con intensa degeneración basófila y fragmentación larvaria, infiltración inflamatoria intensa predominando linfocitos e histiocitos. El mebendazol es un fármaco muy eficaz ante los quistes de Trichinella spiralis.

La acción antihelmíntica contra larvas enquistadas es la conexión del sistema inmunitario dado; la depresión de la respuesta celular no anula el conjunto del fenómeno, solo lo retrasa produciendo la reacción celular la muerte del parásito, así como la muerte de las larvas por los anticuerpos circulantes y el complemento que penetran, actuando sobre la larva como un foco antigénico desnudo, produciéndose inmunidad celular que puede ocasionar un cuadro similar a un shock anafiláctico, por esta razón se utiliza prednisona antes y después del tratamiento con mebendazol, además de aliviar los síntomas del trauma debidos a la invasión de la larva en la mucosa intestinal en el estado inicial de la infección y aliviar el dolor muscular, edema y reacciones tóxicas. Así pues, la prednisona es capaz de modificar la respuesta inmunitaria pero no impide el efecto del mebendazol, solo lo retrasa (22).

Inmunidad a *Trichinella spiralis*.— Debido a que la evidencia clínica de inmunidad adquirida frecuentemente es equivocada en las infecciones parasitarias, se ha inducido la creencia de que los parásitos son pobremente inmunogénicos, no hay bases para este punto de vista ya que se han demostrado anticuerpos específicos por gran variedad de métodos para una amplia gama de infecciones parasitarias, observándose una correlación muy pobre con el estado inmune clínico, lo cual indica que muchos de los anticuerpos formados en respuesta a las infecciones parasitarias no protegen al huésped, este punto de vista está soportado por el hecho de que es difícil demostrar anticuerpos antiparasitarios protectivos por transferencia pasiva, sin embargo los anticuerpos antiparasitarios pueden ser demostrados *in vitro* en diversas infecciones parasitarias que inducen inmunidad clínica pobre. Como regla general por lo tanto, los parásitos sensibilizan efectivamente al sistema inmune del huésped y aún pueden

continuar sobreviviendo por grandes períodos, esto es explicado fácilmente considerando que los diversos parásitos utilizan mecanismos mediante los cuales evaden la respuesta inmune en contra de ellos.

La resistencia de los parásitos frecuentemente es atribuible a - inmunidad innata (natural), la cual usualmente es característica de especie y no es dependiente de la exposición previa al parásito. La inmunidad específica adquirida en las infecciones parasitarias ha sido muy discutida ya que la respuesta efectiva clínicamente es muy raro observar, pero hay abundante evidencia de que los parásitos animales son inmunogénicos y sensibles a las vías efectoras normales del huésped.

Muchas infecciones parasitarias inducen una respuesta inmune que produce resistencia a un desafío específico pero está asociado con persistencia del parásito en baja proporción, este tipo de respuesta es característica de Triquinosis.

La cantidad de inmunoglobulinas es considerablemente incrementada en muchas infecciones parasitarias, se ha hecho la sugerencia de que la síntesis de inmunoglobulinas específicas puede resultar de la estimulación de linfocitos por interacción de complejos Antígeno-Anticuerpo a través de receptores para la fracción C_3 del complemento en su membrana superficial.

En todas las enfermedades parasitarias se pueden demostrar anticuerpos específicos por gran variedad de técnicas, muchas de estas pruebas son útiles para el diagnóstico y estudios epidemiológicos de infecciones parasitarias, pero en general estas reacciones correlacionan poco con el estado inmune clínico lo cual indica que en adición a las inmunoglobulinas no específicas, las infecciones parasitarias estimulan la produc-

ción de anticuerpos específicos sin función protectora, tales anticuerpos pueden dirigirse contra serotipos del organismo presente en forma temprana en la infección contra antígenos séricos solubles o contra varios metabolitos y productos de degradación ausentes en la superficie del parásito intacto vivo y de este modo irrelevantes para su destrucción específica, ya que en general los parásitos sensibilizan al sistema inmune del huésped, su sobrevivencia depende de sus mecanismos de evasión (29).

Es claro que en las infecciones parasitarias como en las microbianas y virales, los mecanismos de defensa son muy dependientes de la naturaleza de los antígenos y anticuerpos involucrados; muy frecuentemente los anticuerpos son dirigidos contra antígenos inmunológicamente irrelevantes esto es, antígenos los cuales en combinación con anticuerpos no afectan el metabolismo normal o proliferación del parásito. Cuando estos antígenos son inmunodominantes puede ser posible que la respuesta total del huésped sea de anticuerpos completamente inefectivos contra el invasor y constituye un mecanismo de evasión de la respuesta inmune del huésped.

El curso de la inmunidad contra Trichinella spiralis comienza justo en el día cero de la infección, ya que los leucocitos en sangre periférica van aumentando ligeramente durante los primeros 10 días después de la infección, aumentando apreciablemente entre los días 10 y 12. Cuando ya ocurrió la expulsión de los gusanos adultos, finalmente va observándose un decremento (35).

Los anticuerpos producidos contra el adulto en ratas infectadas aparecen aproximadamente 15 días después de la infección y desaparecen 50 días después. Estos anticuerpos son detectados por pruebas con anti-

cuerpos fluorescentes detectándose microprecipitados en ano, vulva y boca del parásito (24).

Se ha encontrado que la expulsión del parásito adulto esta mediada directamente por inmunoglobulina A liberada en el sitio de desarrollo del parásito en la mucosa intestinal, contribuyendo con otros componentes de la respuesta inmune que son poco efectivos cuando actúan solos.

En la expulsión de Trichinella spiralis, las células T han sido consideradas primariamente células "Helper efectoras" encontrándose que la expulsión es T-dependiente además de ser mediada por anticuerpos IGA mencionados anteriormente (21). También se ha encontrado que los cambios inflamatorios desarrollados durante la infección son de igual manera T-dependientes.

Algunos resultados indican (31), que ratones infectados con Trichinella spiralis muestran una proliferación de linfoblastos en los nodos linfáticos mesentéricos, sabiendo que estas células se encuentran preferencialmente en el intestino delgado, teniendo posiblemente su principal contribución a la expulsión de los gusanos por la generación de cambios inflamatorios en la mucosa intestinal.

Especialmente en los días 5 y 7 de la infección hay una acumulación de leucocitos neutrófilos y eosinófilos en la mucosa intestinal cuando ocurre la migración de las larvas recién nacidas en el intestino (35).

Administrando suero de conejo anti-eosinófilos de ratón, a ratones que posteriormente se infectaron con Trichinella spiralis, se observó (16), que estos desarrollaban 2 veces más larvas musculares comparados con ratones control administrados con solución salina y con ratones administrados con el mismo número de larvas, pero sin suero antieosinófilos, lo cual nos indica la gran participación de estas células der--

tro de la inmundidad inespecífica que se desarrolla en la Triquinosis.

Se ha sugerido que los eosinófilos son un componente muy importante en la inflamación intestinal y que ésta es la responsable en gran parte de la expulsión de los gusanos del intestino, pero se ha encontrado también que los eosinófilos no son importantes en esta respuesta, ya que eliminándolos del infiltrado inflamatorio intestinal no alteran la expulsión de los gusanos adultos, pero sí parecen ser un factor muy importante en la resistencia a la fase sistémica de la infección; lo cual es debido probablemente a que los eosinófilos dificultan el paso del primer estado larvario de la mucosa intestinal al torrente sanguíneo o impiden el desarrollo de la larva madura en el músculo esquelético (16).

Los basófilos y los neutrófilos, al igual que los eosinófilos - tienen gran actividad contra el estado larvario, dicha respuesta muy probablemente depende de la liberación de productos solubles de los linfocitos (linfocinas) sensibilizados a antígenos anti-Trichinella spiralis - (50). Los linfocitos obtenidos de animales con Triquinosis cuando son expuestos a antígenos larvarios solubles de Trichinella spiralis secretan una linfocina estimuladora de la promoción de eosinófilos, que muy probablemente es la responsable de la migración de los eosinófilos a las principales áreas de migración observadas en Triquinosis como lo son: la mucosa intestinal donde residen los gusanos adultos y los músculos donde se encuentran las larvas (3,7).

La destrucción de las larvas recién nacidas por los eosinófilos muy probablemente es producida por el ácido hipocloroso (generado de peroxidasa de los eosinófilos), iones cloruro y peróxido de hidrógeno (generado por medio de sistemas enzimáticos como glucosa-glucosa oxidasa y xantina-xantina oxidasa) (5), ya que se ha encontrado experimentalmente

que a un pH de 5.5 el ácido hidrocioroso en presencia de iones cloruro y peróxido de hidrógeno reaccionan con la cutícula de las larvas destruyéndolas.

Aminas biogénicas que afectan a los gusanos adultos directamente producen cambios en la permeabilidad de la membrana y causan daño al parásito, induciendo a los anticuerpos anti-Trichinella spiralis a atacar al adulto (este fenómeno se ha denominado "Potenciación Patológica"). Estas aminas son producidas por la presencia de anticuerpos reagínicos y antígenos larvarios que ocasionan la degranulación de los basófilos, liberando así sus aminas que van a afectar en diferentes formas al parásito (28).

Los anticuerpos antilarvarios son principalmente del tipo IgG y aparecen aproximadamente 30 días después de la infección y llegan a un máximo en los días 40 a 60 disminuyendo apreciablemente después (31).

Antígenos de Trichinella spiralis. - Estudios sobre la composición antigénica de larvas de Trichinella spiralis han demostrado una gran cantidad de antígenos somáticos y metabólicos. Norman y Sadun (1959), Olson, Richards y Tvert (1960), Tanner y Gregory (1961), Tanner (1969), - han detectado al menos 16 componentes. La naturaleza y relevancia inmunológica de estos antígenos aún ha sido poco estudiada, ya que la mayoría de los estudios se han realizado con extractos crudos.

Gran número de antígenos han sido preparados de larvas de Trichinella spiralis y de adultos. La primera obtención del antígeno que se conoce data desde 1928, cuando Beckman empleó un antígeno soluble en solución salina ácida y la utilizó para una prueba de precipitación (32). Argente y Miller en 1928 realizaron un extracto con solución de Coca (0.7% de NaCl, 0.05% de NaHCO_3 y 0.04% de Tonel) y MacCoy y colaboradoras en

en 1933 utilizaron esta solución de Coca modificada con solución amortiguadora de fosfatos para la obtención de los antígenos. Melcher fué el primero en fraccionar la larva de Trichinella spiralis para utilizarla como antígeno en serología e Inmunología y en 1933 preparó un extracto de polisacáridos y lo fraccionó deslipidizando la larva en 5 antígenos proteicos (19). Su fracción soluble en ácido se ha encontrado muy adecuada para la prueba de floculación con bentonita como fué demostrado por Sadun y Norman (26).

Con la finalidad de preparar las fracciones antigénicas de Trichinella spiralis que inducen protección de las no protectivas, Despomier y Lacetti (10) fraccionaron un antígeno obtenido por homogenización, centrifugación diferencial y tratamiento con Tritón-X, utilizando solo la porción soluble de este antígeno. Este antígeno fué sometido a una cromatografía de inmunofinidad y los antígenos fueron eluidos de la columna con amortiguador de glicina, las fracciones obtenidas se inocularon en ratones junto con un adyuvante completo de Freund, encontrándose que se forman anticuerpos contra estas fracciones.

Perreudet-Padoux y Binaghi (29) obtuvieron fracciones antigénicas por cromatografía en DEAE-Celulosa a partir de un extracto obtenido por congelación descongelación de las larvas, una fracción obtenida la denominaron Antígeno A encontrando que es muy efectiva para la formación de anticuerpos reagínicos (detectados por reacciones de anafilaxia cutánea pasiva), pero la inmunización de animales con el antígeno A produce muy pocos anticuerpos precipitantes.

