

11261
3
Lej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**PARTICIPACION DE LAS CELULAS CEBADAS EN LA
RESPUESTA INMUNE EN CONTRA DE *Trichinella spiralis***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

CON ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA

PRESENTA

NARCY GUADALUPE ARIZMENDI PUGA

TUTORES

DRA. LILIAN YEPEZ MULIA

DR. JOSE ANTONIO ENCISO MORENO

MEXICO ,D. F., OCTUBRE DE

1999

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

273189



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo de tesis se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría-Centro Médico Nacional Siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) la beca que me brindo para realizar mis estudios de Maestría a través de la subdirección de apoyo al posgrado siendo el becario 90723. Asimismo, agradezco el apoyo financiero para la realización de este trabajo de tesis a través del proyecto No. 5098/M9406.

Agradezco al Instituto Mexicano del Seguro Social por estimular la investigación realizada por los estudiantes de posgrado, en particular a mí con los apoyos económicos a mi proyecto de investigación y con la beca otorgada a mi persona

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Lilián Yépez Múlia que me haya dirigido tan sabiamente y me haya brindado la oportunidad, la confianza y la libertad para realizar mi trabajo de tesis y me brindo la oportunidad y el apoyo para realizar 2 estancias trabajo en Canadá, la Dra Yépez es una de las personas a quién admiro y de quién he aprendido mucho a nivel académico y humano, porque ella me ha apoyado en todos los ámbitos de mi vida y es una persona que me honra con su amistad, la cual tiene un valor incalculable y sobrepasa todas las fronteras.

Al Dr. José Antonio Enciso Moreno de quién he aprendido muchas cosas y siempre me ha apoyado y dirigido sabiamente, quién ha trabajado asesorandome y sugiriendo mejoras a mi tesis, además le agradezco la oportunidad de permitirme trabajar en su laboratorio y de haberme brindado la oportunidad de trabajar en el laboratorio del Dr. Dean Befus para el enriquecimiento de mi trabajo de investigación, por su amistad y su ayuda, GRACIAS.

Al Dr. Albert Dean Befus quién me brindo la oportunidad de realizar dos estancias académicas en su laboratorio en la Universidad de Alberta, Canadá y quién muy amablemente ha participado durante toda mi Maestría en la revisión de mi proyecto de investigación.

Al Dr. Roberto Cedillo por su apoyo, confianza y amistad y quién ha participado durante la realización de mi proyecto de investigación, le doy las gracias por su atención y sus comentarios.

A la Dra. Guadalupe Ortega Pierres quién participó como parte de mi comité académico y quién además me ha apoyado durante mi Licenciatura y Maestría.

Al Dr. Onofre Muñoz quién ha apoyado y estimulado la realización de mi proyecto de investigación.

A todos mis amigos Noemí, Raúl, Oscar, Pablo, Gloria, Mauricio, Ma. Del Carmen, Norma, Hilda, Paty, Mónica y Lolita quienes siempre me han apoyado y con quién he pasado momentos muy agradables.

A mis revisores de tesis por sus comentarios en el análisis de este manuscrito.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a las personas más importantes en mi vida, mis padres Miguel y Gloria y a mis hermanos Carlos, Miguel e Ivonne con todo mi cariño, les agradezco todo su interés, apoyo, confianza y su cariño.

A Ramsés porque es la persona que más admiro, el ser con más calidez humana, más atento, divertido, maduro y sensible de mi mundo, de él aprendo algo nuevo cada día, me entiende, me apoya, me ayuda y me ha estimulado a continuar creciendo como persona, quién me ha enseñado a lo largo de nuestro camino el significado de la frase *"Dale a un hombre un pescado y lo alimentas un día, enséñalo a pescar y lo alimentarás toda la vida"* y quién me ha inspirado todo este tiempo a hacer mi mayor esfuerzo en todo lo que hago ¡no me ha hecho la vida fácil! y lo más importante quién me ha permitido amarlo intensamente, en fin, porque se que siempre cuento con él para todo.

