

20
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ENEP IZTACALA

"ANALISIS DE LA ESTIMULACION DIRECTA DE
CELULAS CEBADAS POR ANTIGENOS
PURIFICADOS DE *Trichinella spiralis*"

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A :

OSCAR CASAS MEJIA

ASESOR: DRA. LILIAN YEPEZ MULIA

MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2655-20



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

LUGAR DE REALIZACION

**LABORATORIO DE PARASITOLOGIA DE LA UNIDAD DE
INVESTIGACION MEDICA EN ENFERMEDADES
INFECCIOSAS Y PARASITARIAS, DEL HOSPITAL DE
PEDIATRIA.
CMN SIGLO XXI, IMSS.**

La realización de este trabajo fue posible gracias :
a la Dra. Lilián Yépez y a los Drs. José Antonio Enciso y
Roberto Cedillo, por su apoyo financiero y asesoría que
siempre me brindaron, durante el desarrollo de este trabajo.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
(CONACyT), por su apoyo financiero a través del proyecto
N° 5098/M9406.

Así que no depende del que quiere,
ni del que corre,
sino de Dios
que tiene misericordia.

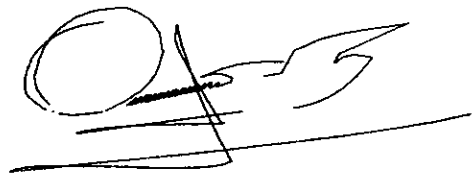
DEDICATORIA

Ahora que llegué al final de esta etapa de mí vida; me encuentro tratando de recordar los buenos tiempos y de olvidar los malos.

Pensando en el futuro; me empiezo a preocupar ... a pensar...,
Que voy hacer ?...pero al final digo ¡ por favor ! porque a fin de cuentas nadie tiene mucho tiempo en la tierra, la vida es breve y si no se valora lo grandioso que sucede en ella,
no tiene caso vivirla.

Una vez levante la vista al cielo ...,
cuando las estrellas cuelgan de la noche aterciopelada,
y cuando una estrella fugaz corto la negrura...,
tornó mí noche en día....

Si alguna vez estás solo,
pide un deseo...,
y piensa en Dios
y El hará de tu vida algo espectacular...,
yo se que lo hizo conmigo,
al darme la dicha de conocer a cada uno de ustedes...,
siendo estrellas fugaces,
entre estrellas ordinarias,
son maravillosas y pasan rápidamente,
pero mientras pasan iluminan el cielo.
Es la cosa mas hermosa que uno puede ver,
tan hermosa que las otras estrellas se detienen...a mirar,
casi nunca se ven, por que son muy escasas,
pero yo vi miles de ellas
y no me queda más que dar mil
Gracias.

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized letter 'O' followed by a series of horizontal and diagonal strokes that suggest a name or initials.

A mis padres:

María y Roberto
con amor y respeto,
una pequeña ofrenda
por quienes han luchado
tanto en la vida.

Y que de manera directa
intervinieron en mi formación
humana y profesional,
a quienes debo lo que soy.

A mis hermanos:

Araceli, Sonia, Norma y Roberto
por que siempre estuvieron presentes
en mí acontecer profesional,
dándome confianza y apoyo,
además de algo muy importante
para mi, su presencia.

Mis mejores deseos para
que culminen sus propósitos
cuales quiera que sean.

A Itiel Shibencher:

Quien cambió mi vida dándole alegrías,
siendo un estímulo constante para mí
superación.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial a la **Dra. en C. Lilián Yépez Mulia**; por haberme brindado la oportunidad de ser un colaborador más a su lado, por su amistad, comprensión, confianza para este trabajo y apoyo en aquellos momentos en que más se requería

Al Dr. José Antonio Enciso Moreno:

Que por su asesoría y sus sugerencias enriquecieron el presente trabajo y contribuyeron a mí formación.

Al Dr. Roberto Cedillo Rivea:

Por todas las facilidades otorgadas y apoyo brindado para la realización de la tesis.

A mis amigos y compañeros de la carrera:

Alberto, Amanda, Edgar y Pilar por las experiencias compartidas, por apoyarnos en cada momento de nuestras vidas y por la amistad que nos une y nos unirá siempre.

A todos mis compañeros de Laboratorio:

Amparo, Beatriz, Nancy, Noemí, Fernando, Raúl, Pablo y a todos mis compañeros del laboratorio de Parasitología y Biología Molecular por su apoyo y ayuda en todo momento, con los que compartí momentos especiales.

A todo el personal de la UIMEIP:

que cooperó para la realización
de este trabajo.

Indirectamente recibí ayuda y estímulo de muchas otras personas que sería imposible mencionar sin cometer alguna omisión, pero a todos ellos quiero hacer llegar mi agradecimiento.

INDICE

	página
ABREVIATURAS.....	i
INDICE DE TABLAS.....	ii
INDICE DE FIGURAS Y MAPAS.....	iii
RESUMEN.....	iv
I. INTRODUCCION.....	1
EPIDEMIOLOGIA DE LA TRIQUINELOSIS.....	4
CICLO DE VIDA DE <i>Trichinella spiralis</i>	7
SINTOMATOLOGIA DE LA TRIQUINELOSIS.....	10
CARACTERISTICAS DE LOS ANTIGENOS DE <i>Trichinella spiralis</i>	11
RESPUESTA INMUNE CONTRA <i>Trichinella spiralis</i>	13
BIOLOGIA DE LAS CELULAS CEBADAS.....	23
II ANTECEDENTES.....	31
III. JUSTIFICACION.....	37
IV. OBJETIVOS.....	40
V. METODOLOGIA.....	41
MANTENIMIENTO DEL CICLO DE VIDA DE <i>Trichinella spiralis</i> Y OBTENCION DE LA LARVA MUSCULAR DEL PARASITO.....	41
OBTENCION DEL EXTRACTO TOTAL DE LA LARVA MUSCULAR DE <i>Trichinella spiralis</i>	43
IMMUNOPURIFICACION DE LOS ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE LA LARVA MUSCULAR DE <i>Trichinella spiralis</i>	45
ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA BAJO CONDICIONES REDUCTORAS (PAGE-SDS).....	47
DETERMINACION DE Ig TOTALES E IgE ESPECIFICAS CONTRA LA LARVA MUSCULAR DE <i>Trichinella spiralis</i> EN SUEROS DE RATAS INFECTADAS CON EL PARASITO, EMPLEANDO EL METODO DE ELISA.....	49
ANALISIS DEL AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE CELULAS CEBADAS DE PERITONEO (CCP) DE RATA.....	51
ACTIVACION DE CELULAS CEBADAS DE PERITONEO DE RATA CON ANTIGENOS DE <i>Trichinella spiralis</i>	53
CUANTIFICACION DE HISTAMINA LIBERADA POR CELULAS CEBADAS DE PERITONEO DE RATA ACTIVADAS CON ANTIGENOS DE <i>Trichinella spiralis</i>	54
VI. RESULTADOS.....	57
VII. DISCUSION.....	69
VIII CONCLUSIONES.....	75
IX. ANEXOS.....	76
X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	80

ABREVIATURAS

ASB.....	Albúmina Sérica Bovina.
Bisacrilamida.....	N'N'-metilen-bis-acrilamina.
CC.....	Celulas Cebadas.
CCI.....	Células Cebadas Intestinales.
CCM.....	Células Cebadas de Mucosa.
D.O.....	Densidad óptica.
DOC.....	Deoxicolato de Sodio.
EDTA.....	Etilendinitriltetracetato.
ELISA.....	Ensayo inmunoenzimático en placa sólida.
ET.....	Extracto total.
E/S.....	Antígeno de Excreción/Secreción.
Ica.....	Ionóforo de Calcio A23187.
IET.....	Inmunoelctrotransferencia.
IL.....	Interleucina.
Igs.....	Inmunoglobulinas.
kDa.....	Kilodaltons.
LT.....	Leucotrienos.
LM.....	Larva Muscular.
LRN.....	Larvas Recién Nacidas.
MHC.....	Complejo Principal de Histocompatibilidad.
NK.....	Células Asesinas.
NC.....	Célula Nodriz.
O-PT.....	O-ptaldialdehido.
PAF.....	Factor Estimulador de Plaquetas.
PBS.....	Amortiguador de fosfato salino.
PG.....	Prostaglandinas.
p.i.....	post-infección.
RMCPPII.....	Proteasas de Células Cebadas de Mucosa Intestinal.
PMSF.....	Fenil Metil Sulfonil Fluorido.
RCI.....	Indices de Capacidad Reproductiva.
SDS.....	Dodecilsulfato de Sodio.
S.....	Antígeno de Superficie.
TCA.....	Acido tricloroacetico.
TEMED.....	N'N'N'N'-Tetrametiletilediamina.
TLCK.....	N- α -p-Tosil-L-Lisina Clorometil Cetona.
TNF.....	Factor de Necrosis Tumoral.
TPCK.....	L-1-Tosil-2-Fenil-Etilclorometil Cetona.

INDICE DE TABLAS

TABLA 1.	3
Característica de los ocho genotipos de <i>Trichinella spiralis</i> determinados por análisis isoenzimáticos.	
TABLA 2.	19
Niveles de Proteasa II producida por células cebadas intestinales (CCI), determinados en lavados intestinales de cepas de ratones con diferente capacidad de respuesta contra la infección de <i>T. spiralis</i> .	
TABLA 3.	26
Diferencias estructurales y funcionales entre células cebadas de mucosa (CCM) y células cebadas de tejido conectivo (CCTC) en ratas.	
TABLA 4.	64
Porcentaje de viabilidad y pureza de células cebadas aisladas de peritoneo (CCP) de ratas no infectadas e infectadas con <i>T. spiralis</i> , purificadas mediante gradientes discontinuos de Percoll 30-80%.	

INDICE DE FIGURAS Y MAPAS

FIGURA 1.	7
Ciclo de vida de <i>Trichinella</i> .	
FIGURA 2.	16
Participación de células cebadas en la inducción de una respuesta inmune tipo TH2, contra parásitos hemintos.	
FIGURA 3.	28
Activación de células cebadas, mediante diferentes estímulos y liberación de mediadores.	
FIGURA 4.	58
Análisis electroforético del extracto total (ET) de la larva muscular (LM) de <i>T. spiralis</i> .	
FIGURA 5.	60
Análisis electroforético de los antígenos de superficie (S) purificados de la larva muscular (LM) de <i>T. spiralis</i> , en geles de acrilamida al 10% en presencia de SDS bajo condiciones reductoras.	
FIGURA 6.	62
Determinación de la presencia de anticuerpos contra <i>T. spiralis</i> en sueros de ratas no infectadas e infectadas experimentalmente con el parásito, empleando el ensayo de ELISA.	
FIGURA 7.	66
Porcentaje de histamina liberada por células cebadas de peritoneo (CCP) de ratas estimuladas con el extracto total (ET), de la larva muscular (LM) de <i>T. spiralis</i> .	
FIGURA 8.	68
Porcentaje de histamina liberada por células cebadas de peritoneo (CCP) de ratas estimuladas con antígenos de superficie (S), de la larva muscular (LM) de <i>T. spiralis</i> .	
MAPA 1.	6
Brotos de triquinelosis reportados en México (1938-1995).	

INTRODUCCION

La triquinelosis es una enfermedad cosmopolita, causada por parásitos del género *Trichinella*, constituyendo un problema de salud pública y veterinario. La fuente principal de la transmisión de esta infección a humanos es el consumo de carne de cerdo infectada con este parásito, aunque en los últimos años se ha observado un incremento en los casos de triquinelosis humana por consumo de carne de otros animales como caballo, oso, jabalí, marmota, entre otros (Murrell y cols. 1987; Pozio y cols., 1994).

La compleja taxonomía de los nemátodos del género *Trichinella* está bien documentada por numerosos estudios bioquímicos, biológicos, epidemiológicos, clínicos e inmunológicos (Dick, 1983; Viallet y cols., 1986; Campbell, 1988; Bolas-Fernández y Wakelin, 1989; Zarlenga y Barta, 1990; Pozio y col., 1992; Dupouy-Camet y cols., 1994). A partir de la comparación de patrones isoenzimáticos de diferentes aislados de *Trichinella*, se consideran ocho grupos genéticos (T1-T8), seis de ellos infectan al hombre y cinco se consideran como especies verdaderas (TABLA 1). *T. spiralis* (T1), es caracterizada por una distribución cosmopolita, aislada de animales domésticos y salvajes y que tiene una alta patogenicidad en humanos, la producción *in vitro* de larvas recién nacidas (LRN) es mayor de 90/72 h, el tiempo de desarrollo de la célula nodriza (NC td) es entre 16 y 37 días post-infección (p.i.), con grandes índices de capacidad reproductiva (RCI) en ratones, ratas y cerdos, con 6 únicos marcadores isoenzimáticos; *T. nativa* (T2), aislado de zonas árticas y sub-árticas, sus hospederos son mamíferos salvajes, tiene una moderada patogenicidad en humanos, la producción de LRN *in vitro* es de 28-57/72 h, NC dt entre 20 a 30 p.i., su RCI es bajo en ratones y cerdos, la resistencia a la

intemperie es baja, posee dos marcadores isoenzimáticos; *T. britovi* (T3), es caracterizada por una distribución en regiones paleoárticas, la producción de la LRN *in vitro* es de 35-55 /72 h, el desarrollo de la NC es entre 24 y 42 días p.i., su RCI es bajo en ratones, ratas y cerdos, poca resistencia a la intemperie, posee un sólo marcador isoenzimático y tiene una patogenicidad moderada en humanos; *T. pseudospiralis* (T4) su distribución es cosmopolita, infecta aves y mamíferos, su producción de LRN *in vitro* es de 35-60 /72 h, ausencia de NC, su RCI en ratones y ratas es más alta que en otras especies de animales salvajes, como característica de estos aislados es que no presenta encapsulamiento en el músculo del hospedero y esto es indistinto con respecto al hospedero (Garcavi, 1972); *T. nelsoni* (T7) se distribuye solamente en Africa ecuatorial en mamíferos salvajes y tiene una producción de LRN *in vitro* de 49-60 /72 h; el tiempo de desarrollo de la NC es entre 34 y 60 p.i., su RCI es bajo en ratones, ratas y cerdos, no resiste al ambiente, posee 4 marcadores isoenzimáticos y su patogenicidad es moderada en humanos. Los tres genotipos adicionales llamados: T5, T6, y T8, son reconocidos en este género, pero su nivel taxonómico es incierto (Pozio y cols., 1992).

TABLA 1. Características de los ocho genotipos de *Trichinella* determinados por análisis isoenzimático.

Tipo	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Especies	<i>T. spiralis</i>	<i>T. nativa</i>	<i>T. britovi</i>	<i>T. pseudospiralis</i>	<i>T. (3)</i>	<i>T. (4)</i>	<i>T. nelsoni</i>	<i>T. (5)</i>
Localización Geográfica	Cosmopolita	Artico	Asia. Europa	Cosmopolita	Norte de América	Norte de América	Africa	Sur de Africa
Clima	Variado	Frío	Templado	Templado	Templado	Frío	Tropical	Subtropical
Hospederos	Cerdo, Perro, Gato, Zorra	Lobo, Oso	Cerdo, Rata, Zorra	Ave	Mapache, Oso	Lobo, Oso	Hiena, León	Hiena, León
Susceptible en rata Wistar	+++	0	+/-	++(1)	0	0	+/-	+/-
Resistencia al frío	0	+++	+	0	0	++	0	0
Establecido en Humanos	+	+	+	+(2)	+	?	+	?

1. *T. pseudospiralis* no es encapsulada, 2. Una infección de *T. pseudospiralis* fue reportada en Nueva Zelanda (Andrews y cols., 1993), 3. T5 y T8 son similares a *T. britovi*, 4. T6 es similar a *T. nativa*..

Tomado de Dupouy-Camet, y cols., 1994.

EPIDEMIOLOGIA DE LA TRIQUINELOSIS

En años recientes la enfermedad ha cobrado gran importancia debido al hecho de que las fuentes de transmisión en varios países no han sido controladas adecuadamente, por lo que se han reportado brotes de triquinosis en diversas zonas del mundo (Pozio y cols., 1989; Hernández y cols., 1992; Dupouy-Camet y cols., 1994).

En algunos países se considera que esta parasitosis es endémica; sin embargo, en la mayor parte de las áreas geográficas donde se presenta la infección, ocurre en forma epidémica. La enfermedad ha sido objeto de especial interés para las autoridades de sanidad, médicos y parasitólogos de Estados Unidos, debido a que se han presentado epidemias repetidas y algunas muertes en grupos de personas que han ingerido carne de cerdo infectada con el parásito (Nakai y Ogimoto, 1989).

En México, la enfermedad no es bien diagnosticada, pero observaciones de varios brotes indican que la frecuencia de la enfermedad está aumentando (Simposium. "Triquinosis Clínica, Recientes Estudios en México" ISET). Martínez-Marañón (1983, 1985) sugirió que la urbanización de algunas zonas rurales de nuestro país en los últimos años, ha provocado una interrelación antes desconocida entre los ciclos de animales silvestres y domésticos, aumentando el número y permanencia de cadáveres de animales potencialmente infectados expuestos al consumo de cerdos y perros, teniendo como consecuencia un incremento en la frecuencia e intensidad de la

parasitación del cerdo rural, y con ello producir el aumento en la infección humana.

En nuestro país, se han conocido casos de triquinelosis desde finales del siglo pasado (Olvera, 1896). Sin embargo, no fue sino hasta 1970 que se empezaron a estudiar más seriamente los brotes epidémicos. Entre 1974 y 1984 se reportaron varios brotes en diferentes entidades de la República Mexicana, incluyendo al D.F., encontrándose 158 casos con 3 defunciones, donde la fuente principal de infección fue la carne de cerdo procesada en forma de chorizo o "al pastor" (Martínez Marañón, 1985).

En el período de 1985 a 1989 surgieron varios brotes en la República Mexicana, obteniéndose muestras de sangre de 163 individuos involucrados, para ser analizarlas por ELISA. Como resultado de este estudio 69 (45%) fueron positivos, 9 fueron confirmados por biopsia y 154 probables por sintomatología compatible o por haber estado en contacto con la posible fuente (Alcántara y cols., 1989).

Entre los últimos brotes reportados, se encuentra uno en Ciudad Delicias, Chihuahua en donde 166 personas consumieron carne de cerdo infectada con el parásito a pesar de que el animal tenía el sello de sanidad (Hernández y cols., 1992).

Por otra parte, en un estudio realizado en la comunidad de Cerritos, en el estado de San Luis Potosí, se encontró una prevalencia del 1 al 3% y los

factores de riesgo asociados fueron la ingestión de salchichas y el sexo femenino (De la Rosa y cols., 1996).