Los anticuerpos precipitantes en la Triquinosis son en su mayoría de la clase IgG, pocos son los animales que infectados con este parásito o inmunizados con extractos totales solubles o IgA purificada producen -

anticuerpos anti-IgA en suficientes cantidades para detectarse por técnicas de inmunoelectroforesis. Esto puede explicar el que no se encuentre actividad antigénica en fracciones obtenidas por cromatografía; esta razón también es válida para no ser detectados por inmunodifusión (34).

Respuesta inmunológica a la infección.— Se ha demostrado que una infección secundaria con Trichinella spiralis en ratas está asociada con la pérdida del 80 % de las larvas; la respuesta del huésped ocurre a los 15 minutos posteriores al contacto del parásito con la mucosa intestinal y no se asocia con infiltración celular inflamatoria ni con otras características de la infección primaria. 4 a 8 días después de la infección secundaria se ha observado un rechazo de los parásitos, presentándose cambios en los tejidos similares a los ocurridos durante una infección primaria (31).

En la infección primaria, la eliminación del estado entérico involucra una respuesta para la producción de la expulsión de los gusanos establecidos. El rechazo inmune de los parásitos en la infección secundaria involucra respuestas tempranas y tardías fisiológicamente o inmunológicamente diferentes.

En la expulsión de los parásitos adultos establecidos en la mucosa intestinal puede estar relacionada una infección mediada por inmunidad. Los factores que van a determinar la expulsión del gusano o que inhiben su penetración inicial en la mucosa, no son aún conocidos (31), pero se cree que la resistencia a la penetración del parásito puede estar mediada por cambios asociados con una reacción de hipersensibilidad inmediata que involucra inmunoglobulinas de la clase IgE o por una barrera protectora de IgA secretora en la superficie de la mucosa intestinal, esto a re

sultados han llevado a concluir que la resistencia adquirida es expresada como respuesta bifásica, y que la primera fase empieza aproximadamente 15 minutos después de la infección. Cada una de estas fases está mediada por mecanismos inmunes separados y cada una de ellas afecta los diferentes estados de desarrollo del parásito en forma diferente.

Parece ser que en las ratas un rechazo muy temprano del parásito es probablemente el componente más importante de la inmunidad a Trichinella spiralis, ya que se ha demostrado experimentalmente que la inmunidad en una infección secundaria es dirigida contra la fase entérica del parásito, expulsándose rápidamente una gran cantidad de ellos (7).

Linfocitos marcados radiativamente, nos muestran que los linfocitos B tienden a localizarse en la pared intestinal, pero es posible que esta población sea dependiente para su formación de la actividad "Helper" de células T activadas para promover la generación de células formadoras de anticuerpos. Se cree que la resistencia adquirida al parásito es mediada por anticuerpos de la clase IgA que son timo-dependientes.

Administrando intravenosamente larvas producidas in vitro (en 3 ocasiones) a ratones, James y col. (18), demostraron que la fase parental de las infecciones por Trichinella spiralis estimulan la resistencia contra el establecimiento del parásito en un 85 %, cuando se utilizaron larvas musculares administradas oralmente se obtuvo un 51 % de resistencia únicamente.

Por lo que se puede concluir que después de la infección primaria en ratas, estas son resistentes a una infección secundaria por Trichinella spiralis. Tres meses y medio después de una infección primaria se observa una pérdida de la respuesta inmune si las ratas son nuevamente infectadas.

Transferencia de Inmunidad.- El primer trabajo de transferencia de inmunidad pasiva ha demostrado que después de inocular suero hiperinmune, los animales de experimentación permanecen claramente protegidos - cuando se llevó a cabo un desafío con 2 000 larvas de Trichinella spiralis (19).

Immunizando conejos inoculándolos con 4 000 larvas de Trichinella spiralis homogenizadas en solución salina adsorbidas y precipitadas con hidróxido de aluminio, Dorin (17) reportó resistencia a infecciones posteriores en estos animales y Campbell en 1955 inoculó antígeno metabólico de dicho parásito en ratones, y demostró gran pérdida de los gusanos adultos comparando con ratones control. Skikhobaloba en 1953, inoculó un extracto salino de larvas de Trichinella spiralis en varias ocasiones - en un período de 10 días y utilizó también antígeno soluble en ácido y - después desafió a ratones con 2 000 larvas, al final del período de inmunización encontró muy baja cantidad de larvas enquistadas en los ratones inmunizados. Trabajando con ratas irradiadas Magath en 1955 (19), encontró que los animales no desarrollaban inmunidad adquirida.

Se ha demostrado la transferencia de inmunidad con suero de conejos infectados, inoculando éste en conejos normales no infectados, los - antisueros obtenidos dentro de los 50 días contienen anticuerpos anti-adulto que protegen parcialmente contra una reinfección por transferencia pasiva. Los anticuerpos anti-larva aparecen aproximadamente 30 días después de la infección llegando a un máximo en los 40 a 60 días disminuyendo después, estos anticuerpos no tienen actividad en transferencia pasiva únicamente producen precipitados orales in vitro (3 , 5), pero en ratas recién nacidas de madres inmunes infectadas con Trichinella spi-

ralis se han encontrado anticuerpos anti-Trichinella spiralis.

Linfocitos T y B de nódulos linfáticos mesentéricos de ratones infectados con Trichinella spiralis transfieren inmunidad a ratones normales, produciendo pérdida de la fecundidad en los adultos y una expulsión acelerada en el intestino (38). Tratando previamente a los animales con suero anti-Thy 1.2 se reduce severamente la actividad protectora de las células B, restaurando células T normales se recupera la capacidad de las células B para reducir la fecundidad de los gusanos adultos sin producir la expulsión de los parásitos, se ha sugerido, que las células T no actúan como células "Helper", pero están involucradas en la generación de cambios en el ambiente intestinal con disminución de la supervivencia del parásito (8).

Protegiendo ratas contra una infección por Trichinella spiralis inmunizándolas con células B o T obtenidas de ratas previamente inmunizadas, se ha medido el grado de infección por el número de larvas musculares y la expulsión de gusanos adultos en el intestino, se ha encontrado que la respuesta inmune es dirigida contra la fase entérica del parásito, los linfocitos B tienden a localizarse en la pared intestinal, esta población de células B es dependiente de la actividad "Helper" de las células T activadas, se cree que la resistencia adquirida al parásito es mediada por anticuerpos de la clase IgA que son timo-dependientes (38).

La respuesta del huésped que produce la expulsión de Trichinella spiralis del intestino, requiere de la actividad del linfocito T y anticuerpos activos, estando asociada además con una respuesta inflamatoria muy marcada. El análisis de la interdependencia de estos componentes y la expulsión de los gusanos que produce es difícil en animales intactos (ya

que la inducción de infecciones en tales animales es el resultado de manipulaciones, usando animales inmunológicamente incompetentes se tiene la posibilidad de restaurar selectivamente la respuesta e identificar a los componentes necesarios, utilizando animales inmunodeprimidos mediante irradiación (que afecta a los componentes celulares de la respuesta) inmediatamente antes de la infección, hay una profunda interferencia en la habilidad de los ratones para expulsar los gusanos, aún cuando son dados el día de la infección en ratones irradiados el día anterior ó 6 y 7 días después de la infección.

Aún cuando las células de nódulos linfáticos mesentéricos transfieren inmunidad en receptores intactos (21), la transferencia de células de médula ósea tampoco tiene efecto. La restauración de la inmunidad es efectiva inoculando células de médula ósea 10 días antes de la inoculación de células de nódulos linfáticos mesentéricos no actúan directamente, sino que cooperan con algún otro componente de la respuesta inmune del huésped (38).

Supresión de la Respuesta Inmune.— Se ha comprobado que en algunas infecciones parasitarias, la respuesta inmune es deprimida (3). Este fenómeno es de reciente detección y los mecanismos involucrados han sido estudiados ampliamente en algunos parásitos como Plasmodium malariae y Trypanosoma cruzi principalmente, pero aún queda mucho por entenderse respecto a este fenómeno.

Desde la mitad de la última década se ha generado la mayor cantidad de la información respecto a la inmunodepresión producida por Trichinella spiralis, sabiendo que las infecciones por este parásito interfieren en las respuestas inmunológicas (humoral y celular) de animales expa

rimentales, provocando un estado depresivo de dichas respuestas; este estado ha sido observado por una mejor retención de injertos de piel a ratones infectados; por una disminución en la producción de anticuerpos contra el virus de la encefalitis B jaronesa; por una supresión de las células de médula ósea de ratones para ser reconstituidas; por la disminución en la producción de anticuerpos específicos contra eritrocitos de carnero y sustancias antigénicas como polivinilpirrolidona (13); por una depresión de la respuesta a algunos agentes mitogénicos.

Se han sugerido diferentes mecanismos para explicar este fenómeno. Faubert y Tanner en 1971 (13) sugieren una competición antigénica basándose en la inoculación de suero normal de conejo. Barriga (2) indica que la competición por sí misma no explica la inhibición, ya que la inoculación de suero bovino no reproduce la depresión provocada por dosis similares de extracto del parásito en ninguna proporción. Se cree que la competición antigénica únicamente es una manifestación de un mecanismo más general de control de la respuesta inmune mediada por células supresoras. Lubiniecki (2), reportó alteraciones en el funcionamiento de los macrófagos en los animales infectados, aunque no detectó inmunosupresión.

Faubert y Tanner encontraron que el suero de animales infectados y extractos del parásito aglutinan y destruyen células de nodulos linfáticos de ratón in vitro, pero Barriga no encontró evidencia de citotoxicidad hacia células de bazo en experimentos in vivo. Este investigador reportó que la depresión humoral afecta al antígeno T-dependiente, pero no al antígeno T-independiente, lo cual indica la participación de las células T, aunque algunos autores han sido capaces de detectar inmunosupresión en animales infectados (2), otros han encontrado un incremento

en la resistencia a organismos no relacionados (6).

Es evidente que los mecanismos de inmunodificación no específica producidos por infecciones por Trichinella spiralis se han vuelto más confusos por la acumulación de información que no encaja, vista como lo ha sido hasta ahora.

Una infección por Trichinella spiralis afecta a la inmunidad no específica a diferentes niveles, estudiando las respuestas inmunes a antígenos no relacionados, durante el curso de una infección en ratones se han obtenido los siguientes resultados : Disminución transitoria de la IgM tres semanas después de la infección; disminución de la respuesta de la IgG seis semanas después de la infección. Una semana después de la infección, cuando el parásito se encuentra en el intestino, se ha demostrado que la respuesta inmune celular no específica se encuentra disminuida, lo cual ha sido medido mediante injertos. El tiempo en el que la respuesta está más disminuida coincide con el período de una fuerte inmunidad - mediada por células (3).

En triquinosis experimental, se ha encontrado una disminución de timocitos corticales, hay razones para creer que la inmunosupresión del timo es significativamente importante para la respuesta humoral de anticuerpos deprimidos

Células de bazo de ratones pretratados con extractos de Trichinella spiralis muestran una severa disminución de la respuesta a mitógenos como concanavalina A, fitohemaglutinina y lipopolisacáridos, cuando son comparados con ratones tratados con solución salina bajo las mismas condiciones (2).

El tratamiento con un extracto total de larvas del parásito causa

una disminución en el número de linfocitos T y una inhibición en la diferenciación de células B en el bazo. Las células T supresoras aparentemente juegan un papel importante en la inmunosupresión, pero no son las únicas involucradas en este fenómeno (13).

OBJETIVOS

En la actualidad queda mucho por estudiar y aclarar en lo que respecta al aspecto inmunológico de la infección por Trichinella spiralis y de otros parásitos, para poder encontrar los diferentes mecanismos por los cuales el parásito evade la respuesta inmune, así como la manera de aumentar la defensa del huésped, conociendo dichos mecanismos.