A MIS PROFESORES

Me encantaría poder decir que en la escuela elemental, superior o universitaria tuve profesores de ciencias que me inspiraron. Pero, por mucho que busco en mi memoria, no encuentro ninguno. Se trataba de la pura memorización de la tabla periódica de los elementos, palancas y planos inclinados, la fotosíntesis de las plantas verdes y la diferencia entre la antracita y el carbón bituminoso. Pero no había ninguna elevada sensación de maravilla, ninguna sensación de una perspectiva evolutiva, nada sobre ideas erróneas que todo el mundo había creído ciertas en otra época. Se suponía que en los cursos de laboratorio de la escuela debíamos encontrar una respuesta. Si no era así, nos reprobaban. No se nos animaba a profundizar en nuestros propios intereses, ideas o errores conceptuales. Al final del libro de texto había material que parecía interesante, pero el año escolar siempre terminaba antes de llegar a dicho final. Era posible ver maravillosos libros de ciencia, por ejemplo en las bibliotecas, pero no en la clase. Se nos enseñaba la división larga como si se tratara de una serie de recetas de un libro de cocina, sin ninguna explicación de cómo esta secuencia particular de divisiones cortas, multiplicaciones y restas daba la respuesta correcta. En la escuela se nos enseñaba con reverencia la extracción de raíces cuadradas, como si se tratara de un método entregado tiempo atrás en el monte Sinaí. Nuestro trabajo consistía meramente en recordar lo que se nos había ordenado: "consigue la respuesta correcta, no importa que entiendas lo que haces". En todos aquellos años de escuela, mantuve mi interés por la ciencia leyendo libros y revistas sobre realidad y ficción científica.

La Maestría fue la realización de mis sueños, encontré profesores que no sólo entendían la ciencia sino que realmente eran capaces de explicarla. Tuve la suerte de estudiar en las mejores instituciones del saber de esta época.

En este ambiente embriagador pude rellenar algunas lagunas de mi educación. Se me aclararon muchos aspectos que me habían parecido profundamente misteriosos, y no sólo en la ciencia. También fui testigo de primera mano de la alegría que sentían los que tenían el privilegio de descubrir algo sobre el funcionamiento de la inmunología.

Siempre me he sentido agradecida a mis mentores Lilián y Antonio y he hecho todo lo posible para que ellos conocieran mi aprecio. Pero cuando hecho la vista atrás me parece que lo más esencial no lo aprendí de mis maestros de la escuela, ni siquiera de mis profesores de la universidad, sino de mis padres Miguel Angel Arizmendi y Gloria Puga, que no sabían nada en absoluto de ciencia y que lograron sembrar en mí la pasión por el conocimiento mismo.

ABREVIATURAS

AcMc	anticuerpos monoclonales
AHT	amortiguador Hepes Tyrode
ASB	albúmina sérica bovina
CC	células cebadas
CPA	carboxipeptidasa A
DO	densidad óptica
ELISA	ensayo inmunoenzimático en placa sólida
ER	expulsión rápida
ET	extracto total
FcεRI	receptor para la fracción cristalizable de la IgE
FC-GM	factor estimulador del crecimiento gránulocito macrófago
IFNγ	interferon gamma
IET	inmunoelctrotransferencia
IL	interleucina
kDa	kilo Daltones
LTC	leucotrienos
LM	larva muscular
LRN	larva recién nacida
P5	proteasa 5
PBS	amortiguador salino de fosfatos
PG	prostaglandinas
p. i.	post infección
PMSF	Fenil Metil Sulfonil Fluoruro
RANTES	Proteína regulada y secretada por células T activadas
RMCP	proteasas de células cebadas de rata
RT-PCR	transcripción reversa por reacción en cadena de la polimerasa
SCF	factor estimulador de células cebadas
SDS-PAGE	geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
Th	células T cooperadoras
TLCK	N-α-p-Tosil-L-Lisina Clorometil Cetona
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TPCK	L-1-Tosil-2-Fenil-Etilclorometil Cetona
UE	unidades equivalentes