Así, existen estados de la República Mexicana que se consideran como endémicos como por ejemplo: Chihuahua, Ciudad de México, Durango, Estado de México, Jalisco y Zacatecas, en donde se detectaron brotes de triquinosis humana reportados oficialmente y no oficialmente (Correa y cols., 1996) (ver mapa). Sin embargo, debido a que no se le ha dado gran importancia a esta parasitosis, no hay estudios que puedan indicar con precisión su prevalencia en México.

BROTOS DE TRIQUINELOSIS REPORTADOS EN MEXICO 1938-1995.



Mapa 1.- Estados de la República Mexicana con brotes oficiales (oscuro) y no oficiales (Gris) reportados en México en el período de 1938 a 1995. Los estados sombreados incluyen a Chihuahua, Estado de México, Jalisco y Zacatecas, donde la triquinosis se reporta con mayor frecuencia. Los estados en gris incluyen Durango, Distrito Federal, San Luis Potosí, Michoacán y Chiapas. Tomado de Correa y cols., 1996.

CICLO DE VIDA DE *Trichinella spiralis*.

Trichinella spiralis es un parásito intracelular que lleva a cabo su ciclo de vida en un solo hospedero (Stewart y Giannini, 1982). (FIGURA 1) Su ciclo de vida presenta dos fases: una fase entérica, donde pasa por cuatro estadios larvarios y una fase de adulto; y una fase parental que incluye a la LRN y la LM enquistada.

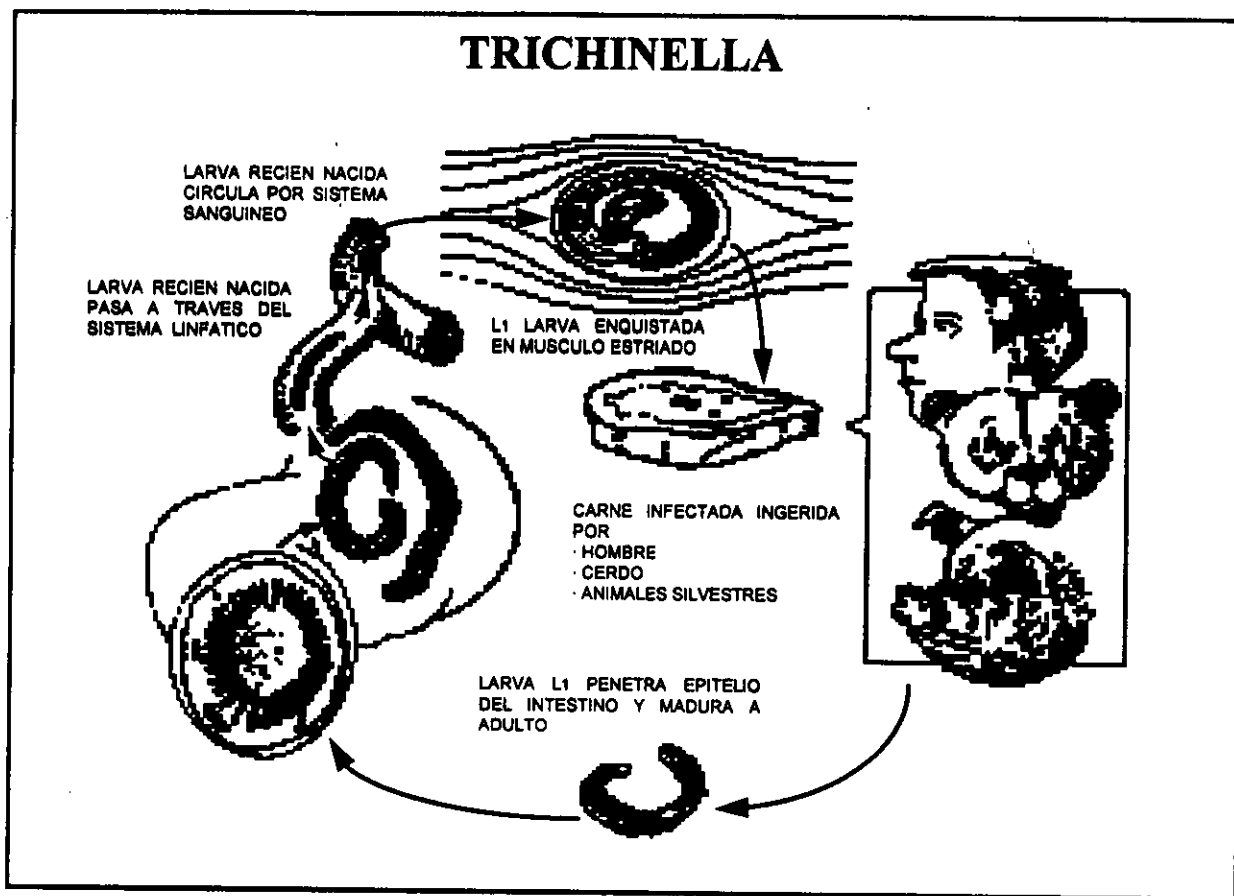


FIGURA 1.-Ciclo de vida de *Trichinella*. Tomado de Murell y cols., (1985).

El ciclo de vida de *T. spiralis* se inicia con la ingestión de la LM que se encuentra enquistada en el músculo esquelético de cerdos, osos etc., entre otras. Las larvas son liberadas de los quistes por efecto del medio ambiente estomacal (pepsina-HCl) y pasan al intestino delgado en donde sufre cuatro mudas y maduran a parásitos adultos (Dennis y cols., 1970). El esófago del organismo adulto consiste de una parte anterior pequeña y musculosa y una parte posterior más grande y glandular llamada esticosoma, cuyas células poseen gránulos secretores con componentes altamente antigénicos (Silberstein y Despommier, 1985). Tanto las hembras como los machos adolescentes penetran la mucosa intestinal en una proporción de 2:1.

A pesar de que *T. spiralis* es capaz de invadir cualquier parte del intestino delgado, normalmente se sitúa en el duodeno, donde se lleva a cabo la cópula dentro del nicho intracelular (Dick y Silver, 1980). Posteriormente, los machos mueren y son expulsados; las hembras aumentan de tamaño, penetrando a la mucosa intestinal llegando incluso al peritoneo y a los ganglios linfáticos mesentéricos. Posterior a la fecundación, las LRN permanecen durante algún tiempo en el útero de la madre, donde finalmente eclosionan y son expulsadas (Olsen, 1974).

En la fase parenteral, las LRN miden 100 μ de longitud por 6 de diámetro, la mayoría llega a los vasos linfáticos intestinales ó a las venas mesentéricas distribuyéndose a todo el cuerpo, alojándose en el tejido muscular (Harley y Gallicchio, 1971), preferentemente en músculo esquelético. Las LRN penetran la membrana de las células y maduran a LM, las cuales secretan sustancias que hacen que las células musculares se transformen en estructuras conocidas como

células nodrizas que permiten el desarrollo del parásito. (Despommier y Muller, 1976; 1991). La transformación de la LM se lleva a cabo aproximadamente de 21 a 28 días a partir de la entrada del parásito en la célula muscular. Algunos de los cambios que ésta sufre incluyen la agregación de mitocondrias, alargamiento del núcleo con la aparición de nucleolos prominentes y la hipertrofia del glicocáliz en una cubierta gruesa de colágena, desarrollando una compleja red de vénulas que al parecer facilitan el transporte de nutrientes. Esta estructura es independiente del resto del tejido muscular y a la vez exporta desechos metabólicos y productos derivados del parásito al espacio extracelular (Despommier, 1990; Baruch y Despommier, 1991). Se cree que la célula nodriza le sirve al parásito para protegerse de la respuesta inmunológica del hospedero (Bagheri y cols., 1986), además de conferirle resistencia para sobrevivir, hasta 4 días a -10°C en condiciones experimentales y a 58° por 4 min. (William y cols., 1988; Pozio, y cols., 1989). Con la forma enquistada se completa el ciclo de vida del parásito.

SINTOMATOLOGIA DE LA TRIQUINELOSIS

Durante la infección se presentan síntomas, así como reacciones fisiopatológicas que dependen de la intensidad de la infección y del desarrollo del ciclo de vida del parásito. Así, la ingestión de 500 o más larvas pueden producir una enfermedad moderada a severa, aunque se ha reportado que esta misma dosis puede causar la muerte. Los síntomas que se puede presentar cuando los adultos se encuentran en el intestino delgado son diarrea, dolor abdominal, náusea y vómito en el hombre, así como pérdida de fluido gastrointestinal y mala absorción, lo cual se asocia con inflamación duodenal que coincide con la infiltración de células inflamatorias cerca del sitio de infección. En esta etapa se puede detectar neutrófilos y un incremento en el número de CC y leucocitos. Dicha inflamación promueve la expulsión de parásitos adultos del intestino. En la etapa de migración de las LRN, hacia el tejido muscular y su posterior enquistamiento en el músculo, se manifiesta una debilidad generalizada, fatiga, dolor muscular, etc., aunado a estos síntomas se produce ensanchamiento del bazo y ganglios linfáticos mesentéricos, ocurriendo una destrucción parcial de áreas corticales y centros germinales de éstos, observándose también, un incremento en el número de eosinófilos en la sangre. La LM produce cambios en el tejido circundante, degranulación de células granulocíticas en el tejido cercano a la célula muscular invadida y asimismo ocurre un flujo de células inflamatorias, seguido de macrófagos y de la formación de granulomas.

CARACTERISTICAS DE ANTIGENOS DE *Trichinella spiralis*.

Cada fase de desarrollo de *T. spiralis* posee características particulares, ultraestructurales como bioquímicas e inmunológicas. En los últimos años se ha hecho la caracterización de diferentes moléculas antigénicas de la LM de *T. spiralis* debido principalmente a la participación de esta fase de desarrollo del parásito en la inducción de la inmunidad protectora. Estos antígenos pertenecen principalmente a la superficie y al esticosoma (órgano secretor) del parásito. Parkhouse y cols. (1981) han caracterizado las proteínas de superficie de la LM y demostraron la presencia de glicoproteínas de peso molecular de 47 kDa y 55 kDa, las cuales forman homodímeros para dar origen a moléculas de 90 kDa y 105 kDa, respectivamente. Estas moléculas son reconocidas por sueros de hospederos infectados con el parásito pero no por sueros infectados crónicamente con otras especies de nemátodos. Además, los autores demostraron que estos antígenos son especie y estadio específico. Asimismo, Almond y cols. (1986) demostraron los anticuerpos de sueros de humanos infectados con *T. spiralis* reconocen preferencialmente componentes de superficie (S) y de excreción/secreción (E/S) de la LM. Takahashi y cols. (1991) reportaron que los sueros de humanos infectados con este parásito contienen predominantemente anticuerpos de isotipos IgM que reconocen a los antígenos de S y de E/S.

Por otro lado, con el objeto de estudiar detalladamente los componentes de superficie de la LM de este parásito, diferentes grupos de investigación han producido anticuerpos monoclonales. Así, Ortega-Pierres y cols. (1984) obtuvieron un anticuerpo monoclonal (NIM-M1) el cual precipita a los cuatro

antígenos de superficie de la LM, previamente descritos por Parkhouse y cols. (1981). Ensayos inmunocitoquímicos empleando este anticuerpo monoclonal demostraron la presencia de epítomos compartidos en la superficie de la LM y de productos de E/S del parásito, sugiriéndose que la superficie del parásito puede originarse en los gránulos de los esticocitos (MacLaren y cols., 1987, Takahashi y cols., 1990). Además, el NIM-M1 reconoció el aparato secretor del adulto, lo cual tiene posiblemente implicaciones en la inducción de inmunidad, ya que la inmunización con la LM induce una expulsión acelerada del organismo adulto.

Es ampliamente reconocido que los antígenos de S y los productos de E/S participan en la inducción de inmunidad en contra de *T. spiralis* (Gamble, 1985; Ortega-Pierres y cols., 1989) y que estas moléculas son inmunodominantes y reconocidas por una gran variedad de hospederos, entre estos ratón cerdo, caballo, y humano (Arriaga y cols., 1989; Salinas-Tobón y cols., 1993; Yépez-Mulia y cols., 1996). Estudios recientes han demostrado que el epítomo responsable de esta inmunodominancia es un azúcar 3,6 didesoxihexosa (tivelosa), el cual es específico de *Trichinella* (Wisnewski y cols., 1993). Además, se observó que diversos anticuerpos monoclonales dirigidos contra la LM de *T. spiralis* tienen un patrón de reactividad específico hacia estos antígenos, los cuales se clasifican dentro del grupo TSL-1 (Appleton y cols., 1991; Ortega-Pierres y cols., 1996).

RESPUESTA INMUNE CONTRA *Trichinella spiralis*.

Debido a la diversidad y a la estadio-especificidad de los antígenos que presenta *T. spiralis*, éste constituye un estímulo antigénico complejo para el huésped el que monta una respuesta inmunológica humoral y celular específica (Wakelin y Denham, 1983).

La respuesta inmune en humanos contra infecciones con *T. spiralis* se ha estudiado principalmente a nivel de la respuesta humoral, determinándose la presencia de diferentes clases de inmunoglobulinas dirigidas contra el parásito, su cinética de aparición, así como el tipo de componente reconocido por estos anticuerpos.

Así, Salinas-Tobón y cols., (1996), identificaron clases y subclases de anticuerpos en respuesta a antígenos TSL-1 del parásito. Los autores analizaron 22 sueros de individuos involucrados en un brote en el Estado de México, los cuales se colectaron a 3, 4, 5, 7, 12, 15, 37 y 57 semanas p.i. En este estudio se observó una mayor respuesta de isotipos IgA, IgM e IgE en las semanas 5, 7 y 15 p.i., decreciendo paulatinamente en la semana 37 y 57 p.i. La respuesta de IgG alcanzó un pico máximo en la semana 5 p.i. y ésta se mantuvo hasta la semana 57 p.i. En este estudio se sugiere que los isotipos IgA e IgG₂ pueden ser usados como marcadores en una infección temprana y pueden ser usados en el diagnóstico y en estudios seroepidemiológicos de triquinelosis humana. Otros autores han sugerido que la presencia de IgG₄ e IgE pueden usarse como marcadores de una infección crónica (Ljungstrom y cols., 1988).

Mediante inmunolectrotransferencia (IET) se ha podido encontrar que los pacientes con triquinelosis, presentan un perfil inmunológico altamente homogéneo, ya que reconocen principalmente ocho antígenos de alto peso molecular y que al parecer corresponden a antígenos de superficie de la LM de *T. spiralis*, que también son detectados por anticuerpos policlonales o monoclonales de cerdos, conejos, ratas y ratones (Ortega-Pierres y cols., 1984; Appleton y cols., 1988; Arriaga y cols., 1989; Denkers y cols., 1990; Appleton y cols., 1991).

En modelos experimentales de triquinelosis, se induce la producción de diferentes clases de anticuerpos contra distintos estadios del parásito, así como en contra de distintos antígenos del organismo (Crandall y Crandall, 1972). De esta forma, se ha reportado que inmuglobulinas de la clase IgG₁ e IgG₂ de ratones infectados reaccionan principalmente con antígenos de células del esticosoma y cutícula de la LM, mientras que los anticuerpos de la clase IgA e IgM presentan reactividad contra la membrana del parásito (Takahashi y cols., 1991).

Estudios de Santamarina y cols. (1988) demostraron que antígenos provenientes de las fases enterales de *T. spiralis* (pre-adulto y adulto), así como de la LM inducen la producción de IgE, participando en reacciones de hipersensibilidad inmediata.

Por otro lado, la respuesta celular inducida por *T. spiralis* analizada experimentalmente en ratón y rata, se ha enfocado principalmente hacia la fase entérica (primer sitio de contacto con el parásito), caracterizada por la expulsión acelerada de los parásitos adultos, por la prevención de su crecimiento y por la

disminución de la fecundidad de la hembra (Despommier y cols., 1977; Wakelin y Wilson, 1980; Rothwell, 1989; Ramaswamy y cols., 1996)).

A este respecto, se sabe que la inmunidad hacia *T. spiralis* es timo dependiente y que el grado de resistencia a la infección está influenciado por genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (Grencis y cols., 1985; Wakelin y cols. 1985). Asimismo, diferentes autores demostraron que células T de animales infectados responden específicamente a componentes de la LM *in vitro*, produciendo componentes que *in vivo* inducen mastocitosis, eosinofilia y una expulsión acelerada de los parásitos del intestino (Krcó y cols., 1982, Riedliger y cols., 1986).

Además, en modelo murino se ha observado que durante la infección con *T. spiralis* se induce preferencialmente la población de linfocitos cooperadores TH2 (Grencis y cols. 1991). La inducción de TH2 se relaciona con los cambios inmunes observados en animales infectados con el parásito, como son: inflamación intestinal, mastocitosis, eosinofilia, niveles altos de IgE, ya que las células TH2 producen IL-3, IL-4 e IL-5. Estas moléculas son importantes puesto que pueden además de regular el número de CC y eosinófilos de la sangre periférica (Dillan y Mac Donald, 1986), pueden también participar en la producción de IgE (Mossman y cols., 1986). Romagnani (1992) sugirió que debido a que en general en infecciones por helmintos intestinales se induce una respuesta TH2 y considerando que las CC son productoras de IL-4, es posible que estas sean estimuladas por antígenos de parásitos intestinales y produzcan tempranamente IL-4 regulando la fase temprana de respuesta TH2 (FIGURA 2).