En base a los antecedentes anteriores se planteó el presente estudio con la finalidad de tener un conocimiento más amplio de las características inmunológicas de los antígenos de larvas de Trichinella spiralis como un estudio previo, para determinar posteriormente la inmunodepresión producida por algunos de estos antígenos, para lo cual planteamos los siguientes objetivos:

1.- obtención de las condiciones óptimas de digestión para lograr un mayor número de larvas con un alto porcentaje de viabilidad.

2.- Obtención de los antígenos inmunológicamente importantes de larvas de Trichinella spiralis.y estudio de su composición química.

3.- Separación cromatográfica y purificación de los antígenos obtenidos así como la obtención de anticuerpos en contra de ellos para demostrar su inmunogenicidad.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

-OBTENCION DEL PARASITO-

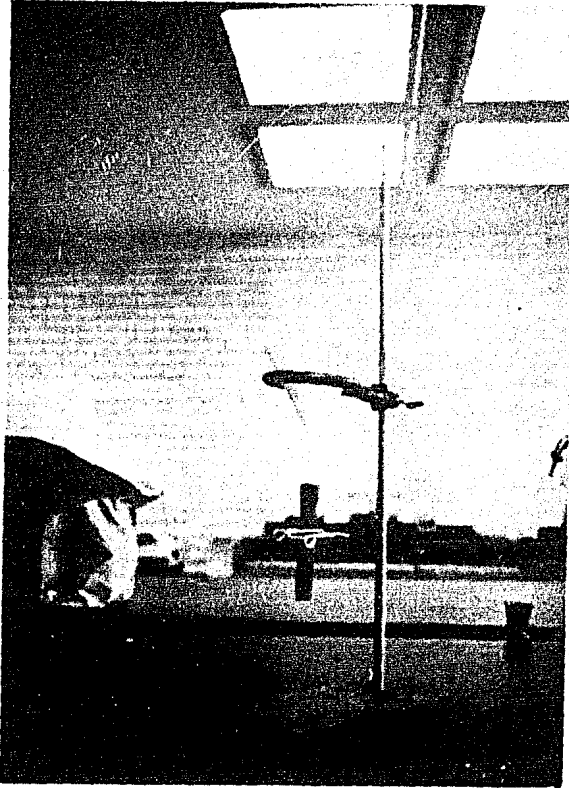
40 ratas blancas adultas de aproximadamente 150 g. de ambos sexos, se infectaron con aproximadamente 1000 larvas contenidas en carne fresca. El conteo de las larvas para dicha infección, se realizó mediante la digestión artificial de la carne infectada con dicho parásito (jugo gástrico artificial: 0.85 % de NaCl, 0.3 % de pepsina y 0.6 % de HCl) molida y homogenizada en un aparato de Baerman que se muestra en la figura No. 1. Pasadas 24 horas de digestión, el digerido de la carne se colectó y se determinó la viabilidad de las larvas en forma visual, por el movimiento de estas observadas en un microscópio invertido, así como por la refringencia que presentaban.

Después de coleccionar el digerido a este tiempo óptimo de viabilidad se tomaron alicuotas de 0.1 ml. del digerido para proceder al conteo estableciéndose de esta manera el número de larvas por gramo de carne. Todo este procedimiento se realizó 25 veces para hacer más representativo el resultado obtenido.

Una vez efectuado el conteo larvario, se les administró a cada rata por separado la cantidad de carne apropiada, de tal manera que fuesen infectadas con el número de larvas ya antes mencionado.

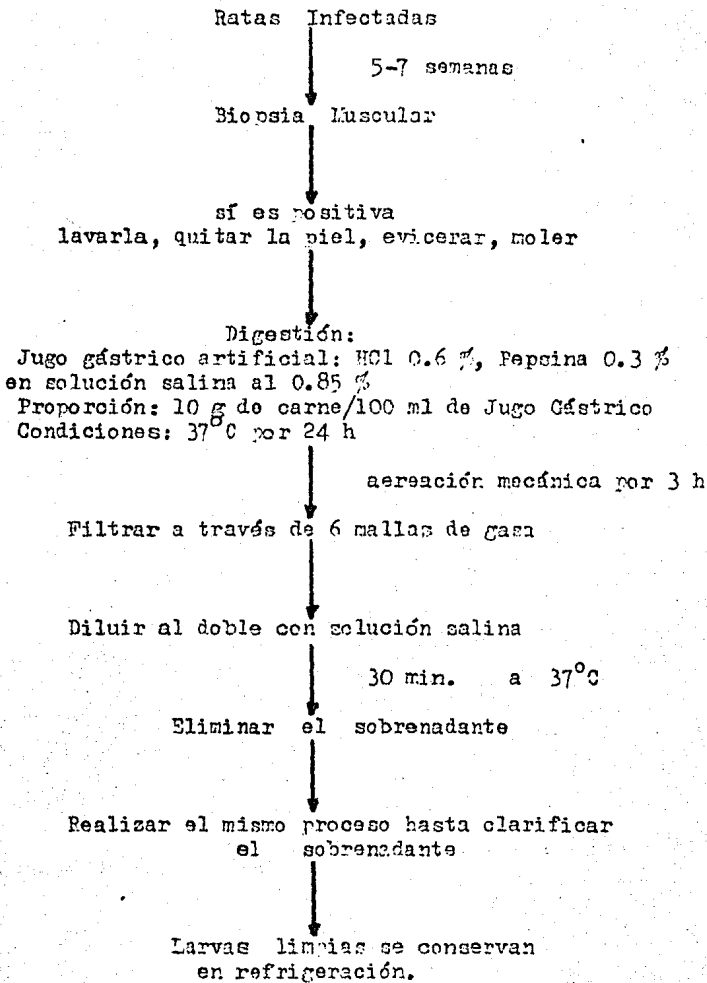
De 5 a 7 semanas después de infectadas las ratas, se comprobó su infección mediante una biopsia muscular, realizándose en los músculos de mayor actividad para la observación de las larvas enquistadas, colocando un pequeño trozo de la carne entre dos laminillas de vidrio observandolas al microscópio con el objetivo seco débil. En los casos positivos, se sa

APARATO DE BAERMAN



Aparato utilizado para la obtención de larvas de Trichine-
lla spiralis a partir de carne infectada mediante digestión artifi-
cial.

OPTECION DE LARVAS



crificaron las ratas con cloroformo, se les quitó la piel y los órganos internos, se lavaron y finalmente se molieron en un molino manual varias veces hasta la obtención de pequeños trozos de carne.

Una vez obtenida la carne molida se homogenizó y se puso a digerir en jugo gástrico artificial a una proporción de 1:10 en baño de agua a 37 °C por un período de 24 horas. Pasado este tiempo el digerido se aireó mecánicamente durante 3 horas; posteriormente este digerido se filtró a través de 6 mallas de gasa, agitando bien antes de filtrarse. El filtrado se diluyó al doble de su volumen con solución salina al 0.85 %, se dejó reposar por 30 minutos en baño de agua a 37 °C; una vez pasado este tiempo, se eliminó el sobrenadante y el sedimento larvario se lavó varias veces hasta clarificación total del sobrenadante.

Una vez que se obtuvieron las larvas limpias, se concentraron por centrifugación mezclándose perfectamente y se llevaron a un volumen conocido, de tal manera que se pudieran tomar alicuotas para contar las larvas en una cámara adaptada especialmente para este propósito. Las larvas ya obtenidas y contadas se conservaron en congelación hasta su posterior utilización.

-OBTENCION DE ANTIGENOS DE LARVAS DE *Trichinella spiralis*-

La obtención de los antígenos de larvas de *Trichinella spiralis* se llevó a cabo a partir de un extracto total de larvas, dicho extracto se obtuvo mediante el método de congelación-descongelación con hielo seco en metilselolve y baño de agua a 37 °C, este proceso se repitió varias veces con la finalidad de obtener una destrucción completa de las larvas.

Posteriormente las larvas se sometieron a homogenización mecáni-

OBTENCION DE LOS ANTIGENOS DE LARVAS

Trichinella spiralis

Llevar las larvas a concentración conocida
Hacer diluciones, tomar alicuotas, contar.

↓
Congelación-Descongelación

↓
Sonicación(12 W), Sedimentar

↙
Sobrenadante

↓
Precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
saturado

↓ 48 h

Diálisis

- 1) en H_2O 48 h.
- 2) en PBS 0.005M pH 8

↓
Composición Química:

- 1) Proteínas (Davies)
- 2) Carbohidratos (Creinol)

↓
Cromatografía en Sephadex
G-200

ANTIGENO S

↘
Precipitado
resuspendido con PBS

↓
Precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
saturado

↓ 48 h

Diálisis

- 1) en H_2O 48 h.
- 2) en PBS 0.005M pH 8

↓
Composición Química:

- 1) Proteínas (Davies)
- 2) Carbohidratos (Creinol)

↓
Cromatografía en Sephadex
G-200

ANTIGENO P

ca manual y, para asegurar su completo rompimiento se sometieron a un proceso de sonicación durante 3 minutos por dos períodos de 12 W. en un sonicador modelo S 36. El material obtenido se dejó sedimentar durante 24 horas.

El sobrenadante y precipitado resultante de la sonicación en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.2 se precipitaron por separado con sulfato de amonio concentrado por un tiempo de 48 horas a 4 °C. Cada uno de los precipitados fueron resuspendidos en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.2, se dializaron a una temperatura de 4 °C durante dos días con agua destilada estéril y después con la solución amortiguadora ya antes mencionada, hasta dar negativa la prueba negativa con nitrato de plata concentrado para la detección de sulfato de amonio.

Estos dos antígenos se conservaron en congelación a -170 °C.

-DETERMINACION DE PROTEINAS DE LOS ANTIGENOS DE LARVAS DE *Trichinella spiralis*-

Para la determinación de la concentración de proteínas de los antígenos obtenidos de las larvas de *Trichinella spiralis*, se utilizó el método de Davis-Groves (40), ya que es un método espectrofotométrico que consiste en hacer una curva patrón con albúmina sérica bovina, para lo cual se prepararon diluciones de 10, 50, 100, 150, y 175 microgramos/ml. utilizando como diluyente amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.2 y se determinó la absorbancia a 224 y 233 nm. en un espectrofotómetro Zeiss Mod. PM 2D. De esta manera se obtuvo la curva de calibración $A=f(c)$, que es el parámetro utilizado en este método. Los valores de la curva patrón se muestran en la tabla No. 1, así como el trazado de la curva en la gráfica No. 1.