	Página
INDICE	7
INDICE DE TABLAS	9
INDICE DE FIGURAS	9
RESUMEN	10
ANTECEDENTES	11
Parásitos en salud pública	
Proceso de expulsión rápida de <i>Trichinella spiralis</i>	15
Origen y distribución de las células cebadas.....	24
Biología de las células cebadas.....	26
Respuesta inmune mediada por IgE.....	29
Participación de las CC en la respuesta inmune contra diferentes agentes infecciosos.....	30
JUSTIFICACION	34
HIPOTESIS	35
OBJETIVO GENERAL	35
OBJETIVOS PARTICULARES	35
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	36
MATERIALES Y METODOS	
Infección experimental en ratas con <i>Trichinella spiralis</i>	37
Obtención del extracto total de la LM de <i>T. spiralis</i>	37
Purificación de los antígenos de superficie de la LM de <i>T. spiralis</i>	38
Determinación de la concentración de proteínas en los antígenos de <i>T. spiralis</i>	41
Electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	39
Detección de endotoxina en el extracto total y en los antígenos de superficie de la LM de <i>T. spiralis</i>	40
Aislamiento y purificación de células cebadas de peritoneo de rata (CCP).....	41
Estimulación de CCP con el extracto total y con los antígenos de superficie de la LM de <i>T. spiralis</i>	42
Cuantificación de histamina liberada por CCP estimuladas con antígenos de <i>T. spiralis</i>	42
Determinación de la actividad proteolítica total en sobrenadantes de CCP estimuladas por los antígenos de superficie <i>T. spiralis</i>	43
Inhibición de la actividad de proteasas de serina y metaloproteasas en sobrenadantes de CCP estimuladas por los antígenos de superficie de <i>T. spiralis</i>	44
Determinación de proteasa 5 y carboxipeptidasa A liberadas por CCP estimuladas con los antígenos de superficie de <i>T. spiralis</i>	44
Cuantificación de TNF α liberado en sobrenadantes de CCP estimuladas con los antígenos de superficie de la LM de <i>T. spiralis</i>	45
Análisis estadístico.....	46
RESULTADOS	
Análisis electroforético del extracto total de la LM de <i>T. spiralis</i>	47
Análisis de los antígenos de superficie purificados de la LM de <i>T. spiralis</i>	48

	Página
Cuantificación de endotoxina presente en las preparaciones antigénicas obtenidas de <i>T. spiralis</i>	49
Aislamiento y purificación de células cebadas de peritoneo de rata.....	49
Cuantificación de histamina liberada por células cebadas de peritoneo de rata estimuladas con antígenos de <i>T. spiralis</i>	49
Determinación de la actividad proteolítica total en sobrenadantes de CCP estimuladas con los antígenos de superficie de <i>T. spiralis</i>	51
Caracterización de las proteasas liberadas por las CCP tratadas con los antígenos de superficie de la LM de <i>T. spiralis</i>	54
Determinación específica de proteasa 5 y carboxipeptidasa A liberadas por las CCP tratadas con los antígenos de superficie de la LM de <i>T. spiralis</i>	57
Cuantificación de TNF α liberado por las CCP tratadas con los antígenos de superficie de la LM de <i>T. spiralis</i>	59
DISCUSION	61
CONCLUSIONES	66
REFERENCIAS	67

INDICE DE TABLAS

Página

TABLA 1. Niveles de proteasa de mucosa intestinal (IMCP) determinados en lavados intestinales de cepas de ratones con diferente capacidad de respuesta contra la infección por <i>Trichinella spiralis</i>	20
TABLA 2. Heterogeneidad de células cebadas de rata.....	26

INDICE DE FIGURAS

Página

FIGURA 1. Ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i>	13
FIGURA 2. Representación esquemática del perfil de citocinas secretadas (IL-4, IL-5, IFN γ) en el intestino de ratas de 0 a 300 h después de la infección con <i>Trichinella spiralis</i>	21
FIGURA 3. Participación de las células cebadas en la regulación de la respuesta inmune tipo Th2, contra parásitos helmintos.	22
FIGURA 4. Ontogenia de células cebadas.....	25
FIGURA 5. Diferentes estímulos que activan a células cebadas y mediadores preformados y sintetizados <i>de novo</i> que son liberados por células cebadas bajo activación	30
FIGURA 6. Análisis electroforético del extracto total de la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i>	47
FIGURA 7. Análisis electroforético de los antígenos purificados de superficie de la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i>	48
FIGURA 8. Porcentaje de histamina liberada por células cebadas de peritoneo estimuladas con el extracto total de la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i>	50
FIGURA 9. Porcentaje de histamina liberada por células cebadas de peritoneo estimuladas con los antígenos de superficie de la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i>	52
FIGURA 10. Niveles de actividad proteolítica total presente en sobrenadantes de células cebadas de peritoneo tratadas con los antígenos de superficie de la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i>	53
FIGURA 11. Porcentajes de inhibición de proteasas tipo serina presentes en sobrenadantes de células cebadas de peritoneo tratadas con los antígenos de superficie de la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i>	55
FIGURA 12. Porcentajes de inhibición de metaloproteasas presentes en sobrenadantes de células cebadas de peritoneo tratadas con los antígenos de superficie de la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i>	56
FIGURA 13. Análisis del reconocimiento de la proteasa 5 y carboxipeptidasa A presentes en la pastilla de células cebadas de peritoneo tratadas con diferentes concentraciones de los antígenos de superficie de la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i>	58
FIGURA 14. TNF α liberado por CCP tratadas con los antígenos de superficie de la LM de <i>Trichinella spiralis</i> ...	60