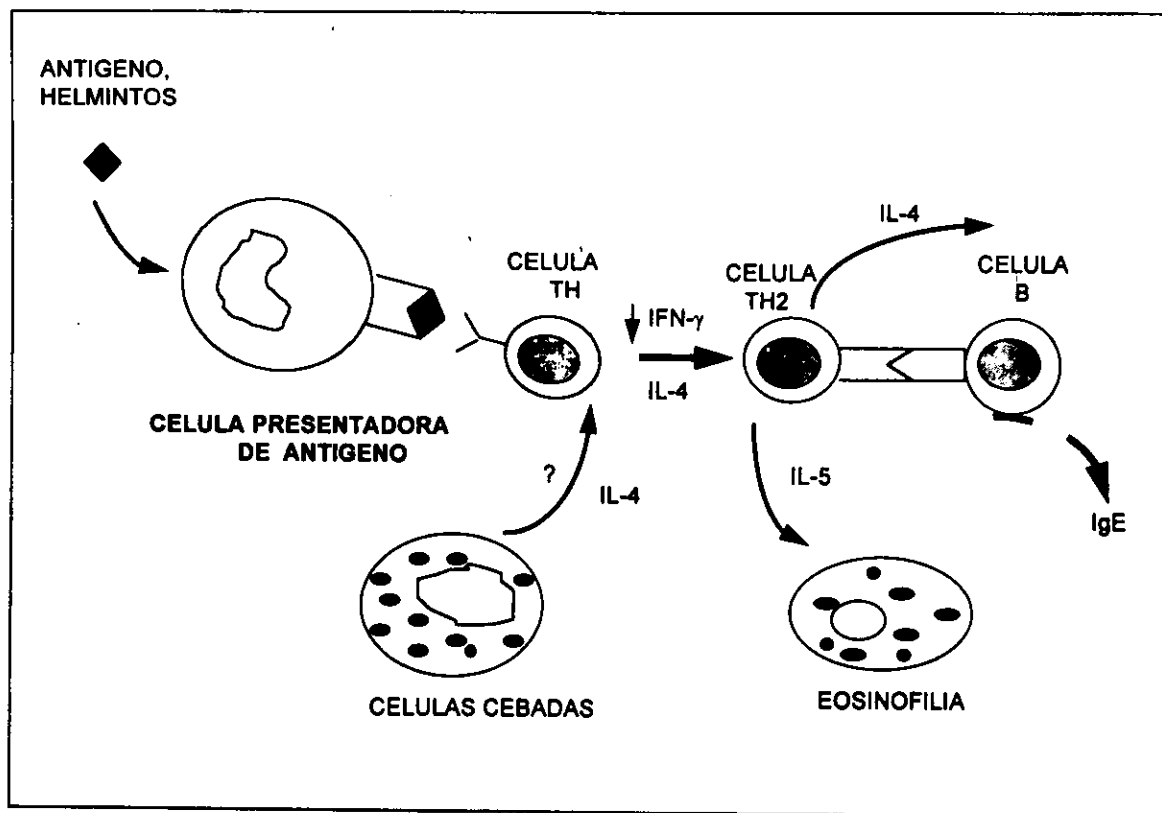


FIGURA 2. Participación de células cebadas en la inducción de una respuesta inmune tipo TH2, contra el parásitos helmintos.

Tomado de Romagnani, 1992.

También, se ha visto que la producción de IL-2 varía entre cepas de ratones con fenotipos diferentes para la expulsión de *T. spiralis* (buenos, medianos y bajos respondedores). Sin embargo, esta variación no se relaciona directamente con el haplotipo de H-2 ni con el fenotipo de expulsión del parásito de una cepa individual, por lo que se ha sugerido que los genes que

regulan la producción de IL-2 no se relacionan con aquellos que regulan la expulsión del parásito adulto (Zhu y Bell, 1990).

Se considera que en la triquinelosis experimental, la expulsión rápida de los organismos adultos de *T. spiralis* es a través de un proceso inflamatorio inespecífico en el intestino de animales infectados (Love y cols., 1976; Bell y McGregor, 1979; Bell y cols., 1982). El hecho de que el pre-adulto y LM del parásito induzcan la expulsión del adulto (Bell y cols., 1982; Wakelin y cols., 1979), podría explicarse en base a que el órgano secretor del adulto es reconocido por el anticuerpo monoclonal NIM-1 que reacciona con los antígenos de superficie y de E/S de la LM, lo que sugiere la presencia de epítomos compartidos en el adulto y la LM de *T. spiralis*.

Durante una infección primaria, se considera que se presentan varias fases: la primera, está representada por la expulsión de la larva infectiva, posteriormente, durante la segunda fase los parásitos sobrevivientes se establecen, maduran y son expulsados, dejando a una pequeña población residual (tercera fase). En infecciones secundarias la fase estacionaria se acorta y los parásitos son expulsados a una mayor velocidad (Rothwell, 1987), de tal forma que el proceso de expulsión en el intestino de ratones en una infección secundaria se da entre 5 y 8 días p.i. y en ratas se da en horas (Larsh, 1963).

En relación a la participación de CC en el proceso de expulsión, estudios en los que se emplearon ratones W/W y S1/S deficientes en CC mostraron que la infección con *T. spiralis* era prolongada, la fecundidad del parásito

aumentaba y se recuperon más LM de animales infectados deficientes en CC que en animales normales (Alizadeh y Murrell, 1984).

Asimismo, en ratones W/W el transplante de médula ósea ó CC de bazo de ratones normales restablece esta población de células, acelerando la expulsión de los organismos adultos (Oku y cols., 1984). Por otro lado, en cepas de ratones con fenotipos respondedores, el aumento en el número de CC se nota a partir del cuarto día de la infección, el cual coincide con el momento de la expulsión de los parásitos intestinales, declinando posteriormente (Alizadeh y Wakelin, 1982). A este respecto, McElroy y Befus (1987) demostraron con anterioridad la participación de histamina producida por CC en el proceso de expulsión. Los autores utilizaron un antagonista de ésta y obtuvieron en ratones una reducción considerable de la expulsión del parásito. Asimismo, la liberación de ciertas proteasas por CC de mucosa intestinal (RMCPII) se han asociado con la expulsión rápida de los organismos adultos de *T. spiralis*, sugiriéndose una relación entre resistencia a la infección con una liberación rápida de esta proteasa por CC (Woodbury y cols., 1984; Huntley y cols., 1990; Tuohy y cols., 1990) (TABLA 2.). La función de estas proteasas no se ha determinado, pero se sugiere que son las responsables de los cambios en la permeabilidad del epitelio intestinal promoviendo así el paso de moléculas en el lumen del intestino (King y Miller, 1984). Por otro lado, se ha demostrado *in vitro* que las proteasas de tipo II pueden degradar moléculas de tipo colágena presentes en la cutícula de *Necator americanus*, alterando la integridad estructural de la cutícula de este parásito (McKean y Pritchard, 1989).

Tabla 2.-Niveles de Proteasa II producida por células cebadas intestinales (CCI), determinados en lavados intestinales de cepas de ratones con diferente capacidad de respuesta contra la infección de *T. spiralis*.

μg Proteasa II /mg de proteína			
Días p.i.	NIH ^a	SWR ^b	BIO ^c
0	0.06	0.06	0.00
6	6.95	6.95	0.87
9	131.82	8.42	5.41
12	12.74	2.63	4.81
15	32.94	36.09	3.74
20	15.75	18.42	9.35
32	1.44	3.80	2.99
38	8.39	11.20	4.38

Los ratones fueron desafiados en el día 32 post-infección.

a) respuesta buena; b) respuesta moderada; c) respuesta baja.

Tomado de Tuohy y cols., 1990.

Otros mediadores liberados por CC como los leucotrienos, inducen una hipersecreción de mucus e incrementan la peristalsis, impidiendo posiblemente el establecimiento de la infección y promoviendo la expulsión de los parásitos (King y Nutman, 1992).

En cuanto a la participación de IgE en la expulsión de *T. spiralis*, Ahmad y cols. (1991), demostraron que la transferencia pasiva de esta inmunoglobulina, purificada de sueros de ratas infectadas con el parásito era capaz de mediar la expulsión rápida de organismos adultos en ausencia de otras Igs. Sin embargo, la participación de IgE en el proceso de expulsión es controvertida. Así, Watanabe y cols. (1988) empleando ratones de la cepa SJA/9 deficientes en IgE infectados con *T. spiralis*, demostraron que los números de LM en estos ratones y en ratones controles eran muy similares, lo que sugirió que las IgE específicas contra el parásito no participan en la respuesta inmune protectora. Más recientemente, Negrao-Correa y cols. (1996), demostraron la presencia de IgE en el lumen intestinal de ratas infectadas con *T. spiralis*, determinado por IET que estas IgE reconocía antígenos de la LM y del adulto del parásito.

Considerando lo anterior se ha sugerido que las CC y anticuerpos de la clase IgE interactúan con diversas moléculas del parásito provocando liberación de mediadores de la respuesta inflamatoria por estas células (Woodbury y cols. 1984; Tuohy y cols., 1990).

Por otro lado, la participación activa de otras células inflamatorias como el caso de eosinófilos en el fenómeno de expulsión de los organismos adultos de *T. spiralis* ha sido documentada.

Wilkes y Goven (1984), observaron en ratones BALB/c infectados con *T. spiralis*, aumento en el número de eosinófilos en médula ósea, sangre periférica e intestino delgado a partir del día 7 de la infección, alcanzando el pico máximo al día 10 en médula ósea y al 14 en sangre periférica e intestino delgado; mientras que Pincus y cols. (1986) encontraron que el aumento de eosinófilos dependía de la cepa de ratón, presentando dos picos de eosinofilia en sangre periférica, el primer incremento entre los días 5 y 9 y el segundo entre el día 16 y 22 de la infección.

Sin embargo, existen evidencias que indican que los eosinófilos son un componente minoritario en los infiltrados celulares inducidos durante una infección con este parásito (Lamas y cols., 1992). Además, el bloqueo de la repuesta de eosinófilos *in vivo* por administración de anticuerpos contra IL-5 no afecta el proceso de expulsión (Wakelin, 1993).

No obstante, los eosinófilos han sido relacionados en la prevención de la infección. Algunos estudios *in vitro* han demostrado que los eosinófilos de la circulación sanguínea y de la cavidad peritoneal de ratas y de humanos, son capaces de destruir las LRN y así prevenir su establecimiento en el músculo. Así, ensayos de citotoxicidad mediada por anticuerpos, muestran que los eosinófilos se adhieren y destruyen a las LRN de 2 h de edad (Kazura y Grove, 1978; Wakelin y Denham, 1983; Gansmuller y cols., 1987; Lee y Befus, 1989).

Poco se sabe acerca de los mecanismos de daño dirigidos hacia la LM, sin embargo, se ha visto *in vitro* que los eosinófilos se adhieren mediante la unión

de anticuerpos a las LM en condiciones aeróbicas y anaeróbicas y que esta adherencia se inhibe por la presencia de leucotrienos (Pincus y Cammarata, 1985).

BIOLOGIA DE LAS CELULAS CEBADAS

Las CC se derivan de precursores hematopoiéticos pluripotenciales presentes en la médula ósea y que en los humanos expresan el antígeno CD34 (Kirshenbaum y cols., 1991). Los progenitores de las CC migran a los vasos periféricos como células inmaduras y luego experimentan diferenciación *in situ* a través de la acción de sustancias presentes en el microambiente local (Abbas y cols., 1993). Durante el desarrollo y bajo la influencia de la IL-3, factor estimulador precursor de diferenciación y crecimiento de las CC (FECC) y de la IgE, los precursores llegan a diferenciarse para formar este linaje celular (Ashman y cols., 1991).

Las CC maduras se encuentran distribuídas por todo el cuerpo, principalmente localizadas cerca de los vasos sanguíneos, de los nervios o por debajo del epitelio, en la superficie de la piel, en el sistema respiratorio, en el tracto gastrointestinal y genitourinario, adyacentes a los vasos sanguíneos o linfáticos. Dado que este tipo de células se encuentran en tan diversos, es amplia la oportunidad de tener contacto con parásitos, bacterias u otros patógenos o con antígenos ambientales, siendo así como los componentes de éstos pueden en un momento dado activar a las CC (Bissonnette y Befus, 1990; Bissonnette y Befus, 1993; Galli, 1993; Befus, 1994; Malaviya 1996).

Actualmente se reconoce la existencia de heterogeneidad poblacional en CC en ratas, identificándose dos subpoblaciones de CC: una directamente ligada a mucosas (CCM), y otra directamente asociada a tejido conectivo (CCTC). Un rango principal que distingue a las CC son propiedades de tñido y

sensibilidad a agentes de fijado. Las CCM se tiñen solamente con azul de toluidina ya que contienen sulfato de condroitina como el principal componente de los proteoglicanos, pero con poca cantidad de histamina. La tinción metacromática en CCTC se realiza con azul alcalino y rojo de safarina-O, demostrando la presencia de heparina en grandes cantidades como principal proteoglicano y 15 a 20 veces más cantidad de histamina (Enerback, 1966). Estas poblaciones son distintas en cuanto a su respuesta a factores de crecimiento y diferenciación liberados por células del sistema inmune (Befus y cols., 1987). Así, las CCM proliferan en respuesta a infecciones por helmintos, dependiendo de citocinas derivadas de linfocitos T, como son IL-3 e IL-4 (Romagnani, 1994). La neutralización de estas citocinas mediante anticuerpos da como resultado la ausencia de mastocitosis (Madden, 1991). Mientras que el desarrollo de CCTC es independiente de factores producidos por estos linfocitos y es más dependiente de factores producidos por fibroblastos (factor de crecimiento de células cebadas ó SCF)(Abbas y cols., 1993).

Estas dos subpoblaciones de CC también difieren en sus propiedades morfológicas e histoquímicas en cuanto al contenido de mediadores y en cuanto a su activación e inhibición con diferentes moléculas (Befus y cols., 1986). Así, la localización en tejidos de las diversas poblaciones de CC es importante en cuanto a la defensa del hospedero y en su contribución para procesos inflamatorios y alérgicos. En la tabla 3 se muestra algunas de las características de las CCM y las CCTC.

Las CC expresan receptores de alta afinidad para la región FC de IgE (FcεRI) y receptores de baja afinidad para las regiones Fc de IgG (Katz y cols.,

1990; Tigelaar y cols., 1971). Fc γ RII e Fc γ RIII son miembros de la familia de receptores de reconocimiento inmune, los cuales también incluyen el receptor de células T (TcR) y el receptor de células B (Keegan y cols., 1992; Reveth y Kinet, 1991). Ambos receptores Fc ϵ RI y Fc γ RIII consisten de distintas uniones con cadenas α (Fc ϵ RI- α y Fc γ RIII- α), cuyos dominios extracelulares son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Fc ϵ RI- α está asociado en la membrana con cadenas β (Fc ϵ RI- β $\beta\epsilon$) y cadenas γ (Fc ϵ RI- γ o $\gamma\epsilon$), formando un complejo tetramérico (Metzger, 1983). La subunidad β se extiende a través de la membrana plasmática y representa un canal iónico transmembranal. Es así que la transducción de señales vía receptores Fc ϵ RI es mediada por aminoácidos presentes en los dominios del citoplasma de las cadenas β y γ (Reth, 1989).

TABLA 3. Diferencias estructurales y funcionales entre CCM y CCTC en ratas.

Parámetro	CCTC	CCM
Localización en tejidos	Submucosa del intestino delgado, piel , músculo esquelético, superficies serosas.	Mucosa del intestino delgado, lamina propia.
Tinción Histoquímica:		
Azul alcalino	+	+
Safarina-O	+	-
Sulfato de Berberine.	+	-
Contenido de Histamina (pg/cel)	1-30	0.1 - 2.0
Proteinasas	RMCP1	RMCP2
Proteoglicanos	Heparina	Condrintín sulfato.
Metabólitos Araquidónicos (pg/cel):		
LTC ₄	-	29
LTB ₄	-	12
PGD ₂	7.5 - 13.0	4.7
Respuesta a secretagogos:		
IgE + antígeno	+	+
Ionóforo de Calcio	+	+
Sustancia P	+	+
Componente 40/80	+	-
Dextran/fosfatidilserina	+	-
Inhibición de activación:		
Cromaglicato desodio	+	-
Teofilina	+	-
Quercetin	+	+
Doxantrazol	+	+

Tomado de McNeil y Austen 1995.

Cuando las CC son expuestas a antígenos multivalentes específicos o a complejos inmunes, unidos a sus receptores FcεRI o FcγRIII dan como resultado una serie integrada no-citolítica de eventos de expresión de "activación". La activación por la unión de receptores da como resultado la degranulación celular o exocitosis, caracterizada por la liberación de un número de mediadores preformados con actividad biológica, la biosíntesis y secreción de nuevos mediadores derivados de ácido araquidónico y la síntesis o secreción de un amplio panel de citocinas.(FIGURA 3).

Los mediadores sintetizados de novo después de la activación incluyen el factor activador de plaquetas (PAF), diferentes citocinas, metabolitos del ácido araquidónico y al óxido nítrico (NO₃); entre los preformados almacenados en los gránulos citoplásmaticos se encuentran histamina, proteoglicanos, proteinasas, factores quimitácticos y TNF-α (Bissonnette y Befus, 1993).

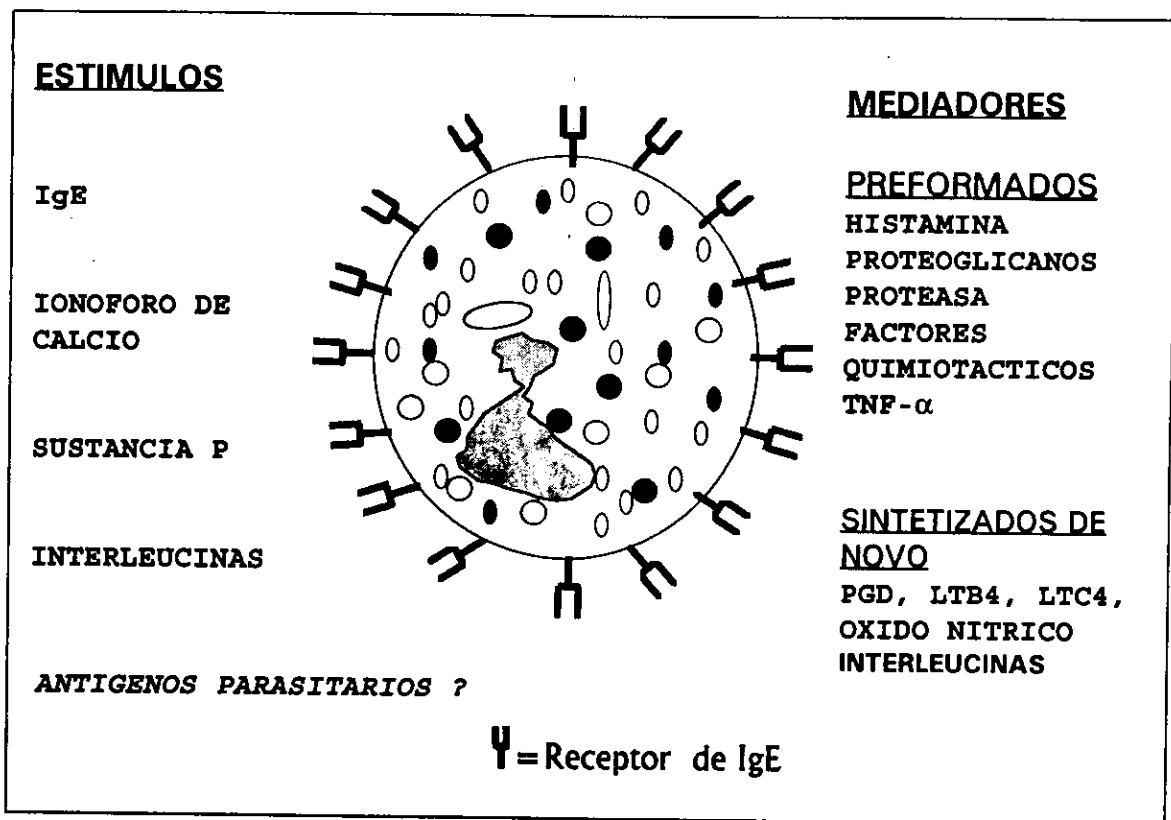


FIGURA 3.- Activación de células cebadas, mediante diferentes estímulos y liberación de mediadores.