TABLA No. 1

CURVA PATRON DE ALBUMINA PARA LA DETERMINACION DE PROTEINAS DE
LOS ANTIGENOS DE LARVAS DE Trichinella spiralis POR
EL METODO DE DAVIS

^A 224	^A 233	^A 224-233	^B Concentración de proteínas(ug/ml)
0.095	0.050	0.045	10
0.309	0.092	0.217	50
0.670	0.221	0.449	100
0.998	0.334	0.664	150
1.190	0.440	0.750	175

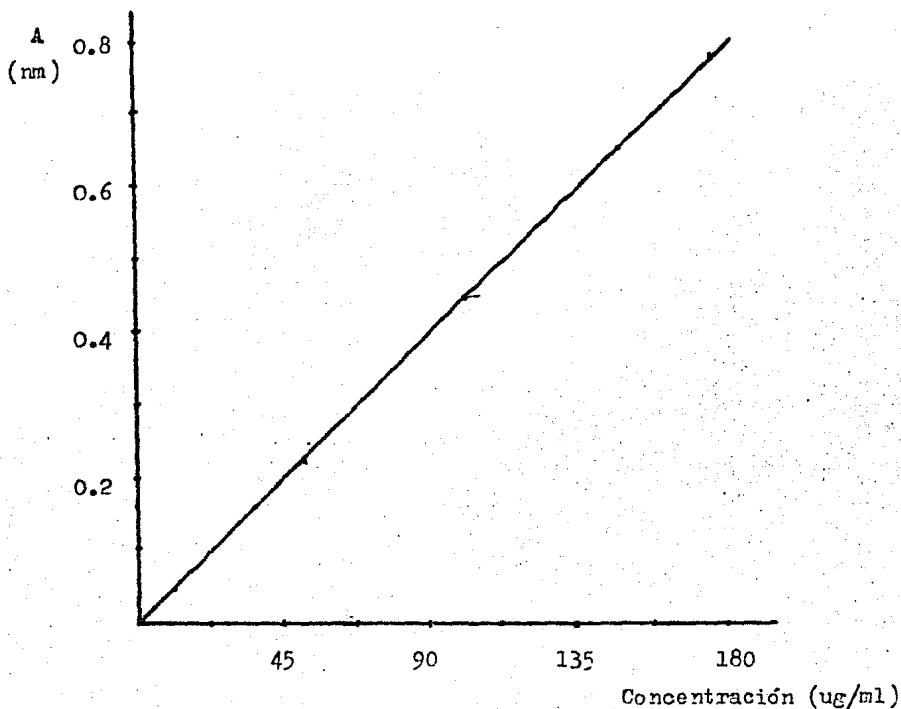
A Valores de Absorbancia dados en nanómetros.

Esta tabla nos muestra los diferentes valores de absorbancia obtenidos a dos diferentes longitudes de onda y la diferencia de las absorbancias para la graficación de acuerdo al método de Davis.

^B Soluciones patrón realizadas con albúmina sérica bovina (DIFCC).

GRAFICA No. 1

GRAFICA DE LA CURVA PATRON DE ALBUMINA PARA LA DETERMINACION
DE PROTEINAS DE LOS ANTIGENOS DE LARVAS DE *Trichinella*
spiralis POR EL METODO DE DAVIS



En esta gráfica se puede observar que la concentración de albúmina es directamente proporcional a la absorbancia, lo cual nos demuestra que se cumple la Ley de Beer.

Para la determinación de la concentración de proteínas de los antígenos obtenidos, se tomaron alícuotas de estos llevándolas a un volumen conocido con la misma solución amortiguadora que para la curva patrón se les midió la absorbancia a 224 y 233 nm. y se extrapoló el valor de la diferencia de las absorbancias obtenidas de cada uno de los antígenos en la curva patrón. De esta manera se pudo determinar la concentración de proteínas que contenía cada antígeno.

-DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS DE LOS ANTIGENOS DE LARVAS DE *Trichinella spiralis*-

Para la determinación de la concentración de carbohidratos se realizó una curva patrón de Dextrosa, preparando diluciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/ml. Determinando la absorbancia a 540 nm. en un espectrofotómetro Zeiss Mod. PM 2D. La concentración de carbohidratos de los diferentes antígenos se determinó por la medición de la absorbancia de los compuestos formados por la reacción de los carbohidratos contenidos en los diferentes antígenos de *Trichinella spiralis* con orcinol en un medio ácido, extrapolando así los valores de la absorbancia en la curva patrón, estableciéndose de esta manera la concentración de carbohidratos de cada antígeno. Ver tabla y gráfica No. 2.

-FRACCIONACION CROMATOGRAFICA-

Las diferentes fracciones antígenicas de los dializados obtenidos se pasaron por una columna de Sephadex G-200 (2.5 x 40 cm.) previamente equilibrada con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.2 durante 48 horas. Las diferentes muestras fueron eluidas por separado con el mismo amortiguador a una fluidez de 8 ml./h. Los eluidos fueron colocados

TABLA No. 2

CURVA PATRON DE DEXTROSA PARA LA DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS
DE LOS ANTIGENOS DE LARVAS DE Trichinella spiralis

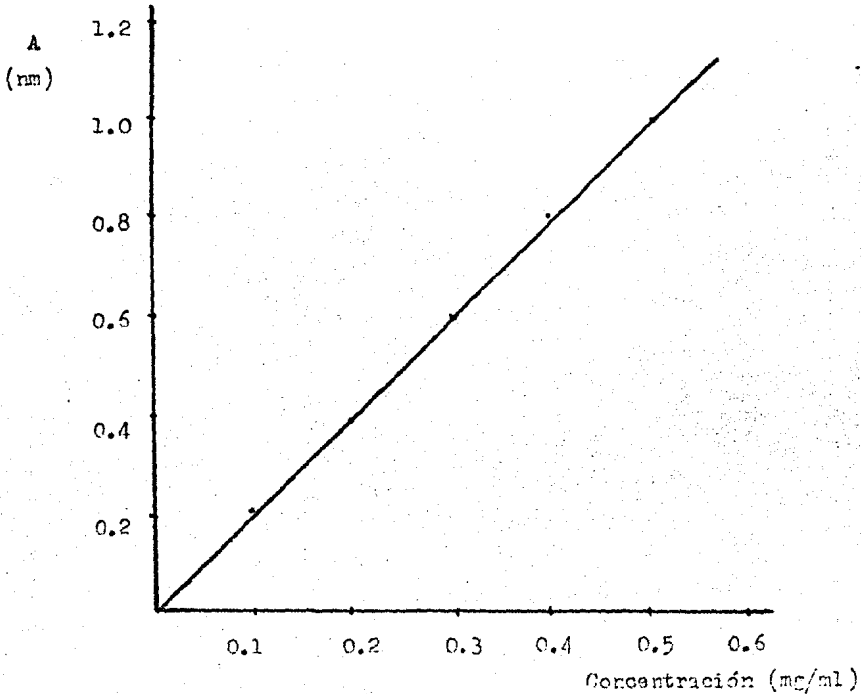
A_{540}	Concentración de Dextrosa (ug/ml)
0.20	0.1
0.42	0.2
0.64	0.3
0.87	0.4
1.60	0.5

A Valores de absorbancia dados en nanómetros.

Esta tabla nos muestra los diferentes valores de absorbancia obtenidos para las soluciones patrón a diferentes concentraciones de dextrosa al reaccionar con arcinol.

GRAFICA No. 2

GRAFICA DE LA CURVA PATRON DE DEXTROSA PARA LA DETERMINACION
DE CARBOHIDRATOS DE LOS ANTIGENOS DE LARVAS DE *Trichinella*
spiralis



Esta gráfica nos muestra que la concentración de carbohidratos (dextrosa) es directamente proporcional a las absorbancias obtenidas, - cumpliéndose de esta manera la Ley de Beer.

tados en alicuotas de 1.5 ml. en un colector mod. ISCO UA-5 y leídos en un espectrofotómetro

-OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-*Trichinella spiralis*-

La producción de anticuerpos anti-*Trichinella spiralis* se realizó en ratas blancas de ambos sexos, las cuales fueron infectadas con aproximadamente 1000 larvas contenidas en carne fresca. Después de 20 días de iniciada la infección las ratas fueron sacrificadas para la detección de los anticuerpos en el suero obtenido.

La detección de los anticuerpos se realizó mediante la reacción con una muestra de extracto total salino obtenido inicialmente de las larvas, utilizando las técnicas primeramente de precipitación en tubo capilar y después por precipitación en agarosa (doble difusión de Ouchterlony).

Para la detección de anticuerpos mediante la técnica de precipitación en tubo capilar, se utilizaron tubos capilares de 7.5 cm. de largo por 3 mm. de diámetro poniendo cantidades iguales de antígeno y del suero, observándose la precipitación a las 12, 24 y 48 horas. Esta misma prueba también se realizó con las diferentes fracciones obtenidas de la fraccionación cromatográfica, observándose la precipitación a los mismos intervalos de tiempo.

Para la demostración de anticuerpos anti-*Trichinella spiralis* mediante la técnica de doble difusión en agarosa, basándose en el principio de que el antígeno y el anticuerpo se difunden a través de un medio semi-sólido como agarosa para la formación de complejos inmunitarios estables que pueden ser analizados visualmente; se realizó la prueba en un medio de agarosa a dos diferentes concentraciones (al 1 % para la capa superior

y al 1.5 % para la capa inferior) en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 , 0.01 M.

La prueba fué realizada en cajas de Petri a las cuales se les aplicó primeramente una capa de agarosa al 1.5 % hasta sequedad, posteriormente se depositaron 5 ml. de agarosa al 1 % dejando gelificar. Se horadaron pequeños pozos y las muestras de antígenos, así como las fracciones obtenidas por cromatografía se depositaron en los pozos (20 micro litros), en el pozo central se colocó la misma cantidad de suero obtenido de las ratas inmunizadas. Las placas se colocaron en cámara húmeda para que se efectuara la difusión, las placas fueron examinadas a las 12, 24, y 48 horas para la observación de las posibles líneas de precipitación resultantes. Ver figura No. 2.

-ELECTROFORESIS DE PROTEINAS-

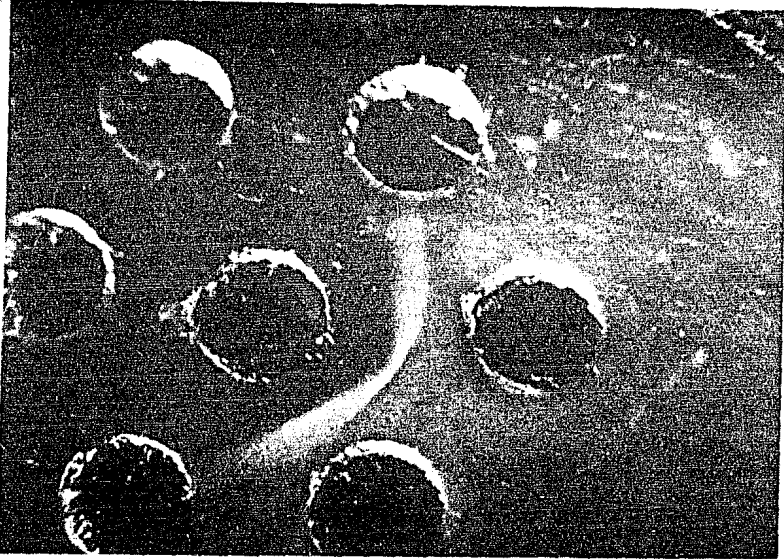
La determinación de la concentración de las diferentes fracciones proteicas del suero obtenido de ratas inmunizadas con larvas de Trichinella spiralis, se realizó mediante Electroforesis en placas de acetato de celulosa, utilizando una solución amortiguadora de TRIS-Barbital sódico pH 8.69 y una fuerza iónica de 0.05. Las bandas obtenidas fueron leídas para su graficación en un densitómetro modelo 1520 (Helena Laboratories)

-CUANTIFICACION DE INTRACELULINAS-

La cuantificación de las inmunoglobulinas del suero inmune se realizó mediante la técnica de difusión radial única en placas de Tripartigen que están basadas en el principio de que existe una relación cuantitativa entre las cantidades del antígeno colocado en un pozo horadado sobre la placa de agar-anticuerpo (incorporación de anticuerpos específicos en placas de agar) y el anillo resultante de precipitación.