RESUMEN

El proceso de expulsión del organismo adulto de *Trichinella spiralis* es el primer mecanismo de defensa del hospedero en contra de la infección. En este proceso se ha demostrado la participación de las células cebadas (CC) y de mediadores de inflamación liberados por este tipo celular. Asimismo, se ha demostrado que la expulsión del parásito adulto es inducida por la larva muscular (LM) y el pre-adulto de *T. spiralis*. Sin embargo, no se han caracterizado los antígenos específicos de *T. spiralis* que participan en la estimulación de las CC. Por otro lado, se ha demostrado que durante la fase intestinal de la infección con *T. spiralis*, la respuesta inmune que se induce preferentemente es del tipo Th₂, relacionándose con los cambios inmunes observados en animales infectados con el parásito, entre los que se encuentran: proceso inflamatorio en el intestino, mastocitosis, eosinofilia y niveles altos de IgE. Recientemente se ha sugerido que las CC participan mediante la producción de interleucinas (principalmente IL-4), en la inducción temprana de una respuesta inmune local Th₂ contra parásitos intestinales; siendo posible que las CC respondan directamente a antígenos de estos parásitos. Considerando lo anteriormente mencionado, el objetivo de este trabajo consistió en evaluar el papel de los antígenos de superficie purificados de la LM de *T. spiralis* en la activación de CC de peritoneo (CCP) de rata mediante un mecanismo independiente de IgE. Como marcadores de estimulación se determinó la liberación de histamina mediante un ensayo fluorométrico empleando o-ptaldialdehído, la liberación de proteasas específicas de CCP como son la proteasa 5 y la carboxipeptidasa A (CPA) mediante inmunoelectrotransferencia (IET) y un análisis densitométrico, así como la liberación de TNF α mediante un ensayo inmunoenzimático. En los ensayos de estimulación se utilizaron CCP de ratas de la cepa *Sprague Dawley* no infectadas e infectadas con *T. spiralis*. Las CCP se purificaron mediante gradientes discontinuos de Percoll y se incubaron en presencia de los antígenos de superficie purificados de la LM de *T. spiralis* a diferentes concentraciones por 30 min a 37°C. Como control positivo de estimulación se incluyó al ionóforo de calcio A23187 a una concentración de 2.5 μ M y como control negativo CCP de ratas no tratadas con el antígeno. En los ensayos de estimulación de las CCP de ratas infectadas y CCP de ratas no infectadas tratadas con el ET de *T. spiralis* se observó un máximo de liberación de histamina del 38 y 43 % cuando se emplearon las concentraciones de 0.1 y 0.5 μ g/ml respectivamente. Por otro lado, cuando las CCP de ratas infectadas y CCP de ratas no infectadas se expusieron a los antígenos de superficie del parásito el máximo porcentaje de liberación obtenido fue de aproximadamente 35 % a las concentraciones de 10 y 30 η g/ml respectivamente. Por IET y análisis densitométrico se observaron los valores máximos de liberación de la P5 a la concentración de 30 η g/ml siendo estadísticamente significativas entre las CCP de ratas infectadas y CCP de ratas no infectadas. Por otro lado, los valores de CPA liberada tanto por las CCP de ratas infectadas como CCP de ratas no infectadas fueron similares y en el caso de la liberación de TNF α se observó una respuesta de tipo dosis-dependiente en las CCP de ratas no infectadas y en las CCP de ratas infectadas no se observaron diferencias en cuanto a la respuesta a las diferentes concentraciones del antígeno probados. Estos resultados muestran que los antígenos de superficie de la LM de *T. spiralis* estimulan la liberación de histamina, proteasas y TNF α por CC mediante un mecanismo independiente de IgE sugiriendo la participación de las CC en la respuesta inmune innata en contra de *T. spiralis*, así como la regulación de la respuesta inmune local.

ANTECEDENTES

PARASITOS EN SALUD PUBLICA

Las infecciones y enfermedades producidas por helmintos intestinales en seres humanos son de gran importancia médica especialmente en los países en vías de desarrollo y aunque la mortalidad ocasionada por esas infecciones es relativamente baja, la morbilidad producida por ellas es alta.