Los mediadores que son liberados por las CC se dividen a su vez en solubles e insolubles. Los primeros son aquellos que se encuentran en la circulación después de la liberación como: histamina, serotonina, proteasa II (de rata), triptasa (de humano), exoglicosidasa y factores quimiotácticos para los neutrófilos y eosinófilos. Los mediadores insolubles incluyen heparina, sulfato de condroitina, proteasa I (de rata), carboxipeptidasa, peroxidasa y superóxido dismutasa, entre otras.

Por otra parte, el número de citocinas producidas por CC es amplio y sus acciones y funciones son complejas. Se sabe que algunas de ellas juegan un papel muy importante en infecciones por helmintos (Del Prete y cols., 1994), como es el caso de la IL-4 e IL-10, que participan activamente en la regulación de la respuesta inmune. Asimismo, las CC de roedores y de humanos son fuente prominente de TNF- α (Bissonnette y Befus, 1990, Gordon y Galli, 1991). Esta molécula se encuentra preformada en grandes cantidades y tiene efectos importantes en procesos inflamatorios.

Por otro lado, entre las funciones biológicas de los mediadores liberados por CC se encuentran contracciones musculares en el tracto gastrointestinal y bronquial, vasodilatación, incremento en la permeabilidad vascular, provocan la activación sensorial de células nerviosas (histamina); incrementa la secreción de fluido y moco provocando la contracción del músculo liso (histamina, prostaglandina D2 [PGD2], péptido sulfito, leucotrieneos, triptasa y quimasa). Algunas moléculas como TNF- α , PAF y leucotrieno C4 (LTC4) pueden causar vasoconstricción; otras como leucotrieno B4 (LTB4), PAF y algunos factores quimiotácticos pueden reclutar y activar neutrófilos y eosinófilos o junto con histamina inhibir la síntesis de TNF- α a partir de los macrófagos (Vannier y cols., 1991).

Además, un número de efectos inmunomoduladores son mediados por histamina, incluyendo inhibición mitogénica y proliferación de células T inducidas por antígenos e inhibición de neutrófilos, el enriquecimiento de la actividad de células NK, también aumenta la quimiotaxis de neutrófilos y eosinófilos (McNeil y Austen, 1995).

De esta forma, la localización de las CC así como su gran potencial en la producción de diferentes mediadores de procesos inflamatorios hacen de ellas componentes celulares importantes en la respuesta inmune contra parásitos, especialmente helmintos intestinales.

ANTECEDENTES

Las enfermedades infecciosas por parásitos helmintos, son un problema de salud pública y veterinario en muchas partes del mundo, incluyendo nuestro país, ocupando uno de los primeros lugares como causa de morbilidad que afectan principalmente a la población infantil (Maziel y cols., 1982; Cedillo-Rivera 1990).

La mayor parte de las helmintiosis se sitúan en la luz intestinal; sin embargo, algunas de ellas tienen diseminación sistemática y se alojan en diversos tejidos. Ejemplos de estas son la fasciolosis, cisticercosis y triquinelosis (Kumate y cols., 1994). La mayoría de las infecciones helmínticas son crónicas o sub-agudas y sólo en algunas ocasiones se adquiere protección contra la infección. Los mecanismos involucrados en la respuesta inmune contra enfermedades helmínticas no se conocen en detalle; esto puede deberse a que éstas son muy diversas, además de presentar diferencias con respecto a la interacción huésped-parásito y de que el ciclo de vida de cada parásito es muy complejo, comprendiendo varias fases de desarrollo. Además, en términos generales el estudio de la infección por parásitos helmintos tiene otra limitante, como es el no contar con modelos experimentales que permitan reproducir su ciclo de vida y por lo tanto llevar a cabo estudios sobre la respuesta inmune del huésped contra el parásito.

A pesar de esto, en algunas helmintiosis se ha demostrado que el tipo de respuesta inmune inducida contra cada fase del ciclo de vida del parásito es

muy diferente, siendo en algunos casos del tipo humoral y en otros del tipo celular.

El avance en el estudio y manipulación de mecanismos inmunológicos en la relación huésped-parásito está íntimamente ligada con la identificación de antígenos protectores (estructurales y moleculares), así como la determinación de las fases de desarrollo del parásito que son vulnerables a la respuesta inmune del huésped y los mecanismos efectores que participan en la destrucción del parásito.

La mayoría de las investigaciones realizadas sobre la inmunidad en infecciones por helmintos intestinales para las cuales existen modelos experimentales, se han realizado sobre la inmunidad gastrointestinal. Estas indican que los mecanismos de defensa de la mucosa en el intestino está dividida en tres componentes principales: exclusión inmune, regulación inmune y/o eliminación inmune (Brandtzaeg, 1985). La exclusión inmune representa la primera línea de defensa y se refiere a la protección de la superficie de la mucosa por medio de anticuerpos (IgA e IgM secretoras) y otros factores innatos; la regulación inmune es un complejo mecanismo de defensa de segunda línea, involucra la respuesta celular específica, en las placas de Peyer y de tejidos linfoides asociados, incluyendo la diferenciación y la activación de células B y la interrelación entre subpoblaciones de células T; por otro lado, la eliminación inmune involucra un número de reacciones inflamatorias con una amplificación y aumento de actividades de protección en la capa de la mucosa.

de la clase IgM, también son transportados a través del epitelio, sin embargo, los anticuerpos de la clase IgG pasan al lumen del intestino como resultado del proceso inflamatorio inducido, siendo degradados rápidamente. Asimismo, la IgE se encuentra en la mucosa intestinal, pero su origen es incierto, sugiriéndose a las CC como posibles responsables de su transporte en la lamina propia.

Por otro lado, anticuerpos de la clase IgG, pueden inactivar la biología de antígenos parasitarios solubles y mediar el reconocimiento de moléculas de superficie del parásito promoviendo la adherencia de eosinófilos, macrófagos y neutrófilos. Asimismo, anticuerpos de las clases de IgG e IgM activan el complemento originando la adherencia de fagocitos a la superficie del parásito (Roitt, 1991). Como resultado de esto, estas células liberan enzimas lisosomales y otros factores citotóxicos que llevan a la destrucción del helminto.

En relación al estudio de la triquinelosis, enfermedad causada por el parásito del género *Trichinella* resulta de gran interés, no sólo porque la enfermedad representa un problema de salud en muchas partes del mundo, sino porque proporciona un buen modelo para el estudio de enfermedades causadas por helmintos. El ciclo de vida de este parásito, así como los síntomas asociados con la enfermedad pueden ser reproducidos en animales de investigación incluyendo ratas y ratones. Además, su ciclo de vida se realiza en tres diferentes compartimientos de un mismo hospedero (incluyendo una fase intestinal y una parenteral) y en un tiempo relativamente corto, lo que hace posible estudiar la relación huésped-parásito, así como obtener diferentes fases de desarrollo del parásito para su estudio en condiciones experimentales.

LM de *T. spiralis* en la activación de CC, ya que estas moléculas son inmunodominantes e inducen una respuesta inmune protectora (Ortega-Pierres y cols., 1989; Robinson y cols., 1991). El estudio de la participación de estos antígenos en la inducción de una respuesta inflamatoria local a través de los cambios en la producción y liberación de moléculas mediadoras de respuesta inflamatoria por CCM intestinal, permitiría entender el proceso de expulsión; la cual se da tempranamente después de una infección primaria así como la inducción de una respuesta TH2. Además, este tipo de estudio permitirá contribuir al conocimiento de los mecanismos involucrados en la respuesta inmune local en contra de *T. spiralis*, además de ofrecer perspectivas para entender los mecanismos inmunes que se desarrollan en enfermedades causadas por otros parásitos helmintos.

JUSTIFICACION

El proceso de expulsión del organismo adulto de *T. spiralis* es considerado como un importante mecanismo de defensa del hospedero. La participación de células cebadas (CC) y de IgE ha sido ampliamente demostrada, sugiriendo la interacción de ambos componentes y la liberación de mediadores de inflamación como histamina, proteasas y leucotrienos (Huntley y cols. 1980, Tuohy y cols., 1990; Woodbury y cols., 1984).

Estudios en modelos animales indican una correlación temporal entre la mastocitosis de mucosa y la expulsión de parásitos adultos de *T. spiralis* en una infección primaria (Alizadeh y Murrell, 1984). Asimismo, se observa una asociación entre la liberación de mediadores inflamatorios (proteasas, leucotrienos) de CC de rata con la pérdida del parásito (Moqbel R. 1987, Tuohy y cols., 1990). La liberación de mediadores químicos se asocian con un incremento en la permeabilidad intestinal, activación de eosinófilos, hiperproducción de moco, e incremento en la peristalsis, propiciando un medio hostil para el parásito.

Por otro lado, durante la fase intestinal de la infección por *T. spiralis* se reconoce actualmente la inducción preferencial de células cooperadoras del tipo TH2 (Grencis y cols., 1991). A este respecto, Romagnani (1992) ha sugerido que una posible explicación a la inducción de TH2 por helmintos intestinales sea la activación temprana de CC por antígenos parasitarios y dado que este tipo celular produce diferentes interleucinas, entre ellas IL-4, sea a través de esta que se lleve a cabo una inducción de TH2 y una inhibición de TH1.

Lo anterior requeriría de la activación de CC por antígenos de *T. spiralis* mediante un mecanismo independiente de IgE, lo cual sería de gran importancia no sólo en la respuesta inmune innata en contra del organismo adulto en una respuesta primaria, sino también en la regulación de una clase de mecanismos inmunes que finalmente determinan el curso de la infección.

En la literatura existen evidencias que indican que antígenos de *N. brasiliensis* y *A. suis*, inducen la degranulación directa de CC (Murray y cols., 1968). En el caso *T. spiralis* no se han determinado moléculas del parásito capaces de inducir una activación de CC independiente de IgE. Sin embargo, se sabe que la LM induce la expulsión del adulto y que esta fase de desarrollo del parásito induce una respuesta inmune protectora. Entre las moléculas de la LM mejor caracterizadas se encuentran los antígenos de superficie, los cuales son componentes inmunodominantes, reconocidos por una gran variedad de hospederos (Arriaga y cols., 1989; Salinas-Tobón y cols., 1993; Yépez-Mulia y cols., 1996). Considerando lo anteriormente mencionado, resulta de gran relevancia analizar la estimulación de CC por antígenos totales y de superficie de la LM de *T. spiralis* mediante un mecanismo independiente de IgE. Para determinar este tipo de activación se medirán los niveles de histamina presentes en sobrenadantes de CC de ratas no infectadas con el parásito, activadas con diferentes concentraciones de las dos preparaciones antigénicas de *T. spiralis*. La cuantificación de histamina se realizará empleando un método fluorométrico (Siraganian, 1974).

Asimismo, debido a que el contenido de histamina en las CC de peritoneo (CCP) es mayor que el de las células cebadas de mucosa (CCM), los ensayos de

activación se realizarán empleando CCP. Como control negativo se incluirán CC sin tratamiento con el antígeno y como control positivo CC en presencia del ionóforo de calcio A23187. En este trabajo de tesis también se realizará un análisis comparativo con CCP provenientes de ratas infectadas con *T. spiralis*, activadas con los antígenos parasitarios.

Los resultados que se obtengan de este estudio serán de gran importancia para el entendimiento de la participación de las CC en el proceso de expulsión del organismo adulto de *T. spiralis* durante la fase temprana de este proceso, así como de la regulación temprana de la respuesta local contra este parásito. El conocimiento generado de este estudio con *T. spiralis* podrá extrapolarse a otras infecciones por helmintos intestinales.

OBJETIVO GENERAL

- Analizar la estimulación de células cebadas de peritoneo de rata, por antígenos estadio específicos de *Trichinella spiralis* mediante un mecanismo independiente de IgE.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar de la liberación de histamina de células cebadas de peritoneo de ratas no infectadas (independiente de IgE) e infectadas (dependiente de IgE) como marcador de activación, estimuladas *in vitro* con antígenos totales y de superficie purificados de la larva muscular de *T. spiralis*, empleando un ensayo fluorométrico.
- Determinar la cinética de la liberación de histamina de células cebadas de peritoneo de ratas tanto sensibilizadas y no sensibilizadas con *T. spiralis*. estimuladas con antígenos totales y de superficie purificados del parásito.
- Evaluar la dosis-respuesta de la liberación de histamina en la estimulación por antígenos del parásito en los mecanismos dependiente e independientes de IgE.

METODOLOGIA

MANTENIMIENTO DEL CICLO DE VIDA DE *Trichinella spiralis* Y OBTENCION DE LA LARVA MUSCULAR DEL PARASITO.

El ciclo de vida de *T. spiralis* se mantuvo en ratas de la cepa *Sprague Dawley* de tres a seis meses de edad, las cuales se infectaron experimentalmente con 3,000 LM del parásito, por vía intragástrica de acuerdo al método descrito por Dennis y cols. (1970).

Posteriormente, ratas infectadas con el parásito fueron sacrificadas 28 días p.i. A estas se les quitó la piel; las extremidades y la cabeza fueron cortadas, retirando las vísceras, quedando únicamente el esqueleto y el tejido muscular, los cuales fueron macerados. El material obtenido se colocó en una solución de pepsina-HCl al 1% (Pepsina, P-7125. Sigma Chemical C.O. St. Louis M.O., U.S.A.; HCl, 208426 Merck-México, S.A. Edo. de Méx.) y se incubó durante 3 h a 37°C con agitación constante. La mezcla de digestión se tamizó y se vertió en un embudo grande dejando las larvas sedimentar por 10 min. Una vez realizado lo anterior, las larvas se colectaron en tubos falcon cónicos (Corning-Costar. Cambridge, M.A., U.S.A.) de 15 mL y se centrifugaron a 2500 rpm por 3 min en una centrífuga clínica (Centrífuga Sorvall 5RMC 14 Du Pont. N.J., U.S.A.). El sobrenadante se decantó y las larvas fueron lavadas varias veces en amortiguador de fosfato salino (PBS) (ANEXO A). Para la determinación del número de larvas obtenidas, éstas se resuspendieron en bacto agar al 0.2% (Bacto-Agar 0140-01 Difco Laboratories, Detroit Michigan U.S.A.) y se hizo una dilución 1:100, tomándose 5 alícuotas de 5 µL, las cuales se observaron al microscopio óptico

(BHA, Olympus, Tokio Japón) procediéndose a contar las larvas y calculándose el promedio de estas.

Las larvas así obtenidas se emplearon para mantener el ciclo de vida del parásito y en la preparación del extracto total (ET) soluble de la LM.

OBTENCION DEL EXTRACTO TOTAL DE LA LARVA MUSCULAR DE *Trichinella spiralis*.

El extracto total (ET) soluble de la LM a partir del cual se purificaron los antígenos de superficie (S), se obtuvo siguiendo el método reportado por Parkhouse y cols. (1981). Así, un paquete de 1.0 mL de LM se resuspendió en 1 volumen de amortiguador de trisma-base 10 mM, pH 8.3, (Sigma Chemical C.O. St. Louis, M.O., U.S.A.) conteniendo inhibidores de proteasas (N- α -p Tosil-L-Lisina Clorometil cetona (TLCK) 50 μ g/mL diluido en etanol, Fenilmetil-sulfonil Fluoruro de (PMSF) 25 μ g/ml diluido en isopropanol y L-1-Tosilamida-2-fenil etilclorometil cetona (TPCK) 174 μ g/mL diluido en agua). Los inhibidores empleados son de Sigma Chemical C.O. St. Louis, M.O., U.S.A.

Los parásitos se homogenizaron durante 20 min a 4° C con un homogenizador manual (Poter Wheaton Seant life; Springfield N.J., U.S.A). Posteriormente, se agregó Deoxicolato de Sodio (DOC) al 4% homogenizando los parásitos y dejándose reposar durante 20 min. Pasado este tiempo se homogenizaron nuevamente por otros 20 min. El extracto se clarificó mediante centrifugación a 12,000 rpm por 30 min a 4°C en una centrífuga eppendorf (5415 C. Brinkmann Instruments Inc. Germany).

Por otra parte, para la obtención del ET que fue utilizado en los ensayos de activación de CC, los parásitos se homogenizaron como se describió anteriormente, pero sólo se utilizó PBS sin DOC, para evitar daño a las células siguiendo el método descrito por Jarvis y Pritchard (1992).

La cuantificación de los antígenos proteicos se hizo mediante el método de Lowry y cols., (1951) (ANEXO D), con algunas modificaciones. En la cuantificación del ET obtenido con DOC, la curva estandar se preparó con albumina sérica bovina (ASB) a difentes concentraciones, añadiéndose DOC a una concentración final de 4%.

IMNUNOPURIFICACION DE LOS ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE LA LARVA MUSCULAR DE *Trichinella spiralis*

La purificación de los componentes de S de la LM se realizó mediante una columna de afinidad empleando el anticuerpo monoclonal NIM-M1 (el cual reconoce antígenos de S de este estadio de desarrollo del parásito) acoplado a Sefarosa 4B de acuerdo al método descrito por Parkhouse (1984).

El anticuerpo monoclonal unido a Sefarosa 4B se empacó en una columna (Bio Rad; C.A., U.S.A) de 1.3 x 30 cm. La columna de afinidad se lavó con un volumen de agua bidestilada y amortiguador Alkali-strip (ANEXO A) y se equilibró con un amortiguador de Columna (ANEXO A) hasta que el pH de la resina fuera igual al de la solución.

Posteriormente, el ET de la LM (aproximadamente 20 mg) se centrifugó a 130,000 rpm por 10 min en una microultracentrífuga (Air-Fuge, Beckman), para descartar precipitados que pudieran interferir con la cromatografía. El sobrenadante se pasó sobre la columna tres veces y esta se lavó con amortiguador de columna hasta que la Densidad Óptica (D.O) de las fracciones colectadas fuera de 0.0, midiendo la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro (DU-65, Beckman). La elución del antígeno adherido a la columna se realizó en condiciones de pH básico, empleando dos tipos de amortiguadores: Pre-strip (ANEXO A) y Alkali-strip. El cambio de amortiguador se realizó de acuerdo a la D.O. de las fracciones colectadas y el material eluido fue colectado en fracciones de 0.5 mL. Las fracciones recuperadas durante la elución con Alkali-strip que contenían proteína, fueron inmediatamente neutralizadas a pH 8.3 por adición de

una solución de Tris-HCl 1M. De acuerdo al patrón de elución, las fracciones que contenían proteína se juntaron y se dializaron extensivamente con amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 8.3. La concentración de proteína de las muestras colectadas se determinó por el método de Lowry y cols., (1951), modificado. En algunos casos se requirió concentrar las muestras, para lo cual se empleó Acuazide (Calbiochem, San Diego, Ca. USA).