FIGURA No. 4

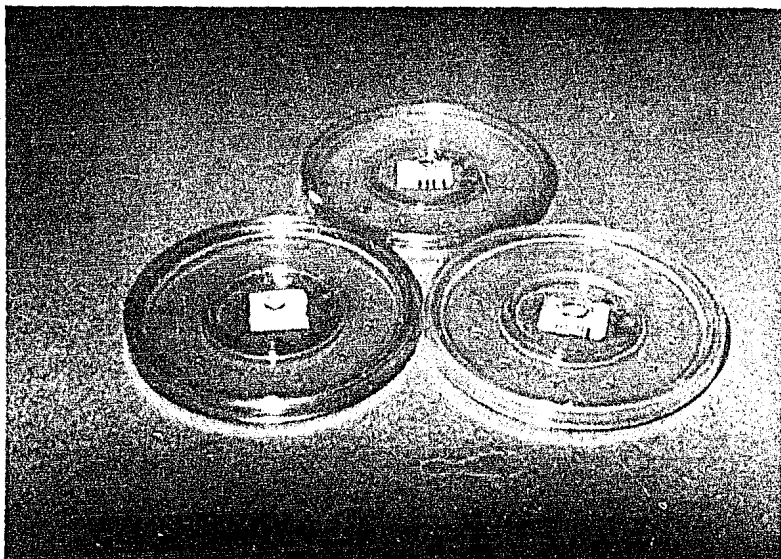
PRECIPITACION DOBLE EN AGAROSA



Placas de agarosa utilizadas para detectar la precipitación de los antígenos obtenidos de larvas de Trichinella spiralis con los anticuerpos del suero hiperinmune.

Se realizó una curva patrón con estándares de antígenos conocidos a tres concentraciones diferentes para cada una de las inmunoglobulinas séricas (IgG, IgA, IgM, e IgE) más importantes. Ver figura 3 , tablas y gráficas 3,4,5) e .

INMUNODIFUSION RADIAL



Placas de TRIPARTIGEN utilizadas para realizar la cuantificación de Inmunoglobulinas (IgG, IgM, IgA).

TABLA No. 3

CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE INMUNOGLOBULINA
DE LA CLASE IgG

Diámetro ² (mm ²)	Concentración (mg/dl)
42	44
75.6	106
115.8	170

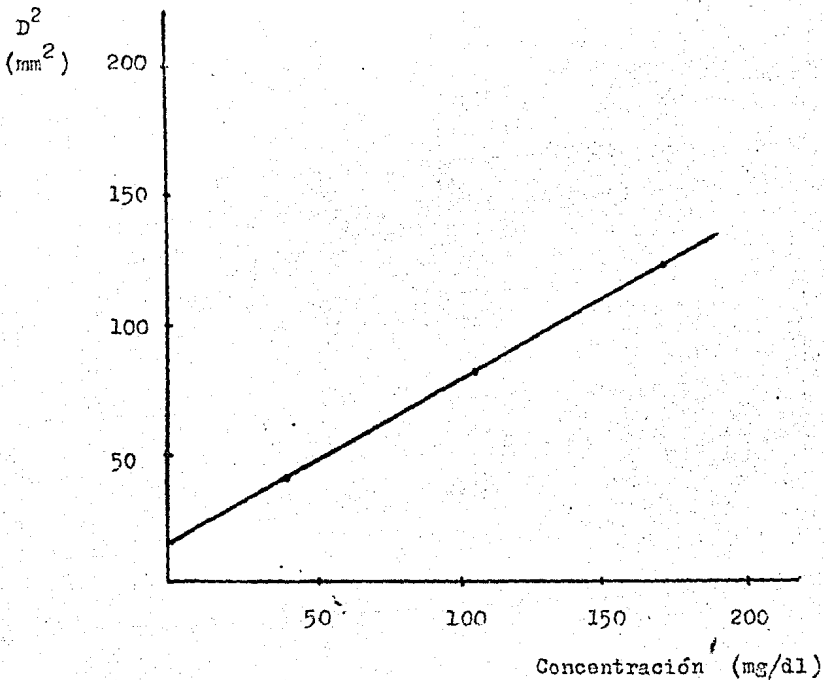
Esta tabla nos muestra los diferentes diámetros obtenidos en placas Tripartigen mediante difusión Radial Unica de los 3 sueros control de concentraciones conocidas.

GRAFICA No. 3

GRAFICA DE LA

CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE INMUNOGLOBULINA DEL TIPO

Ig G



D diámetro expresado en milímetros

Curva realizada en placas de Tripartigen mediante la técnica de difusión radial única, utilizando tres sueros control de concentraciones conocidas.

TABLA No. 4

CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE INMUNOGLOBULINA
DE LA CLASE IGA

Diámetro ² (mm ²)	Concentración (mg/dl)
20.25	86
30.25	176
49.00	343

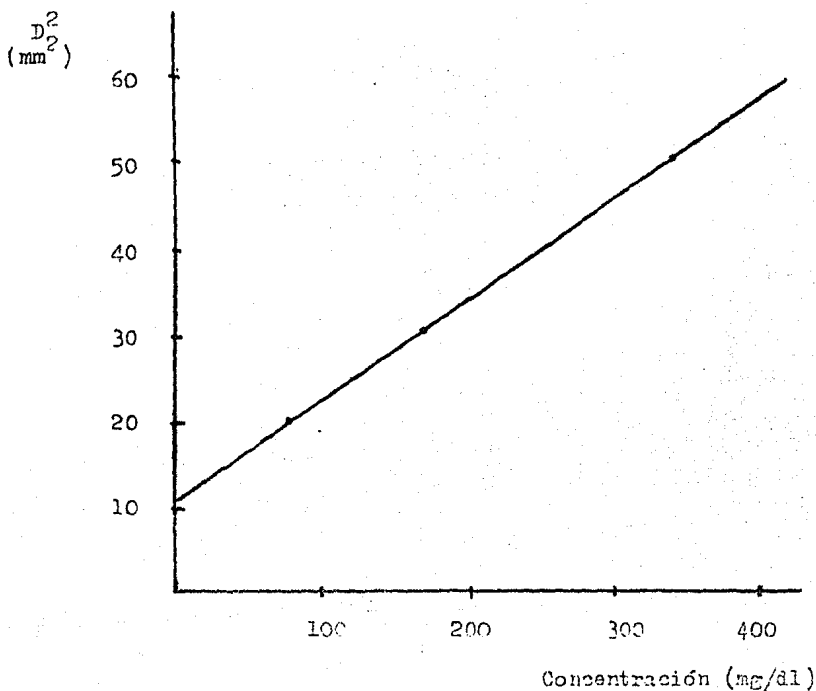
Esta tabla nos muestra los diferentes diámetros obtenidos en placas Tripartigen mediante difusión Radial Unica de los tres sueros control de concentraciones conocidas.

GRAFICA No. 4

GRAFICA DE LA

CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE INMUNOGLOBULINA DEL TIPO

Ig A



D diámetro expresado en milímetros

Curva realizada en placas de Tripartigen mediante la técnica de difusión radial única, utilizando tres sueros control de concentraciones conocidas.

TABLA No. 5

CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE INMUNOGLOBULINA
DE LA CLASE IgM

Diámetro ² (mm ²)	Concentración (mg/dl)
20.25	83
28.09	157
42.25	282

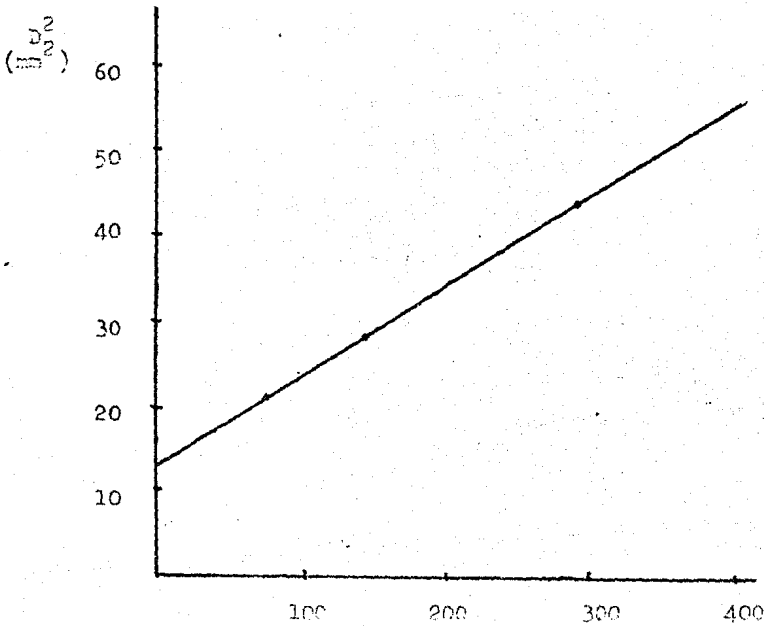
Esta tabla muestra los diferentes diámetros obtenidos en placas tripartigen mediante Difusión Radial Unica de los tres sueros control de concentración conocida.

GRAFICA No. 5

GRAFICA DE LA

CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE INMUNOGLOBULINA DEL TIPO

Ig M



Concentración (mg/dl)

D diámetro expresado en milímetros

Curva realizada en placas de Triparticon mediante la técnica de difusión radial única, utilizando tres sueros control de concentraciones conocidas.

RESULTADOS

-OBTENCION DEL PARASITO-

a) Con el fin de llevar a cabo el estudio de los antígenos de Trichinella spiralis fué necesario encontrar las condiciones óptimas de obtención del parásito, a partir de carne infectada, encontrándose los resultados en la gráfica No. 6 en donde se puede ver que a las 24 horas de digestión en jugo gástrico artificial fué posible separar un promedio de 253 larvas con 92% de viabilidad.

b) La cantidad de larvas obtenidas por gramo de carne fué en promedio 250 larvas en 25 determinaciones, y en base a este resultado se se administró a cada rata por separado 4 gramos de carne, de tal manera que recibiesen 1000 larvas aproximadamente.

c) Pasadas 6 semanas de la infección de las 40 ratas, solo 34 resultaron ser positivas a la biopsia, las cuales fueron sacrificadas y se obtuvieron de ellas un total de 510 000 larvas en total.

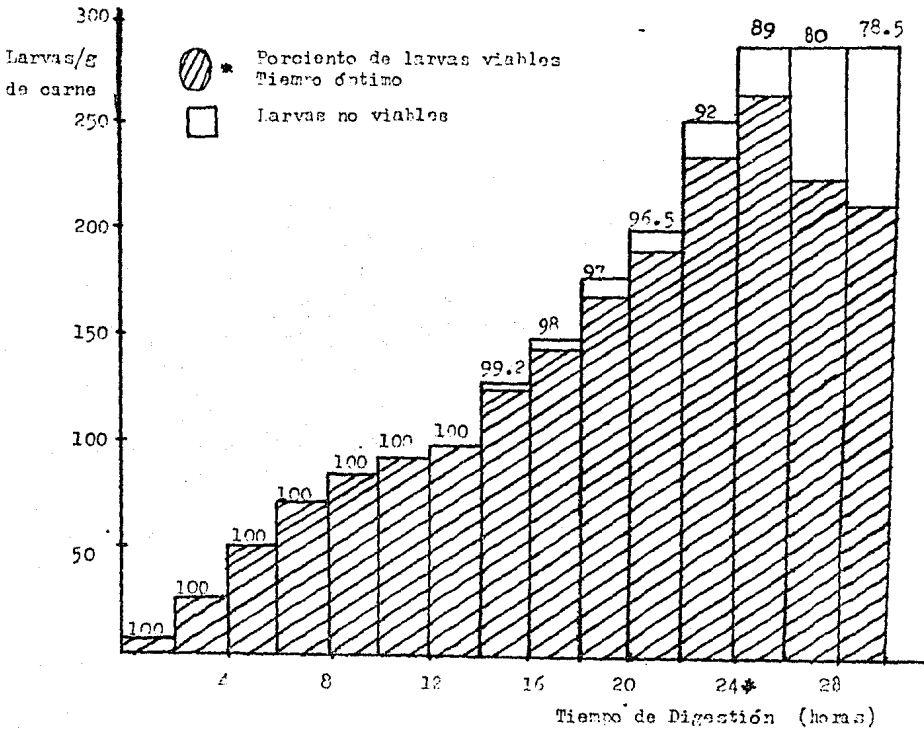
-OBTENCION DE ANTIGENOS DE LARVAS DE TRICHINELLA SPIRALIS Y NATURALEZA QUIMICA-

c) Las 510 000 larvas obtenidas del sacrificio de las 34 ratas infectadas después de ser tratadas por sonicación, congelación-descongelación y homogenización mecánica fueron casi totalmente fraccionadas y se obtuvieron 2 fracciones: Sobrenadante y Precipitado, que por separado se precipitaron con Sulfato de Amonio obteniéndose 2 fracciones antigénicas: Antígeno S. que constituye la porción soluble y

Antígeno P que constituye la fracción precipitada de la técnica de precipitación con Sulfato de Amonio Concentrado del extracto to-

GRAFICA No. 6

REPRESENTACION GRAFICA PARA LA REPRESENTACION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS (MAJOR NUMERO DE LARVAS CON ALTO PORCENTAJE DE VIABILIDAD) DE LARVAS DE Trichinella spiralis



Esta gráfica nos muestra que el tiempo en el cual se obtiene la mayor cantidad de larvas con un alto porcentaje de viabilidad es a las 24 horas de digestión artificial.

tal calino de larvas de Trichinella spiralis.