Se estima que en el mundo entre 800 y 1000 millones de individuos se encuentran infectados con *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis* y *Trichuris trichiura*; 600 millones con *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale*, 300 millones con *Onchocerca volvulus* y 200 millones con *Schistosoma mansoni* (Warren 1990). Aunque la triquinelosis es también una enfermedad parasitaria, los niveles de infección con *Trichinella spiralis* no se conocen con exactitud. En México, las parasitosis han sido la quinta causa de consulta en el Instituto Mexicano del Seguro Social y la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud incluye a las helmintosis dentro de las 20 principales causas de morbilidad general (Gómez-Dantés y Khoshnood 1991).

En general, la morbilidad de las helmintosis está asociada a la carga parasitaria. La persistencia de la infección con la acumulación progresiva de parásitos puede inducir complicaciones crónicas, como la enfermedad hepatoesplénica inducida por *Schistosoma mansoni*, linfoedema y elefantiasis inducida por filarias linfáticas y ceguera causada por *Onchocerca volvulus* (Maizels y cols. 1993).

Entre las características de los parásitos helmintos que infectan humanos se encuentran: la persistencia por largos periodos de tiempo dentro del huésped; la inducción de inmunidad protectora después de la exposición al parásito, ciclos de vida complejos que les permiten evadir o modular la respuesta inmunitaria de su huésped, induciendo tolerancia o anergia en una infección repetida; amplia distribución en comunidades humanas y la ocurrencia en individuos predispuestos a la infección.

Otra característica importante que poseen todos los parásitos nemátodos helmintos es la presencia de una cutícula, la cual proporciona al organismo protección contra algunos mecanismos inmunoprotectores del huésped. Sin embargo, en la cutícula se expresan moléculas antigénicas hacia las cuales el huésped reacciona frecuentemente y son el blanco de ataque de los macrófagos, granulocitos y plaquetas, a través de la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos. En términos generales, se conoce muy poco acerca del metabolismo de estos parásitos, pero se ha descrito que liberan varias moléculas, algunas de las cuales inducen por parte del huésped una intensa respuesta inmune. Esas moléculas están asociadas con la alimentación, penetración a los tejidos, excreción, reproducción y movilidad.

La infección con parásitos provoca regularmente un proceso inflamatorio, en el cual ocurre la liberación de potentes mediadores preformados o sintetizados *de novo* por parte de las células inmunes. Estas moléculas tienen un papel importante en la regulación de la respuesta inmune del huésped contra los parásitos.

En la mayoría de las infecciones por helmintos no existen modelos experimentales adecuados que permitan estudiar los procesos inmunes, pero en los casos en los que existen modelos experimentales, se han podido estudiar los mecanismos efectores del huésped, la biología misma del parásito y la patología de la enfermedad que estos producen.

A este respecto, la respuesta inmune en contra de *T. spiralis* ha sido ampliamente estudiada debido a que el ciclo de vida de este nemátodo, que incluye la fase sistémica representada por la larva muscular (LM) y la larva recién nacida (LRN) y la fase intestinal representada por el adulto, puede llevarse a cabo en roedores en un tiempo relativamente corto. Estos modelos han permitido obtener y estudiar cada uno de los tres estadios de desarrollo del parásito (LM, LRN y adulto) así como la relación huésped-parásito que se establece tanto a nivel sistémico como enteral.

Así, se sabe que la trichinelosis, enfermedad causada por *T. spiralis*, se inicia por el consumo de carne infectada con la LM de este parásito. Posteriormente, mediante la acción de enzimas y de diversos componentes presentes en el ambiente estomacal, las LM de *T. spiralis* se liberan de la estructura conocida como célula nodriza, se establecen en el intestino delgado, donde el parásito sufre varias mudas hasta madurar a hembras y machos adultos. Poco después se lleva a cabo la cópula y las hembras liberan a las LRN, las cuales son capaces de atravesar la mucosa intestinal y migrar al músculo, vía circulación sanguínea o linfática; las larvas llegan al músculo en los días 17 a 21 posteriores a la infección, penetran a las células musculares y ahí se desarrollan en LM, transformando la célula muscular a célula nodriza (Fig. 1). La célula nodriza es una estructura que parece facilitar el transporte y almacenamiento de nutrientes tanto para la célula como para la LM exportando los desechos metabólicos y productos derivados del parásito al espacio extracelular (Stewart 1983). En la formación de la célula nodriza se agregan las mitocondrias, hay una hipertrofia de los núcleos, aparecen nucléolos prominentes y se forma una cubierta gruesa de colágena, desarrollándose una compleja red de vénulas (Despommier 1998).