Al término de la elución, la columna se reconstituyó con dos volúmenes de amortiguador de columna, dos volúmenes de agua bidestilada y con PBS, hasta que el pH de la resina fuese igual al de este último. La resina se preservó en PBS con Azida de Sodio al 0.1%.

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA BAJO CONDICIONES REDUCTORAS (PAGE-SDS).

El análisis electroforético de las proteínas del ET crudo y de los antígenos de S purificados de la LM de *T. spiralis* se realizó en geles de poliacrilamida al 10 % en presencia de SDS, de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970).

En el análisis electroforético se empleó una cámara de electroforesis miniprotean (Hoeffer Scientific Instruments, San Fco. Ca. USA). Para preparar los geles, se añadió el gel espaciador al 10% (ANEXO B) entre los vidrios, inmediatamente después se agregaron 2 mL de Isopropanol para lograr una polimerización uniforme del gel. Posteriormente, se lavó el gel espaciador con agua para eliminar el isopropanol y se colocó un peine de 10 pozos, adicionándose el gel concentrador al 5% (ANEXO B) dejándose polimerizar por 15 min. Después de esto, el peine se retiró y los pozos se lavaron con el amortiguador de corrida (ANEXO B). En cada pozo se cargaron 50 µg de proteína, a los cuales se les añadió primeramente el amortiguador de muestra 5X (ANEXO B) y se hirvieron por 5 min en presencia de β-Mercaptoetanol (Bio Rad, Richmond, Ca. USA). La mezcla se mantuvo en hielo hasta que se cargó en el gel. El corrimiento electroforético se realizó con amortiguador de corrida, inicialmente a 100 V hasta que penetrara la muestra al gel concentrador y después se aumentó el voltaje a 140 V y se dejó correr por espacio de 2 h.

En el análisis electroforético se incluyeron Marcadores de Bajo Peso Molecular (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia): fosforilasa b (94 kDa, albúmina (67 kDa), ovalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbonica (30 kDa),

inhibidor de tripsina (20 kDa) y lactoalbúmina (14 kDa). Una vez transcurrido el corrimiento electroforético, los geles se tiñeron con azul de Coomasie al 0.1% y se destiñeron posteriormente con ácido acético al 7.5% y metanol al 50%.

DETERMINACION DE Ig TOTALES E IgE ESPECIFICAS CONTRA LA LARVA MUSCULAR DE *Trichinella spiralis* EN SUEROS DE RATAS INFECTADAS CON EL PARASITO, EMPLEANDO EL METODO DE ELISA.

El ELISA se realizó siguiendo el método descrito previamente por Arriaga y cols., (1989). Las placas de ELISA (Nunc-Inmuno Plate, Iter Med, Dinamarca) se sensibilizaron con el ET de la LM de *T. spiralis* a una concentración de 20 µg/mL en amortiguador de carbonatos (ANEXO A). El acoplamiento se llevó a cabo incubando la placa toda la noche a 4 °C y posteriormente los sitios en los que no se adhirió el antígeno se bloquearon con PBS-Tween-20 al 0.5 % y ASB 0.5 % a temperatura ambiente por 1 h. Las muestras de suero de ratas no infectadas e infectadas con la LM de *T. spiralis*, se diluyeron 1:10 en PBS-Tween-20 al 0.5% y ASB 0.5% y se incubaron 4 h a 37 °C. Posteriormente la placa se lavó con PBS-Tween-20 al 0.5 % 3 veces durante 3 min cada una. En el caso de la determinación de IgE específica contra *T. spiralis*, se agregaron 100 µL del conjugado anti-IgE de rata acoplado a peroxidasa (Serotec U.K.) diluido 1:250 en PBS-Tween-20 al 0.5 %. La placa se incubó 1 h a 37 °C. Para determinar la presencia de Ig totales en el suero de las ratas, se añadió un conjugado cabra anti-Ig Totales de ratón a una dilución 1:2000 por 1 h a 37°C. Posteriormente las placas se lavaron con PBS-Tween-20 al 0.5 % como se mencionó anteriormente. Una vez realizado lo anterior, se adicionaron 100 µL por pozo de amortiguador citratos-fosfato (ANEXO A), con 4 mg/mL de o-fenildiamina y 4 µL de H₂O₂ al 30% y se dejó desarrollar el color por 15 a 20 min aproximadamente. La reacción se paró adicionando 50 µl de H₂SO₄ 2.5 M.

La D.O. se leyó a 492 nm en el lector de ELISA (Labsystems integrated EIA Management System, Inc. Boston M.A., U.S.A.). El punto de corte se calculó considerando el promedio de la D.O. de los sueros de ratas no infectadas (controles negativos) más 3 desviaciones estandar. Los sueros de ratas infectadas con valores de D.O. similares o por arriba del punto de corte se consideraron como positivos.

AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE CELULAS CEBADAS DE PERITONEO (CCP) DE RATA.

Para el aislamiento de CCP se sacrificaron por separado ratas no infectadas y ratas infectadas con *T. spiralis* (20 a 25 días p.i.). Las CCP, fueron obtenidas en los diferentes experimentos de 2 ratas *Sprague Dawley* de 300 a 350 g, de peso, mediante un lavado de la cavidad peritoneal, de acuerdo a lo recomendado por Lee y cols., (1985). Las ratas fueron colocadas en un desecador conteniendo toallas de papel remojadas con 4 a 5 mL de éter, para anestesarlas y posteriormente sacrificarlas por dislocación cervical. Posteriormente, se les realizó una incisión en la garganta y se sangraron para eliminar una posible contaminación por eritrocitos. Se procedió a desprender la piel, para exponer el músculo por medio de un corte longitudinal, sobre el abdomen y se inyectaron 15 mL de amortiguador de HEPES-Tyrode (ANEXO C) (Sigma Chemical C.O. St. Louis M.O. U.S.A.), dentro de la cavidad peritoneal, seguido de un suave masaje en el abdomen. Posteriormente, se hizo una incisión en la línea media y se colectó el amortiguador con una pipeta de transferencia (ELKAY Labystems, Inc. Boston M.A., U.S.A.), depositando el fluido en un tubo falcon cónico de centrifuga de 50 mL (Corning Costar Cambridge, M.A., U.S.A.), manteniendo las células en hielo. Posteriormente, se centrifugaron los tubos a 1300 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante y la pastilla que contiene el paquete celular se resuspendieron en 5 mL de amortiguador HEPES-Tyrode. Las células recuperadas fueron colocadas cuidadosamente en un gradiente discontinuo de 80/30% de percoll estéril (Pharmacia Ltd, Uppsala Suecia) (ANEXO C), de acuerdo al método descrito por Lee y cols., (1985).

Los gradientes se formaron en tubos falcon cónicos estériles de 50 mL (Corning Costar Cambridge, M.A., U.S.A.) que contenían en la fase inferior 15 mL de percoll al 80 % y en la fase superior 20 ml de percoll al 30%. Se utilizó un gradiente para el material celular proveniente de 2 ratas. Las células en el gradiente fueron centrifugadas a 1600 rpm por 20 min a 4°C en una centrífuga Sorvall 5RMC. 14 (Du Pont. Washintong U.S.A.).

El paquete celular conformado por CCP, se lavó 2 veces en amortiguador Hepes-Tyrode y se resuspendió en PBS para proceder a su conteo. El conteo de CCP se realizó mediante una dilución 1:2 empleando azul de toluidina (Azul de Toluidina al 0.5 %, HCl 0.5 N, pH de 0.5). Para medir la viabilidad celular se utilizó azul de tripano al 0.4% en solución salina isotónica 0.85% (Brinkmann Instrumensts Inc Germany Alemania), utilizando 20 µl de medio conteniendo células y 20 µl del colorante. El conteo celular se hizo en una cámara de Neubauer (Propper Manufacturing C.O., Inc. N.J., U.S.A.) empleando un microscopio óptico (BHA, Olympus Tokio Japón). Las células cebadas se estabilizaron en amortiguador Hepes-Tyrode por 2 h a 37 °C en una incubadora (Multiblock Lab-Line. Mod. 2050 Illinoise U.S.A.), con atmósfera húmeda de CO₂ al 5%. Una vez estabilizadas, las CCP se lavaron con Hepes-Tyrode y se procedió a estimularlas con las diferentes concentraciones de las preparaciones antigénicas.

EXPOSICION DE CELULAS CEBADAS DE PERITONEO DE RATA A ANTIGENOS DE *Trichinella spiralis*.

Las CCP de rata se trataron con ET y antígenos purificados de S de la LM de *T. spiralis*, a diferentes concentraciones. El ET se probó a 0.001, 0.01, 0.1, 0.15, 0.5, 1, 5, 10 y 50 $\mu\text{g/mL}$ y los antígenos de S a 0.001, 0.005, 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.3 y 0.5 $\mu\text{g/mL}$. En estos ensayos se incluyeron como controles negativos a CCP de rata sin tratamiento (liberación espontánea) y como controles positivos a CCP en presencia del Ionóforo de Calcio A23187 a una concentración de 2.5 μM . Estos experimentos se realizaron tanto con CCP de ratas no infectadas como de ratas infectadas con la LM de *T. spiralis*.

La liberación de histamina se evaluo de la siguiente forma:

En tubos eppendorf de 0.5 mL se incubaron 25×10^3 CCP recién purificadas contenidas en 0.1 mL de amortiguador Hepes-Tyrode-ASB a las cuales se les añadieron las diferentes concentraciones de las dos preparaciones antigénicas, obteniéndose un volumen final de 0.2 mL. Los tubos se incubaron durante 30 min a 37°C y posteriormente se colocaron en hielo y se centrifugaron a 3000 rpm durante 4 min a 4°C . El sobrenadante obtenido se transfirió a tubos eppendorf. Tanto las pastillas como los sobrenadantes se guardaron a -70°C para la determinación de histamina. Se realizaron 2 ensayos por triplicado cada uno.

CUANTIFICACION DE HISTAMINA LIBERADA POR CELULAS CEBADAS DE PERITONEO DE RATA EXPUESTAS A ANTIGENOS DE *Trichinella spiralis*.

La determinación de histamina se realizó mediante el método fluorométrico descrito por Siraganian (1974). Las pastillas obtenidas de las CCP estimuladas con cada una de las concentraciones antigénicas y de los controles positivos y negativos se resuspendieron en 200 μL de amortiguador Hepes-Tyrode y se hirvieron por 10 min, colocándose posteriormente en hielo. Los tubos con los sobrenadantes correspondientes también se hirvieron por 10 min y se mantuvieron en hielo. Una vez preparados los diferentes lotes de tubos, se les agregó 20 μL de Acido Tricloroacético (TCA) (Merck), al 25% (para precipitar proteínas), resuspendiéndose en el vortex y permitiendo que se llevara a cabo la reacción por 10 min. Una vez transcurrido este tiempo, los tubos se centrifugaron a 8000 rpm por 10 min y 190 μL de cada tubo, sin tocar el precipitado se transfirieron a una placa Fluoro Nunc MaxiSorp F-96 (Nunc-Inmuno Plate, Iter Med, Dinamarca). Una vez colocadas las muestras en la placa, se agregaron 20 μL de NaOH 4N (Merck) a cada pozo y se resuspendieron en el vortex por agitación lenta durante 5 min. Después, se agregaron 50 μL de o-ptaldialdehído (OPT) (Merck), (preparado en ese momento a una concentración de 1.3 mg/mL de metanol, Sigma 99% grado espectrofluorométrico) y la placa se agitó lentamente en el vortex, exactamente durante 4 min. Para estabilizar la fluorescencia del producto se agregaron 26 μL de HCl 3N (Merck) a cada pozo, agitándose la placa por 15 a 20 min en el vortex. El volumen final por pozo fué de 286 μL .

La placa se leyó en un espectrofluorómetro Labsystems Fluoroskan II con un filtro de excitación de 345 y uno de emisión de 455 (Filtros 6,6 en el Fluoroskan II). La calibración del espectrofluorómetro se llevó a cabo previo a la lectura de las muestras. Para esto, se colocaron en la primera columna de una placa Maxisorp, 8 controles blancos conteniendo amortiguador Hepes-Tyrode, en la siguiente columna 8 pozos con el estandar control (concentración total de histamina presente en 25×10^3 CCP sin antígeno), ambos controles con el tratamiento de fluorescencia mencionado anteriormente y en la siguiente columna se dejaron los pozos vacíos. La placa donde se encontraban las muestras fueron leídas con el valor de calibración (100) establecido durante la calibración del aparato. Los valores de D.O. del sobrenadante y de su pastilla respectiva, se sumaron considerándose como el contenido de histamina total presente en las CCP.

La liberación espontánea se calculó de tubos controles negativos que contenían CCP en amortiguador Hepes-Tyrode sin antígeno, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ liberación espontánea} = \frac{\text{D.O. del sobrenadante}}{\text{D.O. Total (sobrenadante + pastilla)}} \times 100$$

Por otro lado, el porcentaje de histamina liberada por CCP activadas con cada una de las preparaciones antigénicas a las diferentes concentraciones se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de liberación} = \frac{\text{D.O. sobrenadantes} - \text{D.O. sobrenadante control negativo (liberación espontánea)}}{\text{D.O. Total (sobrenadante + pastilla)}} \times 100$$

A los porcentajes de liberación de histamina obtenidos de las muestras se les restó el porcentaje de liberación espontánea.

Para la determinación del porcentaje de liberación de histamina se realizaron dos experimentos por triplicado para cada uno de las preparaciones antigénicas así como para CCP de ratas no infectadas e infectadas con *T. spiralis*.

RESULTADOS

ANÁLISIS DEL EXTRACTO TOTAL DE LA LARVA MUSCULAR DE *Trichinella spiralis*.

El ciclo de vida de *T. spiralis* se mantuvo en ratas infectadas de la cepa *Sprague Dawley*, de las cuales se obtuvieron LM del parásito. A partir de las cuales, se preparó un ET proteico en presencia o ausencia de DOC al 4%. La utilización de ambos procedimientos resultó eficiente, obteniéndose de 7 a 10 mg/mL y 8 a 12 mg/mL respectivamente. Además, mediante geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS se caracterizó el ET (FIGURA 4) observándose un patrón proteico con pesos moleculares de 20 a 200 kDa, no mostrando degradación de proteínas.

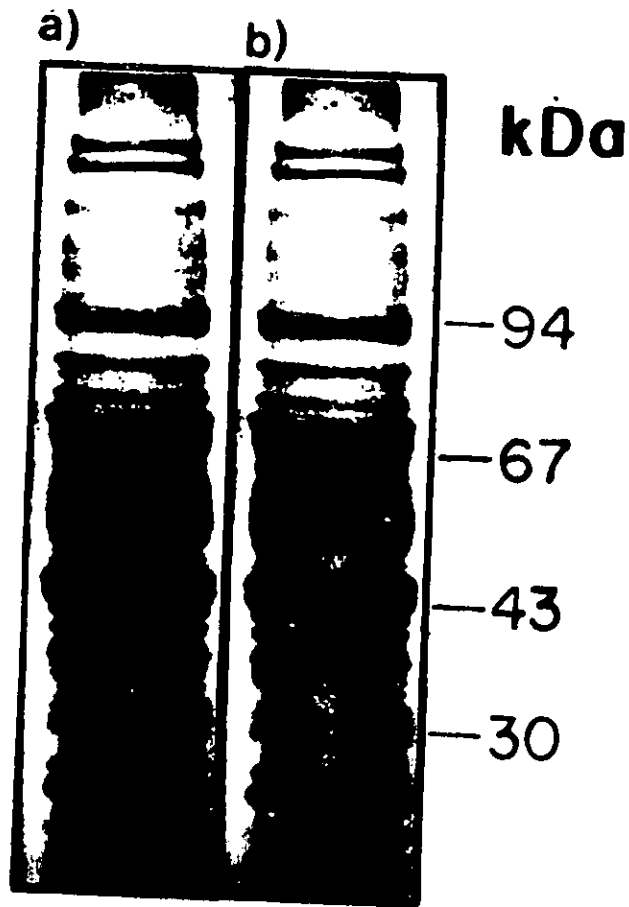


FIGURA 4. Análisis electroforético del extracto total (ET) de la larva muscular (LM) de *T. spiralis*. El ET de la LM del parásito (50 μ g de proteína), se obtuvo en: a) presencia de Deoxicolato de Sodio (DOC) y b) en ausencia de DOC, se separó electroforéticamente en geles de acrilamida al 10% en presencia de SDS bajo condiciones reductoras. Los marcadores de peso molecular empleados como estándar se indican en kDa a la derecha de la figura.

ANALISIS DE ANTIGENOS PURIFICADOS DE SUPERFICIE DE LA LARVA MUSCULAR DE *Trichinella spiralis*.

A partir de 20 mg de ET de la LM de *T. spiralis* se procedió a purificar los antígenos de S del parásito. Esta purificación se llevó a cabo mediante una cromatografía de afinidad empleando el anticuerpo monoclonal NIM-M1 unido a Sefarosa 4B. De las fracciones colectadas se obtuvieron 260 ng/mL con Pre-strip a pH de 9.3 y 1 mg/mL Alk-strip a pH de 11.5. Los antígenos de S purificados se analizaron en un gel de poliacrilamida-SDS al 10%, la cual reveló la presencia de 4 componentes con pesos moleculares de 47,52,67,73 kDa (FIGURA 5, carril c) similares a los reportados por Ortega-Pierres y cols. (1989). Los antígenos de S así purificados se emplearon posteriormente en ensayos de activación de CCP.

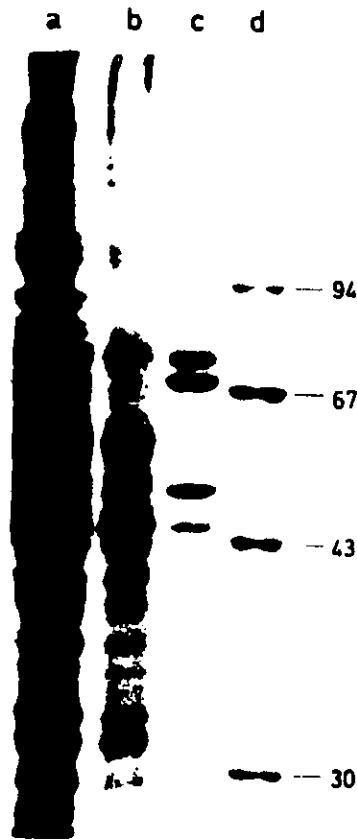


FIGURA 5 Análisis electroforético de los antígenos de superficie (S) purificados de la larva muscular (LM) de *T. spiralis*, en geles de acrilamida al 10% en presencia de SDS bajo condiciones reductoras. El extracto total (ET) (carril a) se pasó por una columna de afinidad empleando el anticuerpo monoclonal NIM-M1 para la purificación de los antígenos de S. En el carril b se muestran los antígenos del ET que no se pegaron a la columna de afinidad y en el carril c los antígenos purificados con el amortiguador Alkali-strip. Los marcadores de peso molecular empleados como estándar se indican en kDa en el carril d.