La concentración de proteínas para los dos diferentes antígenos obtenidos se realizó mediante la medición de la absorbancia a dos longitudes de onda (224 y 233 nm.) tabla No. 6 y la diferencia de estas se graficó extrapolándose en la curva de calibración realizada con albúmina sérica bovina (ver material y métodos), la cual se muestra en la gráfica No. 1, obteniéndose la siguiente cantidad de proteínas para cada antígeno:

- Antígeno S 630 microgramos/ml. y
- Antígeno P 150 microgramos/ml.

La concentración de carbohidratos obtenida para los diferentes antígenos se muestra en la tabla No. 7 determinándose tales concentraciones mediante las mediciones de la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm y extrapolando dichos valores en la curva patrón de Dextrosa que se muestra en la gráfica No. 2. Observándose que la cantidad de carbohidratos obtenida para los antígenos fué la siguiente:

- Antígeno S 115 microgramos/ml. y
- Antígeno P 70 microgramos/ml.

Estos resultados nos indican que el antígeno S está formado por 84.56 % de proteínas y un 15 % de carbohidratos.

Y el antígeno P por un 68.18 % de proteínas y 31.81 % de carbohidratos.

-FRACCIONACION CROMATOGRÁFICA-

Los antígenos soluble (S) y precipitado (P) fueron fraccionados por cromatografía de exclusión en gel de Sephadex G-200, mostrando las siguientes fracciones:

TABLA No. 6

CONCENTRACION DE PROTEINAS PARA LOS ANTIGENOS DE LARVAS DE
Trichinella spiralis OBTENIDAS A PARTIR DE LA CURVA
PATRON DE ALBUMINA SERICA BOVINA

	A ₂₂₄	A ₂₃₃	A ₂₂₄₋₂₃₃	Concentración de proteínas (ug/ml)
Ag.S	0.267	0.178	0.089	21
Ag.P	0.069	0.050	0.019	5

Datos de absorbancia obtenidos para los diferentes antígenos de larvas de Trichinella spiralis.

Corrigiendo los resultados obtenidos mediante el factor de dilución utilizado; la concentración de proteínas queda de la siguiente manera:

- Antígeno S : 21 ug/ml x 30 = 630 ug/ml
- Antígeno P : 5 ug/ml x 30 = 150 ug/ml

TABLA No. 7

CONCENTRACION DE CARBOHIDRATOS DE LOS ANTIGENOS DE LARVAS DE
Trichinella spiralis OBTENIDAS A PARTIR DE LA CURVA

A_{540}	Concentración de Carbohidratos ($\mu\text{g/ml}$)	
0.24	115	Antígeno S
0.14	70	Antígeno P

Resultados para la concentración de Carbohidratos de los Antígenos obtenidos de Larvas de Trichinella spiralis, mediante el método de la reacción con Orcinol.

-Antígeno S 12 Fracciones y

-Antígeno P 9 Fracciones.

Las gráficas No. 7 y 8 nos muestran las diferentes fracciones obtenidas. Estos resultados nos indican que el antígeno sobrenadante está constituido por un número mayor de fracciones.

-OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-Trichinella spiralis-

La obtención de anticuerpos anti-Trichinella spiralis mediante la técnica de precipitación en tubo capilar se observó a las 24 horas de haberse puesto en contacto cada uno de los antígenos obtenidos, así como las diferentes fracciones obtenidas, con el suero de ratas infectadas con Trichinella spiralis. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 8 .

La demostración de los anticuerpos anti-Trichinella spiralis mediante la técnica de doble difusión de Ouchterlony se detectó a las 48 horas de incubación en cámara húmeda, observándose las bandas de precipitación de los complejos inmunitarios estables formados en forma visual como se muestra en la figura No. 2 .

En la tabla No. 8 se muestra los diferentes antígenos y fracciones que dieron reacciones positiva y negativa a las dos técnicas para la detección de anticuerpos mencionadas anteriormente.

-CUANTIFICACION DE PROTEINAS SERICAS DE RATAS INFECTADAS POR Trichinella spiralis MEDIANTE ELECTROFORESIS EN AGUATO DE CENICOSA-

El barrido electroforético del suero de ratas infectadas con larvas de Trichinella spiralis, se muestra en la gráfica No. 9 observándose-

TABLA No. 8

CANTIDAD DE INMUNOGLOBULINA DE LA CLASE IgG OBTENIDA MEDIANTE
DIFUSION RADIAL UNICA EN PLACAS TRIPARTIGEN

Diámetro ² (mm ²)	Dil.	Concentración (mg/dl)
69.09	1:50	3200

Resultados obtenidos para el Suero Hiperimmune, extrapolando el diámetro obtenido con con este en la Tabla No. 3 de Material y Métodos.

TABLA No. 9

CANTIDAD DE INMUNOGLOBULINA DE LA CLASE IgA OBTENIDA MEDIANTE
DIFUSION RADIAL UNICA EN PLACAS TRIPARTIGEN

Diámetro ² (mm ²)	Concentración (mg/dl)
23.54	100

Extrapolando el diámetro obtenido con el suero Hiperin-
mune (ver tabla No. 4 Material y Métodos) se obtuvo la con-
centración de IgA.

TABLA No. 10

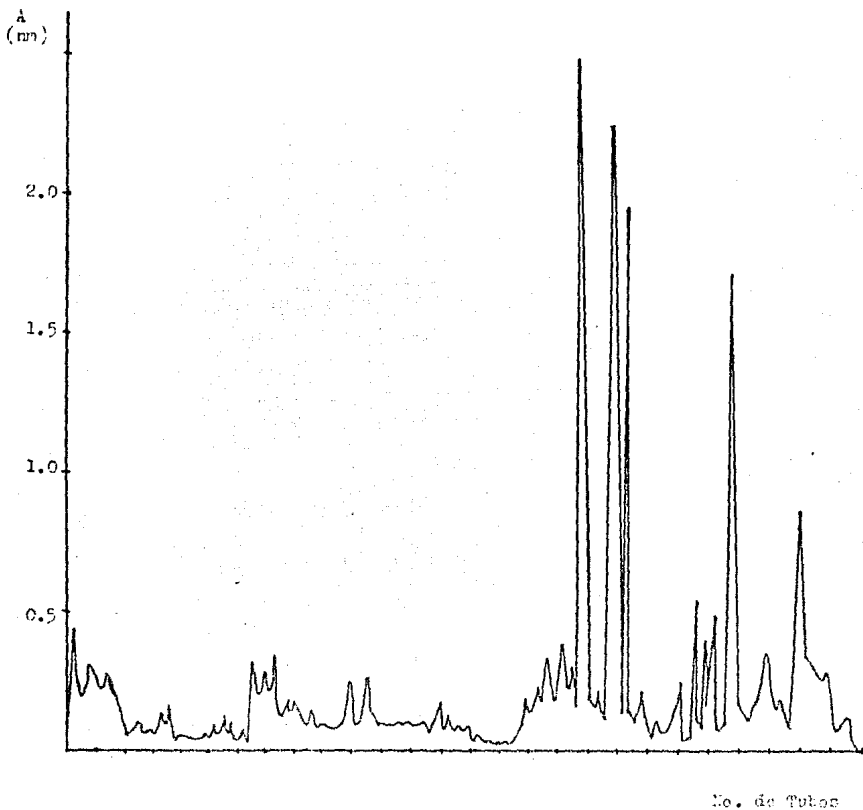
CANTIDAD DE INMUNOGLOBULINA DE LA CLASE IgM OBTENIDA MEDIANTE
DIFUSION RADIAL UNICA EN PLACAS TRIPARTIGEN

Diámetro ² (mm ²)	Concentración (mg/dl)
37.45	250

La concentración de IgM en el Suero Hiperimmune se obtuvo extrapolando el diámetro obtenido con este en las placas Tri-partigen en comparación con los datos obtenidos en la tabla - No. 5 (ver Material y Metodos).

GRAFICA No. 7

DISTRIBUCION CROMATOGRAFICA DEL ANTIGENO SOBREVIVIENTE DE LARVAS DE
Trichinella spiralis, REALIZADA EN UNA COLUMNA DE CEBRADEX
G - 200

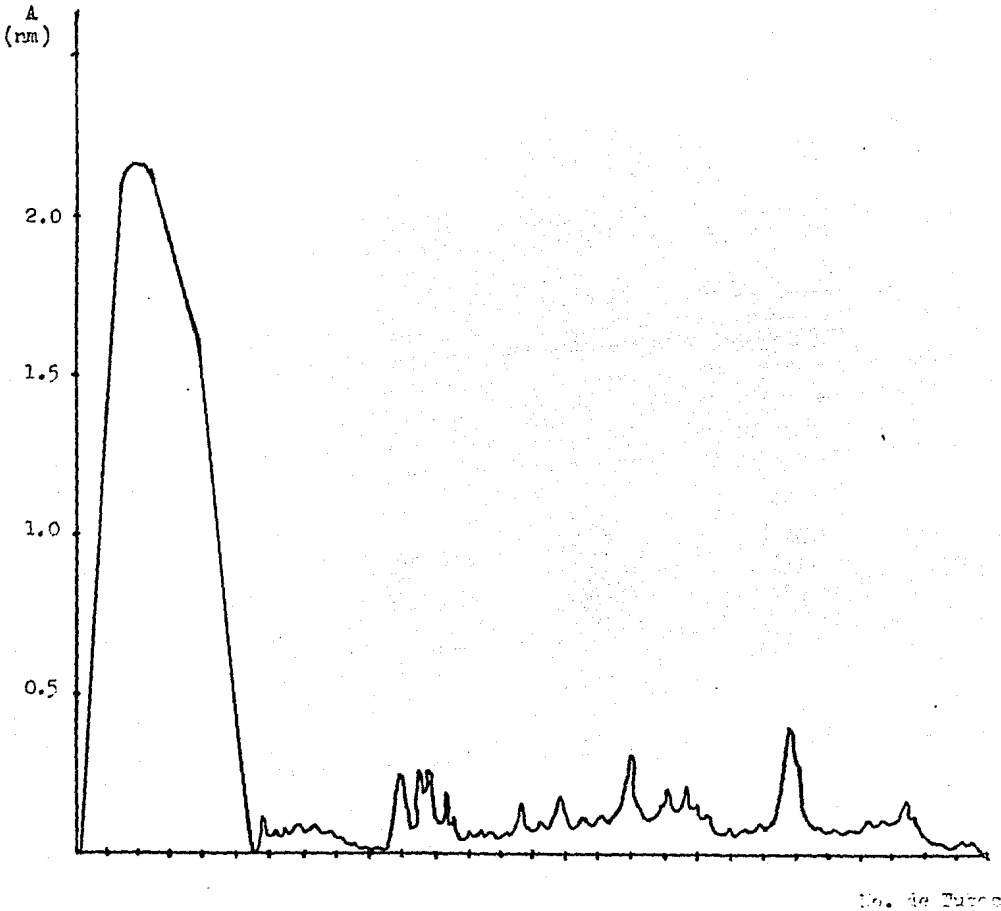


En esta grafica, como se puede observar, al pasar el antigeno sobreviviente de Trichinella spiralis a través del CebraDEX G-200 se obtienen 12 fracciones (eluidos). En base a la mayor cantidad de proteinas presentes.