Es importante mencionar que en años recientes, la trichinelosis ha cobrado gran importancia en varios países, debido al hecho de que las fuentes de transmisión no han sido controladas adecuadamente, observándose brotes de trichinelosis en diversas zonas del mundo. Entre las fuentes de transmisión más importantes se encuentra al cerdo, aunque en los últimos años se ha observado un incremento en los casos de trichinelosis humana por consumo de carne de otros animales como caballo, oso, jabalí, marmota y zorra, entre otros (Murrell y cols. 1987).

Estudios acerca de la caracterización de antígenos de *T. spiralis* relevantes en la relación huésped-parásito (Phillipp y cols. 1980; Silberstein 1983; Ortega-Pierres y cols. 1984) han señalado que los antígenos de superficie y de excreción-secreción

(E/S) constituyen un estímulo antigénico complejo que induce una respuesta humoral y celular específica por parte del huésped (Wakelin y Denham, 1983).

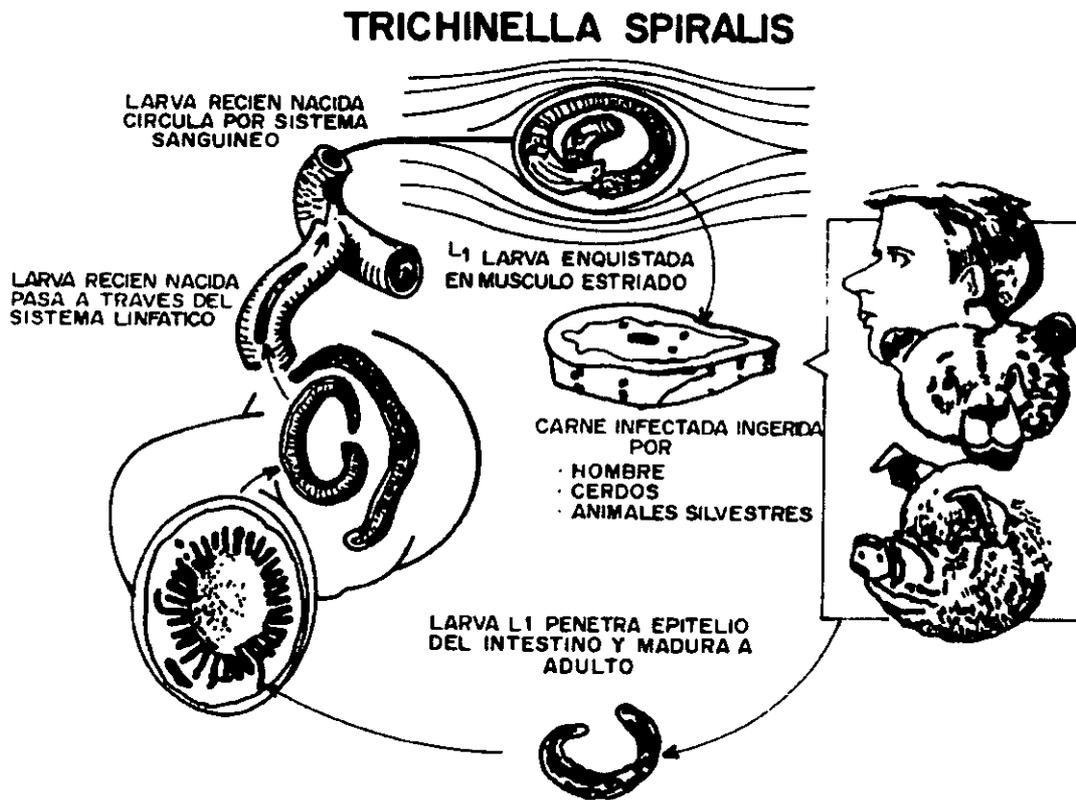


Fig. 1. Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*.

Tomado de Murrell y cols. (1985)

En modelos murinos se ha demostrado que los productos de E/S producidos por el esticosoma, órgano secretor del parásito y las moléculas de superficie de la LM de *T. spiralis*, son capaces de inducir una inmunidad protectora contra la infección (Bell y cols. 1979; Ortega-Pierres y cols. 1989; Gamble y Graham 1984).