DETERMINACION DE Ig TOTALES E IgE ESPECIFICAS CONTRA LA LM DE *T. spiralis* EN SUEROS DE RATAS INFECTADAS CON PARASITO, EMPLEANDO EL METODO DE ELISA.

Se analizó la presencia de anticuerpos contra *T. spiralis* en sueros de ratas por ELISA. De estas mismas ratas se purificaron las CCP empleadas en lo ensayos de activación. Los resultados obtenidos en el ELISA (FIGURA 6), muestran que los sueros de ratas infectadas con *T. spiralis* tuvieron valores de D.O. por arriba del punto de corte calculado, el cuál fue de 0.579 y 0.088 para el caso de Ig totales y de IgE específicas contra el parásito respectivamente.

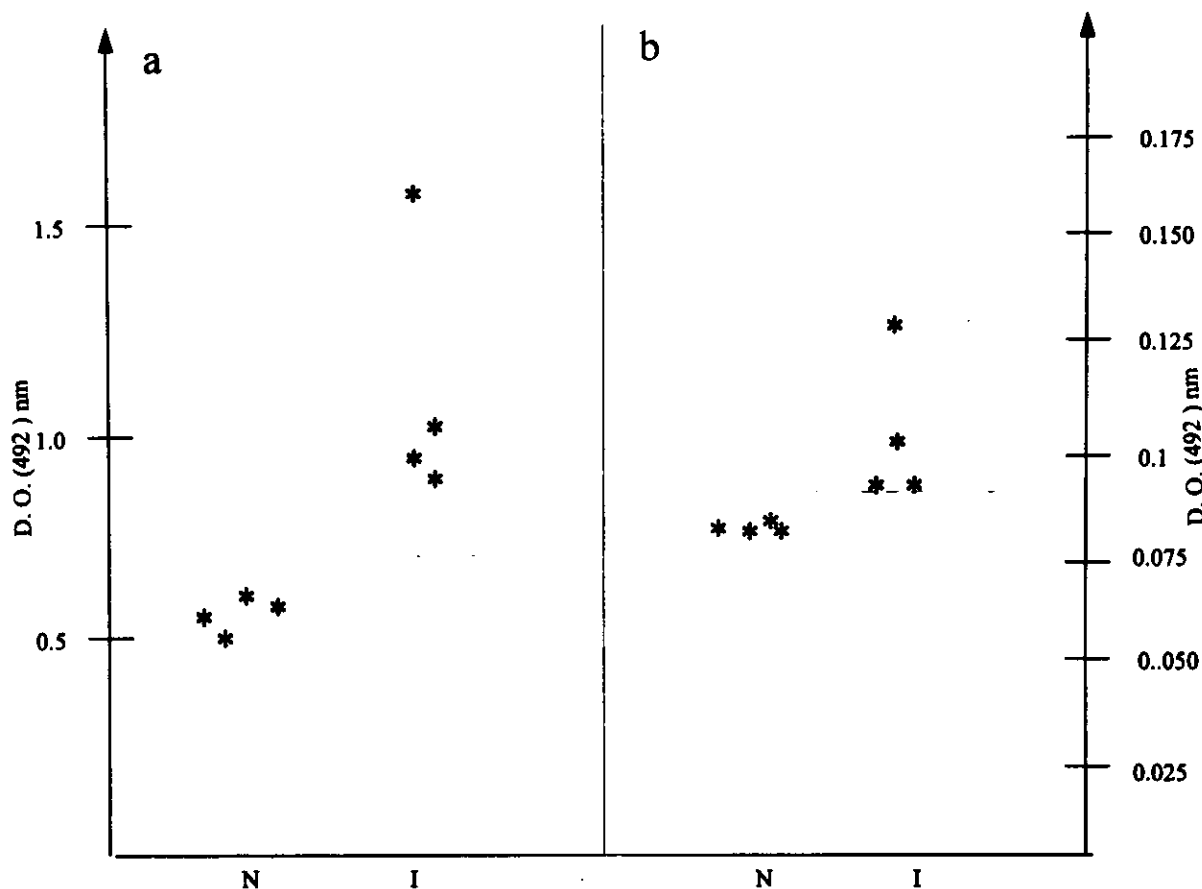


FIGURA 6. Determinación de la presencia de anticuerpos contra *T. spiralis* en sueros de ratas no infectadas (N) e infectadas experimentalmente con el parásito (I), empleando el ensayo de ELISA. El ensayo se realizó empleando el extracto total de la LM de *T. spiralis* y los sueros se diluyeron 1:10. Como segundo anticuerpo se utilizó en el caso de Ig totales (panel A) un conjugado anti-ratón acoplado a peroxidasa mientras que para la obtención de IgE específica contra *T. spiralis* (panel B), se utilizó un conjugado anti-IgE de rata acoplado a peroxidasa. Como controles negativos se incluyeron sueros de ratas no infectadas (N). La línea punteada representa el valor de punto de corte. Los sueros corresponden a ratas a partir de las cuales se obtuvieron las células cebadas, empleados en los ensayos de activación.

ANALISIS DEL AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE CELULAS CEBADAS DE PERITONEO DE RATA.

Al realizarse el aislamiento de CCP de ratas no infectadas e infectadas con la LM de *T. spiralis*, se observó que el rango promedio de células recuperadas de 6 ensayos, después de la separación en gradientes discontinuos de percoll, fue de 150×10^4 a 180×10^4 CCP/rata no infectada y de 180×10^4 a 200×10^4 CCP/rata infectada con el parásito. La pureza con la que se obtuvieron las células fue del 99% (determinada mediante exclusión con azul de toluidina) y la viabilidad del 99 y 95% respectivamente, (mediante azul de tripano) (TABLA 4). Las CC así purificadas se estabilizaron en amortiguador Hepes-Tyrode por 2 h a 37 °C en presencia de CO₂. Posteriormente estas CCP se emplearon en los ensayos de activación con diferentes preparaciones antigénicas de la LM de *T. spiralis*. En los experimentos en los cuales las CCP se obtenían con menos del 95% de viabilidad y el 90% de pureza, estas eran desechadas. Además, si la observación microscópica de las CCP aisladas mostraba la presencia de degranulación, la preparación de las células no se utilizaba en los ensayos de activación. Lo anterior se llevó a cabo con la finalidad de disminuir el porcentaje de liberación espontánea de histamina.

TABLA 4. Porcentaje de viabilidad y pureza de células cebadas aisladas de peritoneo (CCP) de ratas no infectadas e infectadas con *T. spiralis*, purificadas mediante gradientes discontinuos de Percoll 30-80%.

	CCP/rata	Viabilidad (%)	Pureza (%)
Ratas no infectadas	150 x 10 ⁴	99.0	99.0
	a		
Ratas infectadas	180 x 10 ⁴	99.0	97 - 99
	a		
	200 x 10 ⁴		

a) Los rangos de valores presentados en la tabla fueron obtenidos de 6 experimentos

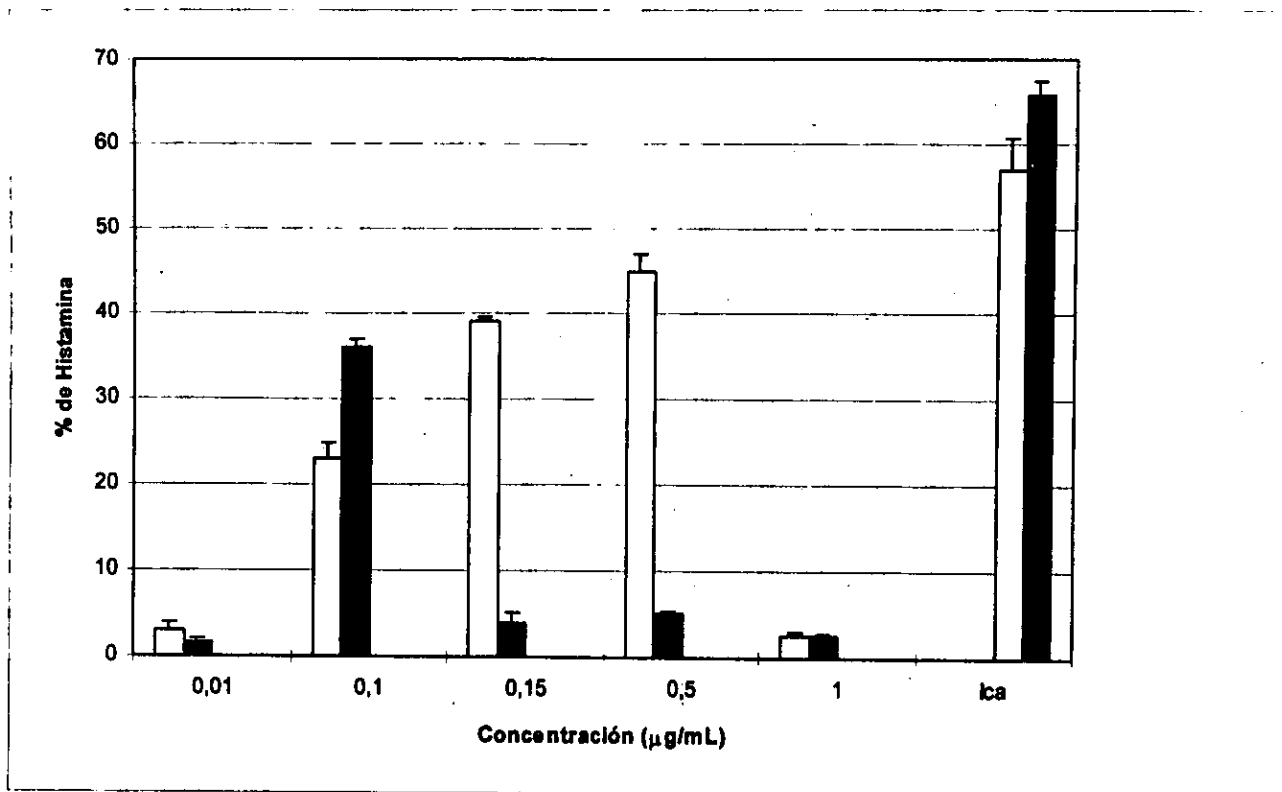


FIGURA 7. Porcentaje de histamina liberada por CCP de ratas estimuladas con el extracto total (ET) de la larva muscular (LM) de *T. spiralis*. 25×10^3 CCP de ratas no infectadas (barras blancas) e infectadas con *T. spiralis* (barras oscuras) se incubaron durante 30 min a 37 °C con diferentes concentraciones del ET de la LM de *T. spiralis*. Los valores de liberación espontánea de histamina de las CCP no tratadas con los antígenos se restaron y los valores absolutos se indican en la figura. Como controles positivos se incluyeron CCP tratadas con 2.5 µM de Ionóforo de calcio A23187 (Ica), en células no sensibilizadas (barras blancas) y células sensibilizadas (barras oscuras).

Por otro lado, cuando las CCP de ratas no infectadas se estimularon con los antígenos de S purificados de la LM de *T. spiralis*, (FIGURA 8) se observó un máximo de liberación de histamina a 30 ng/mL (28%) disminuyendo a concentraciones de 50 y 100 ng (porcentajes de histamina no mayores del 10%). El Ionóforo de calcio A23187 (2.5 μ M), indujo una liberación de histamina del 55%. En cuanto a la liberación de las CCP de ratas infectadas con *T. spiralis* estimuladas con el antígeno de S, se obtuvo un pico de liberación de histamina a la concentración de 10 ng/mL (35%) decreciendo a concentraciones a (30, 50 y 100 ng/mL) a porcentajes no mayores del 15. Las CCP de ratas infectadas estimuladas con el Ionóforo de calcio A23187 liberaron 50% de histamina. Estos resultados son el promedio de dos ensayos con tres repeticiones cada uno.

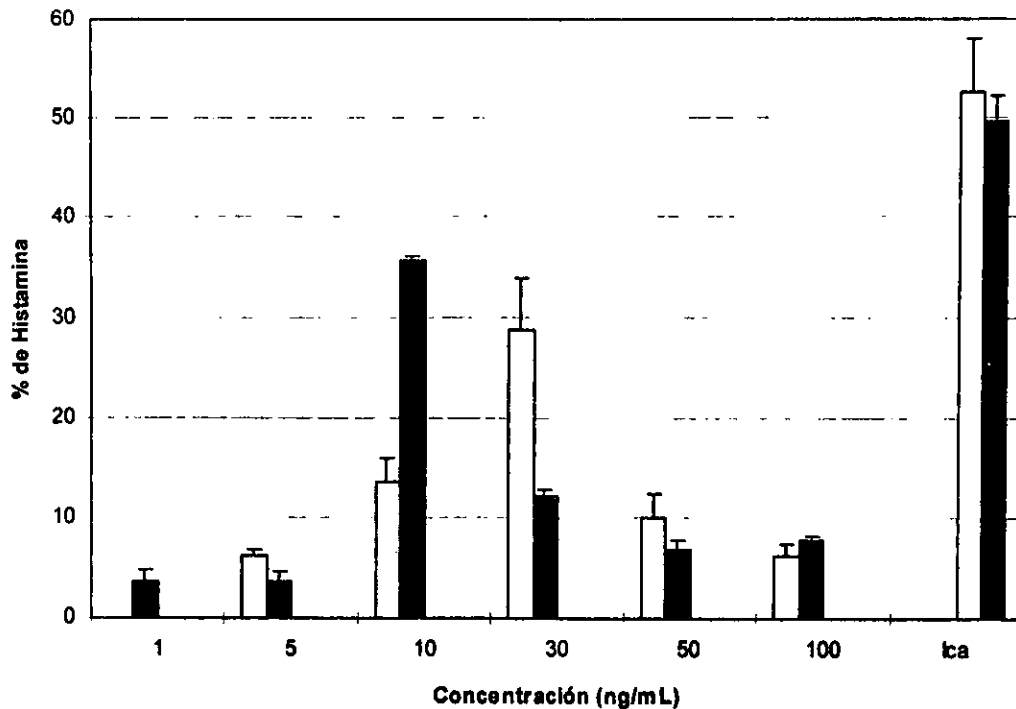


FIGURA 8. Porcentaje de histamina liberada por células cebadas de peritoneo (CCP) de rata, estimuladas con antígenos de superficie (S), de la larva muscular (LM) de *T. spiralis*. 25×10^3 de CCP de ratas no infectadas (barras blancas) e infectadas con el parásito (barras, oscuras), se incubaron durante 30 min a 37 °C con los antígenos de S a diferentes concentraciones. Los valores de liberación espontánea de histamina de CCP no tratadas con los antígenos, se restaron y los valores absolutos se indican en la figura. Como controles positivos se incluyeron CCP tratadas con 2.5 mM de Ionóforo de calcio A23187 (Ica), tanto para células no sensibilizadas (barras blancas) como para células sensibilizadas (barras oscuras).

DISCUSION

La participación de células cebadas en la inducción de la expulsión rápida de adultos de *Trichinella spiralis* mediante un proceso inflamatorio en el intestino de animales infectados, ha sido demostrada ampliamente por diferentes autores. Así, en estudios realizados en modelos animales, se ha observado una correlación temporal entre la cinética de la mastocitosis intestinal y la expulsión rápida de organismos adultos *Trichinella spiralis* (Alizadeh y Murrell, 1984; Moqbel y cols., 1987; Tuohy y cols., 1990) y de forma paralela se ha determinado la liberación de mediadores proinflamatorios producidos por las células cebadas. En este contexto, la liberación de mediadores químicos se ha asociado con un incremento en la permeabilidad celular, activación de eosinófilos, hiperproducción de moco y un incremento en la peristalsis, sugiriendo la participación de estos mediadores en la expulsión rápida del parásito.

Sin embargo, todos los estudios sobre expulsión del parásito realizados hasta la fecha se han hecho directamente con animales infectados con *Trichinella spiralis* o con células cebadas sensibilizadas previamente, no habiéndose estudiado la posible activación de las células cebadas mediante un mecanismo independiente de IgE, es decir, cuando la activación ocurre directamente en las células cebadas por antígenos parasitarios. Lo anterior es posible considerando que el proceso de expulsión del adulto ocurre de manera temprana durante una infección.

Además, en el estudio de otros parásitos, como *Ascaris suis* y *Nippostrongylus brasiliensis*, se han caracterizado compuestos parasitarios capaces de inducir directamente la degranulación de células cebadas (Murray y cols.,

1968). Asimismo, existen evidencias que indican que reacciones de hipersensibilidad inmediata puede llevarse a cabo en ratones deficientes de IgE (Oettgen y cols., 1994).

Cabe mencionar, que los mecanismos que contribuyen a la capacidad del huésped para resistir, destruir y eliminar una infección parasitaria, caen dentro de dos categorías referidas como inmunidad innata (natural) y una inmunidad adquirida (adaptativa). La inmunidad innata provee a el hospedero con un nivel inmediato de protección antes de que la respuesta inmune adquirida se vuelva efectiva contra el parásito (Mécheri y David; 1997). Para que una célula participe en una respuesta inmune innata requiere, por un lado, que tenga múltiples receptores, que pueda diferenciar entre lo propio y lo extraño, además de poder responder de manera rápida al estímulo. Así, las células cebadas pueden ser consideradas como un prototipo celular que combina características de la respuesta inmune innata y adquirida (esta última mediante la participación de receptores para IgE). Malaviya y cols. (1994), demostraron que las células cebadas pueden unirse a lectinas específicas para manosa expresadas en enterobacterias, fagocitándolas y matándolas. Esto claramente indica que las células cebadas son capaces de procesar el antígeno, función clásica atribuida principalmente a macrófagos, activar y eliminar sin intervención de la IgE, a microorganismos infecciosos.