GRAFICA No. 8

DISTRIBUCION CROMATOGRAFICA DEL ANTIGENO PRECIPITADO DE LARVAS DE
Trichinella spiralis, REALIZADA EN UNA COLUMNA DE SEPHADEX

G - 200



En esta grafica podemos observar que al sacar el antigeno precipitado de Trichinella spiralis a través del Sephadex G-200 se obtienen 2 fracciones (eluidos). En base a la mayor cantidad de proteínas precipitadas.

TABLA No. 11

RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-Trichi-
nella spiralis MEDIANTE LAS TÉCNICAS DE PRECIPITACIÓN EN
TUBO CAPILAR Y DOBLE DIFUSIÓN

Muestra No.	Tipo de Antígeno	Reacción de precipitación	Reacción de doble difusión
1	Extracto total	+	+
2	Antígeno S	+	+
3	Antígeno P	+	+
4	Fracción 1 AgS	+	-
5	Fracción 2 AgS	-	-
6	Fracción 3 AgS	-	-
7	Fracción 4 AgS	-	-
8	Fracción 5 AgS	+	-
9	Fracción 6 AgS	+	+
10	Fracción 7 AgS	+	+
11	Fracción 8 AgS	+	+
12	Fracción 9 AgS	+	-
13	Fracción 10 AgS	+	+
14	Fracción 11 AgS	-	-
15	Fracción 12 AgS	+	-
16	Fracción 1 AgP	+	-
17	Fracción 2 AgP	+	+
18	Fracción 3 AgP	+	-
19	Fracción 4 AgP	+	-
20	Fracción 5 AgP	+	-
21	Fracción 6 AgP	-	-
22	Fracción 7 AgP	-	-
23	Fracción 8 AgP	-	-

- AgS ... Antígeno Sobrenadante
- AgP ... Antígeno Precipitado

En esta tabla podemos observar que la reacción de precipitación da más reacciones con prueba positiva en comparación con la reacción por doble difusión.

se las siguientes concentraciones de proteínas:

-Albumina	24.41 %	1.92	g/dl
-Alfa 1	18.82 %	1.48	g/dl
-Alfa 2	9.41 %	0.74	g/dl
-Beta	25.83 %	2.04	g/dl
-Gama	16.48 %	1.72	g/dl

La concentración de proteínas totales fué de 7.9 g/dl.

La gráfica No. 10 nos muestra el barrido electroforético de un "pool" de suero de ratas no infectadas. Las concentraciones de las diferentes proteínas fué la siguiente:

-Albumina	34.19 %	2.39	g/dl
-Alfa 1	24.36 %	1.70	g/dl
-Alfa 2	11.21 %	0.78	g/dl
-Beta	16.00 %	1.12	g/dl
-Gama	14.25 %	0.99	g/dl

La concentración de proteínas totales fué de 7.0 g/dl.

-QUANTIFICACION DE INMUNOGLOBULINAS-

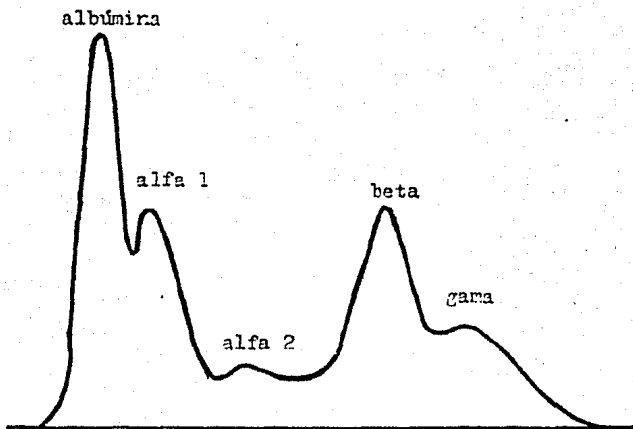
La concentración de las diferentes inmunoglobulinas fueron las siguientes:

- Ig A	0.1	g/dl
- Ig G	3.2	g/dl
- Ig M	0.25	g/dl
- Ig E	Negative	

Ver tablas y gráficas 3, 4, y 5 .

GRAFICA No. 9

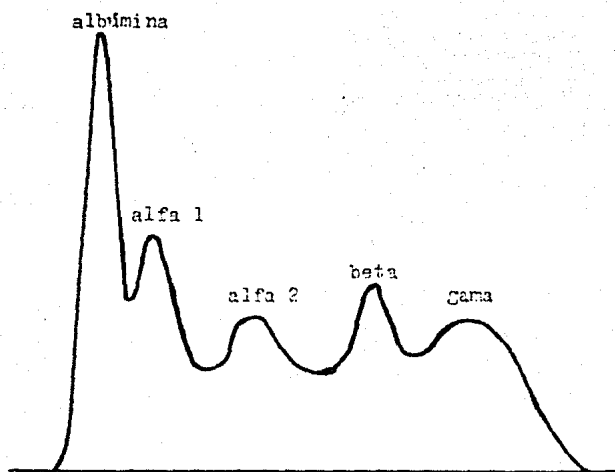
ELECTROFORESIS DE PROTEINAS SERICAS DE RARAS INFECTADAS CON LARVAS
DE *Trichinella spiralis*



Barrido electroforético realizado en placas de acetato de celulosa utilizando una solución amortiguadora de TRIS-barbital sódico a un pH de 8.69 y una fuerza iónica de 0.05, el cual demuestra una elevación de las fracciones beta y gama.

GRAFICA No. 10

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS SERICAS DE RATAS NO INFECTADAS CON
Trichinella spiralis



Enfardo electroforético realizado en placas de acetato de celulosa utilizando una solución amortiguadora de TRIS-barbital sódico a un pH de 8.60 y una fuerza iónica de 0.05 de un "pool" de suero de ratas - no infectadas.

DISCUSION

Las características expuestas en este estudio acerca de la Trichinella spiralis, nos proporcionan conocimientos más amplios sobre su aspecto inmunológico esto es importante, ya que este parásito produce en el humano una enfermedad que aunque generalmente no se manifiesta clínicamente, se presenta con una gran incidencia que ha sido descubierta en individuos que han muerto por otras causas. Para lograr esto es primordial conocer los aspectos inmunológicos fundamentales tanto de la parasitosis así como del parásito y la relación que guarda entre sí como del parásito y la relación que guarda entre sí con su huésped.

Por las razones antes expuestas, la obtención de los antígenos - de larvas de Trichinella spiralis, su composición química así como su actividad inmunogénica puede ayudar a conocer más a cerca de este parásito. Primeramente se buscaron las mejores condiciones de digestión para la obtención del parásito (mayor cantidad de larvas con un alto porcentaje de viabilidad) para infectar en forma efectiva a los animales que se utilizaron posteriormente, ya que los métodos actuales reportan diversas condiciones para la obtención de las larvas en estado viable, principalmente mediante la digestión de la carne infectada con jugo gástrico artificial. Los métodos se adaptaron a las condiciones del laboratorio, resultando las mejores condiciones cuando se utilizó jugo gástrico artificial preparado con 0.3% de pepsina y 0.5% de HCl en solución salina al 0.85% durante un período de 24 horas de digestión y una temperatura de 37 °C mediante la técnica de Haasman (19), obteniéndose por esto un 92% de viabilidad, lo cual era importante para lograr un máximo de larvas sucep-

lares en las ratas que se infectaron.

La obtención del mayor número de larvas sin importar la viabilidad, se logró mediante la modificación del método de Baerman indicado en la sección de material y métodos, debido a que en el método de Baerman se manejan cantidades pequeñas de carne con la consecuente obtención de pequeñas cantidades de larvas, obteniendo como resultado trabajar con grandes cantidades de carne y en consecuencia de larvas para la posterior obtención de los antígenos.

Una vez obtenidas las larvas se procedió a fraccionarlas lo más posible por medio de tres métodos: sonicación, congelación-descongelación y homogenización, encontrándose que no es suficiente un solo método como se reporta en la literatura, ya que fue necesaria la combinación de los tres métodos. Así el sobrenadante resultante de esta combinación de técnicas se denominó "Extracto total salino" de larvas de Trichinella spiralis, aprovechando que de esta manera se obtiene la mayor cantidad de sustancias antigénicas. A la porción soluble se le denominó antígeno S, el cual contiene la mayor cantidad de componentes antigénicos en comparación con la porción insoluble denominada antígeno P. Al ser caracterizada la composición química de ambos antígenos se encontró que una mayor cantidad de sustancias antigénicas son solubles; estos resultados concuerdan con lo anteriormente reportado por Sleeman (33).

Debido a que mediante estos métodos se obtiene gran cantidad de sustancias antigénicas además de otros componentes no importantes para matrices fijas, se procedió a purificar el contenido proteico de las dos versiones obtenidas (S y P), mediante el método de precipitación con sulfato de amonio saturado, de tal manera que se seleccionaba solo el mate-

rial de origen proteico, ya que generalmente en estas reacciones se encuentra la mayor parte del material antigénico como ha sido reportado por Despommier (10) y Hagan (19).

Para la caracterización química de las proteínas se seleccionó el método de Davis ya descrito en la sección de material y métodos, aprovechando la cualidad de ser un método rápido, sencillo y muy sensible, además de no permitir la interferencia de los ácidos nucleicos en la determinación, ya que el método está basado en la eliminación de la absorbancia debida a estos ácidos nucleicos al efectuar la lectura a dos diferentes longitudes de onda. De esta manera se encontró que el antígeno S está constituido por 630 ug/ml y el antígeno P por 150 ug/ml (ver tabla No. 6).

Para determinar la concentración de carbohidratos de nuestros antígenos utilizamos el método del Orcinol, debido a que este compuesto forma un complejo colorido cuya máxima absorción se presenta a una longitud de onda de 540 nm el cual es fácilmente detectable (ver tabla 7). Los resultados anteriores nos indican que los antígenos obtenidos son en su mayoría de naturaleza glicoproteica, ya que al hacer la precipitación con la solución de sulfato de amonio saturado se precipitan proteínas y material unido a éstas, estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura (29).

El fraccionamiento de los antígenos obtenidos se realizó por separación cromatográfica en una columna de Sephadex G-200, eligiendo este método por permitir la separación de los antígenos en base a sus pesos moleculares, separando inicialmente las fracciones de mayor peso molecular y gradualmente las de menor peso molecular, obteniéndose de esta ma-

nera un análisis más específico de estas. Por este método se obtuvieron 12 fracciones del antígeno S de las cuales 4 dieron reacción positiva a las pruebas de precipitación en tubo capilar y en gel por doble difusión. Del antígeno P se obtuvieron 8 fracciones de las cuales solamente una - dió resultados positivos en ambas pruebas al poner en contacto cada frac- ción con el antisuero anti-Trichinella spiralis obtenido de ratas inmuni- zadas.

Los resultados obtenidos en las pruebas de precipitación y difu- sión descritos anteriormente, no solo nos muestran que los antígenos ob- tenidos de las larvas son antigénicos, sino que no se descarta que las - fracciones con resultados negativos no sean anticógnicas ya que podrían - requerir de otras condiciones para poder detectar su antigenicidad, lo - que surge un estudio más específico y sensible a este respecto.