Además, se ha sugerido que las células cebadas pueden elaborar y secretar diversos compuestos con actividad biológica (histamina, proteoglicanos, mediadores lipídicos, proteinasas y citocinas) como respuesta a una variedad de estímulos, incluyendo antígenos bacterianos, parasitarios, a través de receptores conservados, además de una estimulación dependiente de IgE. Aunado a lo

diferenciación. Para asegurar que la respuesta de activación medida por liberación de histamina siempre se utilizaron células cebadas que presentaron porcentajes de la liberación espontánea menores al 5%. Así, los resultados obtenidos con células cebadas de peritoneo de ratas no infectadas indican que con el extracto total y los antígenos de superficie de la larva muscular el máximo porcentaje de histamina liberada se obtuvo con 500 ng y 30 ng siendo de 45 y 28 respectivamente. En los ensayos de activación de células cebadas de peritoneo de ratas infectadas con *Trichinella spiralis*, los resultados obtenidos muestran que la dosis requerida para lograr una máxima estimulación en las células cebadas de peritoneo fue de 100 ng de extracto total y 10 ng de antígeno de superficie respectivamente. Los porcentajes de histamina liberados fueron de 36 para extracto total y de 35 con los antígenos de superficie. En términos generales, se observó que con las células cebadas de peritoneo de ratas infectadas se obtuvo porcentajes de histamina liberadas similares a los obtenidos con células cebadas de peritoneo de ratas no infectadas, pero se requirió menor concentración de las preparaciones antigénicas para lograrlo.

Para corroborar que la respuesta de células cebadas de ratas infectadas era específica, se determinó en los sueros de ratas infectadas con *Trichinella spiralis* los niveles de anticuerpos específicos por ELISA; así se demostró la presencia de anticuerpos específicos dirigidos contra el parásito. Cabe mencionar que este tipo de ensayo serológico se considera como un método sensible para el diagnóstico de la triquinelosis, por lo que de esta forma se confirmó que las ratas infectadas efectivamente tuvieron anticuerpos IgE específicos contra *Trichinella spiralis*. En base a esto, se puede sugerir que en los ensayos de activación, en el caso de células cebadas de peritoneo obtenidas de ratas

infectadas, los anticuerpos del isotipo IgE participaron en la liberación de histamina observada.

Como conclusión de este proyecto se puede decir que tanto el extracto total como los antígenos de superficie de la larva muscular de *Trichinella spiralis* pueden inducir de manera directa la liberación de histamina por células cebadas de peritoneo de rata. Este es el primer reporte que demuestra la activación de células cebadas de peritoneo independiente de IgE por antígenos caracterizados de la LM de *Trichinella spiralis*. Si este tipo de estimulación de células cebadas de peritoneo ocurre *in vivo* podría explicar el papel que juegan las células cebadas en el proceso de expulsión de *Trichinellas spiralis* en la etapa temprana de una infección primaria. Considerando la reactividad de las células cebadas hacia los componentes de la larva muscular de *Trichinella spiralis*, es importante mencionar que los antígenos de superficie de la muestran epítomos compartidos con productos de secreción/excreción de la larva muscular y del organismo adulto (McLaren y col., 1987), lo cual explicaría lo observado por otros autores en relación con la capacidad de la larva muscular para inducir la expulsión del adulto.

Sin embargo, el mecanismo por el cual estos antígenos estimulan a las células cebadas de peritoneo requiere ser estudiado, resultando de gran interés que los antígenos de superficie tengan un alto contenido de carbohidratos y en especial a tivelosa, el cual es un carbohidrato específico de parásitos del género *Trichinella* que le confiere la inmunodominancia a estas moléculas (Wisnewski y cols., 1993). A este respecto, como se menciona con anterioridad existen evidencias de la unión de células cebadas a lectinas para manosa presentes en la superficie de estas lectinas (Malaviya y cols., 1994), por lo que sería de gran

importante determinar si en las células cebadas existe un receptor específico para la tivelosa de los antígenos de superficie de *Trichinella spiralis*, estimulando mediante este mecanismo a las células cebadas. Lo anterior tendría gran relevancia en la participación de las células cebadas en la defensa del hospedero mediante una respuesta inmune innata.

Además, sería de interés investigar si los antígenos de superficie de la larva muscular de *Trichinella spiralis*, interactúan con el receptor para IgE mediante la parte glucosilada de las moléculas, para lo cual se requeriría el empleo de técnicas de microscopía confocal y fluorescencia. Asimismo, determinar si los antígenos de superficie compiten con anticuerpos anti-receptor IgE ó con los mismos anticuerpos del isotipo IgE. Por otro lado, se tiene el conocimiento de la capacidad de las células cebadas para producir interleucinas similares a las producidas por células TH2 como son: IL-3, IL-4 e IL-10 sería interesante analizar la posibilidad de la activación de células cebadas por antígenos de *Trichinella spiralis* con la liberación de interleucinas que pueden ser involucradas en la regulación de la respuesta inmune local en contra de *Trichinella spiralis*. De suceder lo anterior, se daría apoyo a la sugerencia hecha por Romagnani (1992), en el sentido de la participación de células cebadas en la inducción temprana de una respuesta del tipo TH2, la cual se observa principalmente en infecciones por helmintos intestinales y que se sugiere es mediada principalmente por IL-4. Este tipo de estudios permitirá a largo plazo el uso de fármacos útiles en el control de ciertas parasitosis.

CONCLUSIONES

El extracto total de la larva muscular de *Trichinella spiralis* es capaz de inducir la liberación de histamina de células cebadas de peritoneo de ratas no infectadas e infectadas con el parásito a concentraciones de 500 ng/mL y 100 ng/mL.

Los antígenos de superficie de la larva muscular de *Trichinella spiralis*, son capaces de inducir la liberación de histamina tanto en células cebadas de peritoneo de ratas no sensibilizadas como en células sensibilizadas con el parásito a las dosis de 30 (28%) y 10 ng/mL (35%) respectivamente.

Los antígenos de superficie de la larva muscular de *Trichinella spiralis* estimulan la liberación de histamina en ausencia de IgE específica en contra de *Trichinella spiralis*.

ANEXO A

AMORTIGUADORES

PBS

Cloruro de Sodio 150 mM, Fosfato de Sodio Dibásico 16 mM, Fosfato de Sodio Monobásico mM, ajustar el pH a 7.3.

Alkali-strip

Dietilamina 50 mM, Dexoxicolato de Sodio al 2% pH 11.5

Amortiguador de Columna

Tris-HCl 20 mM, Dexoxicolato de Sodio al 0.5% pH 8.3

Pre-strip

glicina 50 mm, Dexoxicolato de Sodio al 2% pH 9.3

Amortiguador de Carbonatos

Carbonato de Sodio 1.59g, Bicarbonato de Sodio 2.93g, pH 9.6

Amortiguador para Electroforesis

Tris-base 3.02g, glicina 14.41g y 5ml de SDS al 20%, aforado a 1 litro pH a 8.3

APENDICE B

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA BAJO CONDICIONES REDUCTORAS (SDS-PAGE).

Para la elaboración de geles de poliacrilamida en presencia de Duodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE) fue necesario preparar las siguientes soluciones stock.

Amortiguador para el gel concentrador (BGC 8X).

Tris-base 2 M pH 6.8 (50 mL), SDS al 20% (4mL), aforar a 100 mL con agua bidestilada.

Amortiguador para el gel espaciador (BGC 5X).

Trisma base 2 M pH 8.8 (187.5 mL), SDS 20%(5 mL), aforar a 200 mL con agua bidestilada.

Acrilamida 30%/Bisacrilamida 0.8%.

Acrilamida 60 g, N'N'-metilen-bis-acrilamida 1.6, Glicerol 60 mL, aforar a 200 mL con agua bidestilada y posteriormente filtrar varias veces.

Amortiguador de Muestra 5X.

Trisma base 2M pH 6.8 (0.78 mL), SDS 205 (2.5 mL), Glicerol (0.97 mL), Azul de Bromofenol al 2% en glicerol al 60% (25 μ L), llevar a 5 mL con agua bidestilada.

PREPARACION DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS AL 10%.

BGC 8X (0.25 mL), H₂O (1.41 mL), Acril/Bisacrilamida 30: 0.8%(0.33mL), N',N',N',N'-Tetrametiletilenediamina (TEMED)(1.5 μ L), Persulfato de Amonio (APS) 10 % (12 μ L).

ESPACIADOR AL 10%.

BGE 5X (1.88 mL), H₂O (1.41 mL), Acril/Bisacrilamida 30: 0.8%(3.16mL), TEMED (5 μ L), APS 10 % (20 μ L).

APENDICE C

PREPARACION DE SOLUCIONES PARA EL AISLAMIENTO DE CELULAS CEBADAS DE PERITONEO (CCP) DE RATA.

Amortiguador Hepes-Tyrode.

Hepes-Tyrode 1.43g, NaCl 4.0g, D-glucosa 0.50g, KCl 0.10g, CaCl₂ 0.074g. Después de ser disueltos los ingredientes en ese orden se añaden: NaH₂PO₄ .2H₂O 0.03g, ajustar el pH a 7.3 y aforar 500 mL.

Percoll Isotónico.

# de gradiente	1	2	3
Stock			
percoll	25 mL	50	100
Ca-Mg libre HBSS (10X)	2.3 mL	4.7	9.4
Hepes-Tyrode (1M)	0.25 mL	0.5	1.0
HCl (1N) (gotas)	2-3	4-6	8-12

Medio de cultivo para células cebadas (RPMI).

RPMI 2X (50 mL), Suero Fetal Bovino 5% (5 mL), Bicarbonato de Sodio 7.5% (1 mL), Hepes 2M (pH 7.4) (1M), L-Glutamina 200 mM (1 mL), Penicilina-Estreptomicina (100 X)(2mL), ajustar a pH de 7.3 y aforar a 100 mL.

Preparación del gradiente (30-80 %).

# gradien	1		2		3	
	RPMI	PERCOL	RPMI	PERCOL	RPMI	PERCOL
20mL 30	14	6	28	12	42	18
50mL 50	3.2	12.8	6.4	25.6	9.6	38.4

ANEXO D

CUANTIFICACION DE PROTEINAS DE EXTRACTOS TOTAL Y PURIFICADO DE LA LARVA MUSCULAR DE *T. spiralis*.

La concentración de proteínas se determinó mediante el método Lowry y cols., (1951) con algunas modificaciones. Para hacer la curva patrón, diferentes concentraciones de ASB (Fracción V, sigma, ST. Luis MO. EUA), fueron empleadas (10,20,40,60,80 y 100 mg/mL). El protocolo empleado se describe a continuación:

- Volúmenes tomados a partir del Stock de ASB (1mg/mL).
- Solución de DOC al 10%.
- Solución preparada a partir de mezclar 1 volumen de sulfato de cobre pentahidratado al 0.5% y 1 volumen de tartrato de sodio y potasio al 2%, más 50 volúmenes de carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio al 0.1N:

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8
a) ASB (μL)	-	10	20	40	60	80	100	-
H ₂ O (μL)	500	490	480	460	440	420	400	490
Muestra (μL)	-	-	-	-	-	-	-	10
b) Deterge (μL)	50	50	50	50	50	50	50	50
c) Sol. E. (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

Se mezcló el contenido de cada tubo y se dejó reposar 10 min a T.A. Posteriormente a cada tubo se le adicionaron 250μL de reactivo de Folín-Ciocalteus (Merck, Darmstadt, Alemania) diluido 1:2 y 500μL de Dodecilsulfato de sodio (SDS) al 5%. Los tubos se agitaron en un vortex y se incubaron por 30 min a T.A.. Una vez realizado esto se leyó la absorbancia a 750 nm, en un espectrofotómetro DU-65, Beckman. La concentración de proteínas de los extractos totales y purificados se calculó por interpolación con la curva patrón de Albúmina.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

REFERENCIAS

1. Abbas KA, Lichtman HA and Pober SJ. (1993). Cellular and molecular immunology. W.B. Saunders company. Hancourt Brace Jovanovich, Inc., USA.
2. Ahmad A, Wang CH, and Bell, R. (1991). A role for IgE in intestinal immunity. *J. Immunology*, 146(10): 3563-3570
3. Alcántara P, Goradezky C, Correa D, Martinez-Marañón R, Magos C and Olivo A. (1989). Diagnosis of human trichinosis by the enzyme-linked immunoabsorbent assay. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.*, 30: 227.
4. Alizadeh H and Wakelin D, (1982). Comparasion of rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in mice and rats. *Int. J. Parasitol.*, 12: 65.
5. Alizadeh H and Murrell K. (1984). The intestinal mast cell response to *Trichinella spiralis* infection in mast cell deficient mice. *J. Parasitol.*, 70: 767-773.
6. Almond NM, Parkhouse RME, Chapa-Ruiz MR and García-Ortigoza E. (1986). The response of humans to surface and secreted antigens of *Trichinella spiralis*. *Trop. Med. Parasitol.*, 37:381-384.
7. Andrews JRH, Ainsworth R and Abernathy D. (1993). *Trichinella pseudospiralis* in man. *Lancet*, 342:298.
8. Appleton JA, Schain LR and McGregor DD, (1988). Rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in suckling rats: mediation by monoclonal antibodies. *Immunology*, 65: 487.
9. Appleton JA, Bell RG, Homan W, and Van Knapen F. (1991). Consensus on *Trichinella spiralis* in mice and rats. *Parasitol. Today*, 7:190.
10. Arriaga C, Muñiz E, Morilla A and Ortega-Pierres G, (1989). *Trichinella spiralis*: Recognition of muscle larva antigens during experimental infeccion of swine and its potencial use in diagnosis. *Exp. Parasitol.*, 69:363-372.
11. Ashman RI, Jarboe, DL, Conrad DH y Huff TE. (1991). The mast cell-committed progenitor. *In vitro* generation of committed progenitors from bone marrow. *J. Immunol.*, 146: 211.

12. Bagheri A, Ubelaker JE, Stewart GL and Wood B. (1986). Muscle fibre selectivity of *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis*, J. Parasitol., 72: 277.
13. Baruch AM, and Despommier DD. (1991). Blood vessels in *Trichinella spiralis* infections: a study using vascular casts. J. Parasitol., 77: 99.
14. Befus AD, Bienenstock J and Denburg JA. (1986). Mast Cell Differentiation and Heterogeneity. New York, Raven Press.
15. Befus AD, Dyck N, Goodrace R and Bienenstock J. (1987). Mast cells from the human intestinal lamina propria. J. Immunology, 138(8):2604-2610.
16. Befus DA. (1994). "Handbook of Mucosal Immunology". Inflammation: Mast Cell. Acad. Press. Inc., pp 307-314.
17. Bell RG, McGregor DD and Adamn LS. (1982). *Trichinella spiralis*: genetic basis for differential expression of phase specific intestinal immunity in inbred mice. Exp. Parasitol., 53: 315.
18. Bell RG and McGregor DD. (1979). *Trichinella spiralis* role of different life cycle phases in induction, maintenance and expression of rapid expulsion in rats. Exp. Parasitol., 48:51-60.
19. Bissonnette EY and Befus A. (1990). Inhibition of mast cell-mediated cytotoxicity by interferons alpha/beta and gamma. J. Immunol., 145: 3385.
20. Bissonnette EY and Befus DA. (1993) Immunopharmacology of the Gastrointestinal System. Modulation of mast Cell function in the gastrointestinal tract. Acad. Press. Inc., pp 96-103.
21. Bolas-Fernandez and Wakelin D. (1989). Infectivity of *Trichinella* isolates in mice is determined by host immune responsiveness. Parasitology, 99: 83-88.
22. Brandtzaeg P. (1985) Research in gastrointestinal immunology: state of the art. Scand. J. Gastroenterol., 20 (114), 137-156.
23. Campbell WC. (1988). Trichinosis Revisited- Another look at modes of transmission. Parasitol. Today, (483): 83-86.

24. Cedillo-Rivera. (1990). Parasitosis intestinales en: Kumate J., Gutierrez G, Muñoz O, Santos JT.(Eds). Manual de infectología 12a ed. Francis Mendez Cervantes (Ed), Mexico DF. 99-109.
25. Correa D, De la Rosa JL and Ortega-Pierres MG. (1996). Trichinelosis: Human epidemiological date in Mexico from 1939 to 1995. In: Abstract book of the 9th International Conference on Trichinellosis. México, City.
26. Crandall PB and Crandall CA. (1972). *Trichinella spiralis*: immunologic response to infection in mice. Exp. Parasitol., (31): 378.
27. De la Rosa JL, Aranda-Alvarez, GJ, Padilla E, Miramón-Peña G and Correa D. (1996). Study of prevalence of anti-*Trichinella spiralis* antibodies and risk factors associated in an community of San Luis Potosí, México. In: Abstract book of the 9th International Conference on Trichinellosis. México, City.
28. Del Prete G and Romagnani S. (1994). The role of TH1 and TH2 subsets in human infectious diseases. Microbiol., 4,(2):1.
29. Denkers EY, Wasson DI and Hayes CE. (1990). Characterization of *Trichinella spiralis* antigens sharing an immunodominant carbohydrate-associated determinant distinct from phosphorylcholine. Mol. Biochem. Parasitol., 41: 241.
30. Dennis DT, Despommier DD and Davis N. (1970). Infectivity of the newborn larve of *Trichinella spiralis* in the rat. J. Parasitol., 56(2):974-977.
31. Despommier DD. (1990). *Trichinella spiralis*: the worm that would to be virus. Parasitol. Today, 6: 193.
32. Despommier DD, Campbell WC and Blair LS, (1977). The *in vivo* and *in vitro* analysis of inmunity to *Trichinella spiralis* in mice and rats. Parasitol., 74: 109.
33. Despommier, DD. and Muller M. (1976). The Stichosome and its Secretion Granules in the Mature Muscle Larva of *Trichinella spiralis*. J. Parasitology., 62(5): 775-785.
34. Despommier DD, Symmans WF and Dell R. (1991). Changes in nurse cell nuclei during synchronous infection with *Trichinella spiralis* trichinosis. J. Parasitol., 77: 290.