La determinación de la antigenicidad de las fracciones que dieron resultados negativos podría ser demostrada por técnicas como lo son las de ELISA, inmunoelectroforesis y pruebas in vitro valorando la respuesta a agentes mitogénicos, etc.

La discrepancia obtenida en las reacciones de precipitación en - tubo capilar y doble difusión en gel, está basada en el hecho de que la - precipitación en tubo capilar es menos específica pero nos da una idea - de la reacción. En la técnica de difusión en gel para que se produzca - una banda de precipitación es necesario que se encuentren en cantidades - equivalentes el antígeno y el anticuerpo, de tal manera que se elimine - un probable fenómeno de exceso, lo cual hace menos probable encontrar - una reacción falsa positiva, requiriéndose con esto un mejor control en - las cantidades a probar.

La razón de utilizar estas dos técnicas diferentes en sencibilidad y especificidad, fué el de tener un resultado de referencia para poder contar con un método que nos diera una idea de la presencia de antígeno y/o anticuerpos en un huésped y pueda ser utilizado como un método rutinario por cualquier laboratorio.

La verificación del suero hiperinmune se logró mediante electroforesis de éste, el cual nos reveló la elevación de las fracciones beta y gama debido a que las inmunoglobulinas pueden correr electroforéticamente desde la fracción beta hasta gama (la IgG puede correr entre alfa 2 y gama), además de haber determinado un gran aumento de la IgG por inmunodifusión radial en comparación con un "pool" de sueros de ratas no infectadas.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos proporcionaron un conocimiento más amplio tanto de las características antigénicas de la Trichinella spiralis, así como útiles conocimientos experimentales de esta parasitosis, ya que lo reportado en la bibliografía no siempre concuerda con lo encontrado bajo condiciones particulares en que se trabajó en un determinado laboratorio. Además de darse cuenta de que el estudio de esta y otras parasitosis debe de ser más ampliamente estudiado por la importancia que estas representan particularmente en nuestro país. Por otro lado podemos ver la alta antigenicidad de las fracciones obtenidas.

Con este estudio preliminar queda abierta la posibilidad de continuar trabajando sobre este tema en forma más profunda.

CONCLUSIONES

- 1) Las condiciones óptimas encontradas para la obtención de larvas de Trichinella spiralis fueron: 24 horas de digestión con jugo gástrico artificial (0.85 % de NaCl, 0.3 % de pepsina y 0.6 % de HCl) con un 92 % de viabilidad.
- 2) Se obtuvieron dos antígenos de un extracto total salino de larvas de Trichinella spiralis por medio de : congelación-descongelación, homogenización mecánica y sonicación, denominados antígeno S (soluble) y antígeno P. (precipitado).
- 3) La composición química para cada uno de los antígenos fué: 84.56 % de proteínas y 15.43 % de carbohidratos para el antígeno S y 68.18 % de proteínas y 31.81 % de carbohidratos para el antígeno P.
- 4) Al fraccionar cada uno de los antígenos con gel de Sephadex G-200 se obtuvieron 12 fracciones del antígeno S y 8 fracciones del antígeno P, siendo cinco de estas inmunológicamente importantes, ya que dieron reacción positiva para las pruebas de precipitación en tubo capilar y doble difusión en agarosa.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Andy Joseph J., O'Connell Joseph P., Daddario Robert C., Roberts William C. "Trichinosis Causing Extensive Centriolar Nural Endocarditis - with Superimposed Trombosis". The Am. J. of Med.; 63 ; 824-829 ; 1977.
- 2.- Barriga C. "Modification of Immune Competence by Parasitic Infections I. Responses to Mitogens and Antigens in Mice Treated with Trichinella spiralis Extract" J. of Parasitol; 64 ; (4); 638-642; 1978.
- 3.- Barriga C. "Selective Immunodepression in Mice by Trichinella spiralis Extracts and Infections" Cell Immunol; 17; 306-309 ; 1975.
- 4.- Barriga C. "Depletion of Cell-Mediated Immunity Following Inoculation of Trichinella spiralis extract in the mouse" Immunology; 34 ; 167-173; 1978.
- 5.- Bass D.A., Szieda P. "Eosinophis versus neutrophis in host defence of Newborn larvae of Trichinella spiralis by human granulocytes in vitro" J. Clin. Invest.; 64 ; 1415-1422; 1979.
- 6.- Christie P. R., Wakelin D. y Wilson M. M.; "The Effect of the Expulsion on Hymenolepis diminuta infection in rats"; Paras.; 78 ; 323-330 ; 1979.
- 7.- Despomnier D. D., McGregor D. D., Crum E. D., Carter P. B.; "Immunity to Trichinella spiralis"; Immunology; 33; 797-805; 1977.
- 8.- Despomnier D. D. "Immunity to Trichinella spiralis"; Am. J. of Trop. Med. and Hyg.; 26 (6); 68-74; 1977.
- 9.- Despomnier D. D.; Muller M. "The Stichosome and its Secretions Granules in the Matura Muscle Larvae of Trichinella spiralis"; J. Parasitology 62 (5); 775-785; Oct. 1976.
- 10.- Despomnier D.D., Iacetti A. "Trichinella spiralis, Partial Characterization of Isolated Antigens by immune-Affinity-Chromatography from The Large-Particle Fraction of the Muscle Larvae"; J. Paracitol.; 67 (3); 332-339; 1981.

- 11.- Despomnier D. D.; "Immunity Against Adults Worms"; J. of Immunology; 25 ; 797-805; 1979.
- 12.- Díaz Saldaña J., Manjarrez G., Gómez Barreto J., González A. Vélez y De la Rosa H.; "Trichinosis , Reporte de un brote familiar"; 4; (1); - 326-328; Ene-Feb; 1979.
- 13.- Faubert G. L., y Tanner C. E.; "The supression of Sheep Rosete forming Cells and the inability of Mouse Marrow to Reconstitute Competence After Infection with The Nematode Trichinella spiralis"; Immunology; 27 501-505; 1974.
- 14.- Faust E. C., Russell F. F. y Jung R. C.; "Parasitología Clínica" ; Salvat Editores; 8a. ed.; 1974.
- 15.- Gómez García, Rodríguez Osorio y González Castro; "Aplicación de la técnica de Micro E.L.I.S.A. de dobles anticuerpos en la Investigación de Antígenos en la Triquinosis experimental de la rata"; Rev. Iber de Paras.; 39; 55-64; 1979.
- 16.- Grove D. I., Mahmoud A. A. y Warren K. S. "Eosinophils and Resistance to Trichinella spiralis"; J. of Exp. Med.; 145; 755-759; 1977.
- 17.- Harley J. P., Gallicchio V.; "Trichinella spiralis; Migration of Larvae in the Rat"; Exp. Paras.; 30 ; 11-21; 1971.
- 18.- James E. P. Moloney A. y Denham D. A.; "Immunity to Trichinella spiralis, Partial Characterization of Antigens Isolated from the Large-particle Fraction of the Muscle Larvae"; J. of Parasitol; 67 (3); 332-339; 1981.
- 19.- Kagan I. G.; "Trichinosis; Review of Biologic, Serologic and Immunological Aspects" J. Infect. Dis.; 107; 65-93; 1950.
- 20.- Larralde C., Willis K. y Ortiz-Ortiz Sela; "Parasites and Immunology" Academic Press; 1a. Ed. 1980.

- 21.- Love R. J., Ogilvie R. K., McLaren D.J.; "The Immune Mechanisms with expels the Intestinal Stage of Trichinella spiralis from rats"; Immunology; 30 ; 7-15; 1976.
- 22.- Martínez Fernández A. R., San Martín Durán M. L., Toro Rojas, Rodríguez Caabeiro F.; "Effect of Febendazole on Encysted Larvae of Trichinella spiralis Histopatologic changes Induced by Prednisone"; Rev. Iber. de Parasitol.; 40 (2); 1980.
- 23.- Martínez Larañón R.; "Un pequeño brote familiar de triquinosis"; Salud Pública de México; XXI (2); 161-165; Mar-Abril; 1979.
- 24.- Metzler M.H., Sahgal K.K., Wolf G.S.; "Second Degree Atrioventricular Block in Acute Trichinosis"; Am. J. Dis. Child.; 124 ; 598-601; Oct. 1972.
- 25.- Martínez Larañón, Trejo J. y Delgado Aguirre B.; "Frecuencia de la infección por Trichinella spiralis en 1000 diafragmas de cadáveres de la Ciudad de México en 1972-1973"; 95-105; 1974.
- 26.- Norman L. D., Donaldson A. W. y Sadun E. H.; "The Flocculation Test with a Purified Antigen in the Diagnosis of Trichinosis in Humans"; J. Infect. Dis.; 98; 172-176; 1956.
- 27.- Norman L. Sadun E. H.; "The Use of Metabolic Antigens in the Flocculation tests for Serologic Diagnosis of Trichinosis"; J. of Parasitology; 45 ; 485; 1958.
- 28.- Pattersson R., Roberts M., Slonka G. y Mc Aninch J.; "Studies of Immunoglobulines, Bentonite Flocculation and IgE, IgG and IgM antibodies in serum from patients with Trichinosis"; The Am. J. of Med.; 58 ; 787-793; Jun 1975.
- 29.- Ferreudet-Badoux y Binaghi R. A.; "A Isolation and Properties of a Soluble Antigen of Trichinella spiralis"; Immunol; 26 ; 1217-1223; 1974.

- 30.- Ruitenberg E. J., Ferrama J. S. y Steerenbar P. A.; "The intestinal phase of Trichinella spiralis Infection"; Parasitic-Zoonosis; 319-326; 1974.
- 31.-Roussell A. D., Castro G. A.; Physiological Characterization of a Biphasic response to Trichinella spiralis in the rat"; The J. Infect. Dis.; 139; (3); 304-312; March 1979.
- 32.- Ruitenberg E. J., Yansen Van F.; "The enzyme Linked Immunesorbent - Assay and its Application to Parasitic Infections"; J. of Infect. Dis.; - 136 ; Supplement; s267-s273.
- 33.- Sleeman K.; "Studies on Complement Fixing Antigens Isolated from Trichinella spiralis Larvae"; Am J. Trop. Med. Hyg.; 10 ; 834-838; 1961.
- 34.- Thomas W., Ponicevich J. Hoyem E. M.; "Flocculation Reactions in rabbits experimentally infected with Trichinella spiralis"; J. Infect. Dis. 92; 89-96; 1953.
- 35.- Tronchin G.; "Oral Immunization of mice with Metabolic Antigens of Trichinella spiralis larvae, Effects and the Kinetics of Intestinal cell response Including Mast Cells and Polymorphonuclear Cosinophils"; J of Parasitol; 65 (5); 685-691; 1979.
- 36.- Wakelin D., Wilson M.; "Evidence for the involvement of a Bone Marrow derived cell population in the immune expulsion of Trichinella spiralis"; Parasitology; 74; 295-304; 1977.
- 37.- Warren K. S., Farr R. y Peller E. E.; "The Mucosa Hill stimulation - promoter test in murine and human Trichinella spiralis infection"; J. of Infect. Dis.; 134 (3); 277-280; Sep. 1976.
- 38.- Wakelin D. y Wilson M. ; "T y B cells in the Transfer of Immunity - against Trichinella spiralis in mice"; Immunol.; 17; 103-109; 1970.

39.- Winter: "History of Trichinosis"; Bull Hist. Med.; 53 (4); 320-323;
1979.

40.- William and Chase; "Methods in Immunology and Immunochemistry": Aca-
demic Press, New York-London; Vol. I y II, 19 ed., 1967.