35. Dick TA and Silver BB. (1980). Intestinal distribution of *Trichinella spiralis* in rats. *J. Parasitol.*, 66:472.
36. Dick TA and Chadee K. (1983). Interbreeding and gene flow in the genus *Trichinella*. *J. Parasitol.*, 69: 176.
37. Dillan SB and MacDonald TT. (1986). Limit dilution analysis of mast cell precursor frequency in the gut epithelium of normal and *Trichinella spiralis* infected mice. *Parasite Immunol.*, 8: 503.
38. Dupouy-Camet J, Soule CL, and Ancelle T. (1994). Recent news on *Trichinellosis*: Another outbreak due to horsemeat consumption in France in 1993. *Parasite Immunol.*, 1:99-103.
39. Enerback L. (1966). Mast cell in gastrointestinal mucosa. II. Dye binding and metachromatic properties. *Acta Pathol Microbiol Scand.*, 66: 303.
40. Galli JS. (1993). New Concepts About the Mast cell. *Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston* vol, 328, No. 4:257.
41. Gamble HR. (1985). *Trichinella spiralis*: immunization of mice using monoclonal antibody affinity-isolated antigens. *Exp. Parasitol.*, 59: 389.
42. Gansmuller A, Anteunis A, Venturiello SM, Bruschi F and Binaghi RA. (1987). Antibody-dependent in-vitro cytotoxicity of newborn *Trichinella spiralis* larvae: nature of the cells involved. *Parasite Immunol.*, 9: 281.
43. Garcavi BL. (1972) Species of *Trichinella* isolated from wild animals. *Vet.*, 10:90.
44. Gordon JR and Galli SJ. (1991). Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor alpha (TNF alpha /cachetin) by mouse mast cells stimulated via FcER1. A mechanism for the sustained action of mast cell-derived TNF alpha during IgE dependent biological responses. *J. Exp. Med.*, 174: 103.
45. Grecis RK, Riedlinger J and Wakelin D, (1985). L3t4-positive T lymphoblasts responsible for transfer of immunity to *Trichinella spiralis* in mice. *Immunology*, 56: 213.
46. Grecis RK, Hultner L and Else K. (1991). Host protective immunity to *Trichinella spiralis* in mice: activation of Th cell subsets and lymphokine

- secretion in mice expressing different response phenotypes. *Immunology*, 74:329.
47. Harari Y, Russell DD and Castro GA. (1987). Anaphylaxis-mediated epithelial C1 secretion and parasite rejection in rat intestine. *J. Immunol.*, 138: 1250.
48. Harley JP and Gallicchio V. (1971). *Trichinella spiralis* : Migration of Larvae in the Rat. *Exp. Parasitol.*, 30:11-21.
49. Hernández M, Ramos-Martínez E, Casco-Sánchez EG, Morales-Gómez JM and Pérea-Martínez EM. (1992). Triquinosis aguda. Epidemia de 166 casos en Ciudad Delicias, Chihuahua. Diagnóstico por compresión tisular y tinción. *Gac. Méd. Méx.*, 128:(1):45.
50. Huntley JF, Gooden C, Newlands GFJ, Mackellar A, Lammas DA, Wakelin D, Tuohy M, Woodbury RG, and Miller HPR. (1990). Distribution of intestinal mast cell proteinase in blood and tissues of normal and *Trichinella spiralis* infected mice. *Parasite Immunol.*, 12:85-95.
51. Jarvis LM and Pritchard DI. (1992). An evaluation of the role of carbohydrate epitopes in immunity to *Trichinella spiralis*. *Parasite Immunol.*, 14: 489-501.
52. Katz HR. (1986). Secretory granules of heparin-containing rat serosal mast cell also possess highly sulfated chondroitin sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.*, 261: 13396.
53. Katz HR. (1990). Maturation-related changes in the expression of FcR2 and FcR3 on mast cells derived *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.*, 145: 3412.
54. Kazura JW, Grove DI. (1978). Stage-specific Antibody-dependent eosinophil-mediated destruction of *Trichinella spiralis*. *Nature*, 274: 588-589.
55. Keegan AD and Paul WE. (1992). Multichain immune recognition receptors: Similarities in structure and signaling pathways. *Immunol. Today*, 13: 63.
56. King, LC and Nutman BT. (1992). Biological role of Helper T-Cell Subsets in Helminth Infections. *Chem Immunol.*, 54:136-165.
57. King SJ and Miller MRP. (1984). Anaphylactic release of mucosal mast cell protease and its relationship to gut permeability in *Nippostrongylus* primed rats. *Immunology*, 51:653.

58. Kirshenbaum AS, Kessler SW, Golf JP and Metcalfe DD. (1991). Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *J Immunol.*, 146: 1410.
59. Krco CJ, DaC S and Wassom DL. (1982). Characterization of an *in vitro* proliferation response to solubilized *Trichinella spiralis* antigens. Role of Ia antigens and Ly I⁴ T cells. *Cell. Immunol.*, 68:359.
60. Kumate J, Gutiérrez G, Muñoz O, Santos JT. (Eds) (1994). Manual de Infectología Clínica 14a de. Méndez Editores México DF. 117-135.
61. Laemmli UK. (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680.
62. Lamas DA, Wakelin D, Mitchell LA, Tuohy M, Else KJ and Grencis RK. (1992). Genetic influences upon eosinophilia and resistance in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Parasitology*, 105:117.
63. Larsh JE. (1963). Experimental trichinosis. In: *Advances in Parasitology*. Vol. 1. Dawes, B. (ed). Acad. Press. Inc., pp. 213-286.
64. Lee TDG and Befus D. (1989). Effects of rat and human intestinal lamina propria cells on viability and muscle establishment of *Trichinella spiralis* newborn larvae. *J. Parasitol.*, 75: 124.
65. Lee TDJ, Shanahan F, Miller HRP, Bienstock J and Befus D. (1985). Intestinal mucosal mast cells: Isolation from rat lamina propria and purification using unit gravity velocity sedimentation. *Immunology*, 55:721.
66. Ljungstrom I, Hammarstrom L, Kociackaw and Smith CIE. (1988). The sequential appearance of IgG subclasses and IgE during the course of *Trichinella spiralis* infection. *Clin. Exp. Immunol.*, 75: 230.
67. Love RJ, Olgilvie BM and MacLaren DJ. (1976). The immune mechanisms which expel the intestinal stage of *Trichinella spiralis* from rats. *Immunology*, 30:7
68. Lowry ON, Rosenbrauh NJ, Al Farr AL and Randall RJ. (1951). Protein Measurement with the Folin-phenol Reagent. *J. Biochem.*, 193: 265.

69. MacLaren DJ, Ortega-Pierres G and parkhouse RME. (1987). *Trichinella spiralis*: immunocytochemical localization of surface and intracellular antigens using monoclonal antibodies probes. *Parasitology*, 6: 167.
70. McNeil and Austen, (1995). In Samteer's Immunology the Dyases. ed 5ta., Little Braumn Company Ed. Boston, USA.
71. McElroy PJ and Befus D. (1987). Effect of histamine H2 antagonist, cimetidine, on murine resistance to the intestinal nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *J. Parsitol.*, 73:666-668.
72. Mecheri S and David Bernard. (1997). Unravelling the mast cell dilemma: culprit or victim of its generosity? *Inmunol. Today*, 8(5): 212-215.
73. McKean PG and Pritchard DI. (1989). The action of mast cell protease on the cuticular collagens of *Necator americanus*. *Parasite Immunol.*, 11:293.
74. Madden KB. (1991). Antibodies to IL-3 and IL-4 suppress helminth-induced intestinal mastocytosis. *J. Immunol.*, 147: 1387.
75. Malaviya R, Ross EA, MacGregor JI, Ikeda T, Little JR, Jaschink BA and Abraham SN. (1994). Mast cell phagocytosis of FimH-Expressing Enterobacteria. *J. Inmunol.*, 152: 1907.
76. Martínez-Marañón R. (1983), Cuatro nuevos casos de triquinelosis aguda en Naucalpan. Consideraciones Sobre la Frecuencia Real de la Enfermedad en México. *Sal. Pub. Méx.*, 25:712.
77. Martínez-Marañón R. (1985). Esta aumentando la triquinelosis en México? Podría ser esto una Consecuencia inesperada de nuestro desarrollo? *Sal. Pub. Méx.*, 27:40.
78. Maziel RM, Philipp M and Ogilvie BM. (1982). Moleculas on the surface of parasit nematodes as probes of the immune response in infection. *Immunol. Rev.*, 61:105.
79. Metzger H. (1983). A tetrameric model for the structure of the mast cell receptor with high affinity for IgE. In Vy Yamamura, T Tada (eds): *Progress in immunology*. Orlando, FL: Acad. Press. Inc., pp. 493.

80. Moqbell R, Wakelin D, Mac Donald AJ King SJ, Grecis RK and Kay AB. (1987). Release of leukotrienes during rapid expulsion of *Trichinella spiralis* from immune rats. *Immunology*, 60: 425.
81. Mossman TRH, Cherwinski MW, Bond MW, Gieldlin MA and Coffman RL. (1986). Two types of murine helper T cell clone. 1. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.*, 136:2346.
82. Murray M, Miller HRP and Jarret WFH. (1968). The globule leukocyte and its derivation from the subepithelial mast cell. *Lab. Invest.*, 19(2):222-234.
83. Murrell KD, (1985a). *Trichinella spiralis*. In: Acquired immunity in swine. *Exp. Parasitol.*, 59:347.
84. Murrell KD, Leiby DA, Duffy C and Scahad GA, (1985b). Susceptibility of domestic swine to wild animal isolates of *Trichinella spiralis*, In: *Trichinellosis*, CW Kim (de). Albany, NY: The State University of New York Press., pp 301.
85. Murrell KD, Stringfellowf, Dame JB, Leiby D and Scha GA. (1987). *Trichinella spiralis* in an agricultural ecosystem. II. Evidence for natural transmission of *Trichinella spiralis* from domestic swine to wild life. *J. Parasitol.*, 73: 103.
86. Nakai Y and Ogimoto K. (1989). Serological diagnosis of Trichinosis by enzyme linked immunosobent assey (ELISA). *J. Med. Sci. Biol.*, 42:149-161.
87. Negrao-Correa LD, Adams LS and Bell RG. (1996). The dynamics of IgE production during *Trichinella spiralis* infection in rats. Quantitative significance of transport to the intestine versus serum. In: Abstract book of the 9th International Conference on Trichinellosis. México, City.
88. Newlands GFJ, Gibson S, Knox DP, Grecis RK, Wakelin D, Miller HRP. (1987). Characterization and mast cell origen of a chymotrysin-like proteinase isolated from intestines of mice infected with *Trichinella spiralis*. *Immunology*, 62: 629.
89. Oku Y, Itayama H and Kamiya M. (1984). Expulsion of *Trichinella spiralis* from the intestine of W/Wv mice reconstituted with hematopoietic and lymphopoietic cells and origen of mucosal mast cell. *Immunology*, 53:337.
90. Olsen OW. (1974). *Animal parasites, the life cycles and ecology* 3d, ed Baltimore: University Perk Press. pp, 507.

91. Olvera G. (1896). Triquinosis en México. Contribución de dos casos para la historia de la triquinosis en la capital de México. *Gac. Méd. Méx.*, 33: 167.
92. Ortega-Pierres MG, Chayen A, Clark K and Parkhouse RME. (1984). The occurrence of antibodies to hidden and exposed determinants of surface antigens of *Trichinella spiralis*. *Parasitology*, 88: 359.
93. Ortega-Pierres MG, Muñiz E, Coral-Vazquez R and Parkhouse RME. (1989). Protection against *Trichinella spiralis* induced by purified stage-specific surface antigens of infective larvae. *Parasitol. Res.*, 75: 563.
94. Ortega-Pierres MG, Yépez-Mulia L, Homan W, Gamble HR, Lim P, Takahashi Y, Wassom DL and Appleton J. (1996). Workshop on a detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: a platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. *Parasite Immunol.*, 18:273-284.
95. Oettgen HC, Martin TR, Wynshaw-Boris A, Deng C, Drazen JM and Leder P. (1994). Immediate hypersensitivity independently of IgE in actively immunized IgE-deficient mice. *Natura*, 370: 365-370.
96. Parkhouse RME., Phillip M. and Ogilvie, BM. (1981). Characterization of surface antigens of *Trichinella spiralis* infective larvae. *Parasite Immunol.*, 3:339-352.
97. Parkhouse RME. (1984). Immunopurification. *Res. Med. Bull.*, 40(3): 297-305.
98. Pincus SH and Cammarata PV. (1985). Eosinophil adherence to infective larvae of *Trichinella spiralis*: Quantification and modulation. *Immunology*, 56: 219.
99. Pincus SH, Cammarata PV, Delima M and Despommier DD (1986). Eosinophilia in murine trichinellosis. *J. Parasitol.*, 72: 321.
100. Pozio E, La Rosa G. and Rossi P. (1989). *Trichinella* Reference Center. *Parasitol. Today*, 7:81
101. Pozio E, La Rosa G, Rossi P and Murell KD. (1992). Characterization of *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. *J. Parasitol.*, 78 (4): 647-653.

102. Pozio E and Bruschi F. (1994). Updating on Trichinosis. *Parasitol. Today*, 10(2): 44-45.
103. Ramaswamy K, Negrao-Correa D, and Bell R. (1996). Local Intestinal Immune Responses to Infections with *Trichinella spiralis*. Real-Time, Continuous Assay of Cytokines in the Intestinal (Afferent) and Efferent Thoracic Duct Lymph of rats. *J. Immunology*, 156: 4328-4337.
104. Reveth JV and Kinet JP. (1991). Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, 9:957.
105. Reth M. (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature*, 338: 383.
106. Riedlinger J, Grens RK and Wakelin D. (1986). Antigen specific T cell lines transfer protective immunity against *Trichinella spiralis in vivo*. *Immunology*, 58:57.
107. Robinson M, Krco CJ, Beito TG and David CS. (1991). Genetic control of the immune response to *Trichinella spiralis*: recognition of muscle larval antigens. *Parasite Immunol.*, 13(4):391-404.
108. Romagnani S. (1992). Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for a natural immune response. *Immunol Today*, 13(10):379.
109. Roitt IM: (1991). Complement. *Essential Immunology*. 8va. ed. Blackwell Publications.(Ed). U.K. 97-198.
110. Romagnani S. (1994). Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy. *Immunology*, 6: 834-846.
111. Rothwell TLW. (1989). Immune expulsion of parasitic nematodes from the alimentary tract. *Intl.J. Parasitol.*, 19(2):139-168.
112. Russell AA and Castro GA, (1985). Anaphylactic-like reaction of small intestinal epithelium in paratized guinea-pigs. *Immunology*, 54: 573.
113. Salinas-Tobón MR, Chapa Ruiz MR and Ortegga-Pierres MG. (1993). Evaluation of *Trichinella spiralis* surface antigens from muscle larva, adult and new born larva for the diagnosis of human trichinellosis. In *Proceedings of the 8th International Conference on Trichinellosis*. Oviato, Italy.

114. Salinas-Tobón MR, Méndez-Loredo B, Valdés-Cruz C and Chapa-Ruiz MR. (1996). Class and Subclass Specific Antibody Responses to TSL-1 Antigens During *T. spiralis* Human Infection: Abstract book of the 9th International Conference on Trichinellosis. México, City.
115. Santamarina MT, Leiro J, Garrido MJ, Sanmartin, Duran ML and Uberira FM. (1988). The effect of the intestinal worms and migration L1 larvae of *Trichinella spiralis* on the production of antiparasitic IgE antibodies, Parasitol. Res., 74:581.
116. Silberstein DS and Despommier DD, (1985). Effects on *Trichinella spiralis* of host responses to purified antigens. Science, 227: 948.
117. Siraganian RP. (1974). An automated continuous-flow system for the extraction and fluorometric analysis of histamine. Anal. Biochem., 57:383.
118. Stewart GL and Giannini SH. (1982). Sarcocystic, Typanosoma, Toxoplasma, Brugia, Ancylostoma and *Trichinella* spp: Review of the intracelular parasites of striated muscle. Exp. Parasitol., 53: 406.
119. Takahashi Y, Mizuno N, Takako U, Tokuda C. and Araki T. (1990). Direct evidence that the cuticle surface of *Trichinella spiralis* muscle larvae shares antigenicity with stichocyte alfa granules and the esophagus-occupying substance. J.Parasitol., 76(2):290.
120. Takahashi Y, Takako U, Mizuno N, Tokuda C, Shimazu K and Araki T. (1991). An immunocytochemical analysis of a class-specific antibody response against *Trichinella spiralis* in humans. J. Elect. Microp., 40:136.
121. Tigelaar RE, Vaz NM and Ovary Z. (1971). Immunoglobulin receptors on mouse mast cells. J. Immunol., 106: 661.
122. Tuohy M, Lammas DA, Wakelin D, Huntley JF, Newlannd, GFJ and Miller HRP (1990). Fuctional correlations between mucosal mast cell activity and immunity to *Trichinella spiralis* in high and low responder mice. Parasite Immunol., 12:675.
123. Vannier E, Millar LC and Dinarello CA. (1991). Histamine supresses gene expression and synthesis of tumor necrosis factor alpha via histamine H2 receptors. J. Exp. Med., 174(1): 281-284.

124. Viallet J, MacLean, Goresky SA, Staudt M, Routhier G and Law C. (1986). Arctic trichinosis presenting as prolonged diarrhea. *Gastroenterology*, 91:938-946.
125. Wakelin D. (1993). Allergic inflammation as a hypothesis for the expulsion of worms from tissues. *Parasitol Today*, 9(4):115.
126. Wakelin D and Denham D. (1983). The immune response. In: *Trichinella and Trichinosis*, WC Campbell (ed.), New York: Plenum Press., pp 265.
127. Wakelin D, Donachie AM and Grencis RK. (1985). Genetic control of immunity to *Trichinella spiralis* in mice: capacity of cells from slow responder mice to transfer immunity in syngeneic and F₁ hybrid recipients. *Immunology*, 56: 203.
128. Wakelin D and Wilson MM. (1979). T and B cell in the transfer of immunity against *Trichinella spiralis* in mice. *Immunology*, 37: 103.
129. Wakelin D and Wilson MM. (1980). Immunity to *Trichinella spiralis* in irradiated mice. *Int. J. Parasitol.*, 10: 37.
130. Watanabe N, Katakura K, Kobayashi, A, Okumura K. and Ovary, Z. (1988). Protective immunity and eosinophilia in IgE-deficient SJA/9 mice infected with *Nippostrongylus brasiliensis* and *Trichinella spiralis*. *Proceedings of the National Acad. Science, USA*, 85:4460.
131. Wilkes SD and Goven AJ. (1984). Tissue eosinophil numbers and phospholipase B activity in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Int. J. Parasitol.*, 14: 479.
132. William A, Petri JR, James R, Holsinger MD, Richard D. (1988). Common-source outbreak of Trichinosis associated with eating raw home-butchered pork. *South Méd. J.* 81(8): 1056-1058.
133. Wisnewski N, McNeil M, Grieve RB and Wassom DL. (1993). Characterization of novel fucosyl- and tyvelosyl-containing glycoconjugates from *Trichinella spiralis* muscle stage larvae. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 61(1):25-36.
134. Woodbury RG, Miller HRP, Huntley JF, Newlands GFJ, Palliser AC and Wakelin D. (1984). Mucosal mast cells are functionally active during spontaneous expulsion of intestinal nematode infections in rats. *Nature*, 312:450.

135. Yépez-Mulia L, Arriaga C, Viveros N, Monroy J. and Ortega-Pierres MC. (1996). Recognition of *Trichinella spiralis* muscle larva antigens by serum samples from experimentally infected horses. In: Abstract book of the 9th International Conference on Trichinellosis. México, City.
136. Zarlenga DS and Barta JR. (1990). DNA analysis in the diagnosis of infections and the speciation of nematode parasites. Rev. Sci. Tech., 9: 533-554.
137. Zhu D and Bell RG. (1990). *Trichinella spiralis*: murine variation in response to monoclonally defined, protective, stage-specific antigens. Exp. Parasitol., 70: 330.