La respuesta inmune contra las infecciones por *T. spiralis*, se ha estudiado principalmente a nivel de la respuesta humoral y en humanos se ha determinado la presencia de anticuerpos IgM, IgG, IgE e IgA, así como la aparición específica de IgG4 en una infección crónica (Ljungstrom y cols. 1988). Además, Almond y cols. (1986) demostraron que sueros de humanos infectados con *T. spiralis* reconocen preferentemente los componentes de superficie y de E/S de la LM. Asimismo, Takahashi y cols. (1991) demostraron que los sueros de humanos infectados con este parásito contienen predominantemente anticuerpos de isotipo IgM con reactividad hacia componentes de superficie y del esticosoma de *T. spiralis*. Estos mismos componentes son reconocidos por una gran variedad de huéspedes entre los que se incluyen ratas,

ratones, cerdos, caballos y otros animales silvestres (Ortega-Pierres y cols., 1989; Robinson y cols., 1991; Yépez- Múlia y cols., 1996).

Debido a la gran complejidad e inmunogenicidad de estas moléculas, varios grupos de investigación realizaron un Taller Internacional en Biltoven, Holanda en 1991, para analizar la reactividad de diferentes anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra diferentes preparaciones antigénicas provenientes de los tres estadios de desarrollo de *T. spiralis*. En este Taller, se llevó a cabo el análisis de los componentes antigénicos de los extractos crudos del parásito, así como de los productos de E/S y de los antígenos de superficie de la LM por medio de ELISA, inmunoelectrotransferencia (IET) e inmunoprecipitación. Con base en los resultados obtenidos en esta reunión, los antígenos de *T. spiralis* se clasificaron en diferentes grupos, de acuerdo principalmente a su reconocimiento por diferentes anticuerpos generados contra ellos. De esta forma, los productos de E/S así como los antígenos de superficie quedaron considerados dentro del grupo TSL-1 (Appleton y cols. 1991).

Dada la importancia inmunogénica de los antígenos TSL-1, se realizaron estudios acerca de su naturaleza bioquímica. Así se demostró que el epítipo responsable de la inmunodominancia de los antígenos TSL-1 es el azúcar 3,6-dideoxiarabinohexosa (**Tivelosa**), presente en cantidades elevadas en estos antígenos (Wisnewski y cols. 1993). La importancia de este residuo glucosídico radica en que es específico del género *Trichinella* y aunque se ha reportado la presencia de tivelosa en ciertos lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas y en huevecillos de *Ascaris*, su enlace glucosídico es diferente, siendo beta en los antígenos TSL-1 y alfa en los otros antígenos mencionados. Este enlace glucosídico beta hace que anticuerpos dirigidos contra los antígenos TSL-1 no reconozcan a la alfa tivelosa presente en bacterias. Otra característica importante en la composición de carbohidratos de los extractos crudos de la LM y de los antígenos TSL-1, es la elevada concentración de fucosa (36 %). En la actualidad, los estudios de estos carbohidratos están orientados a definir su participación en las infecciones por *T. spiralis* (Wisnewski y cols. 1993).

Por otro lado, el conocimiento de los mecanismos inmunes que se inducen contra *T. spiralis*, ha sido sustentado principalmente en estudios realizados con modelos murinos (Wakelin 1978). De esta forma, se sabe que las células T de ratones infectados con *T. spiralis* responden *in vitro* a componentes de la LM (Krcó y cols. 1982) y que los productos de estas células activadas son capaces de inducir mastocitosis, eosinofilia, niveles altos de IgE y una expulsión acelerada de los parásitos adultos del intestino de ratones infectados (Riedlinger y cols. 1986).

Se ha observado que ocurre una respuesta inmune protectora del tipo Th₂ en contra de *T. spiralis* (Urban y cols. 1992). Lo anterior se ha determinado mediante la medición de niveles de citocinas producidas por células aisladas de diferentes tejidos de animales inmunes (Grencis y cols. 1991; Pond y cols. 1992), por la transferencia adoptiva de protección con células inmunes capaces de secretar *in vitro* citocinas del tipo Th₂ (Ramaswamy y cols. 1994; Bell y cols. 1987; Korenaga y

cols. 1989), o también por estudios con animales "knockout" o transgénicos (Taverne 1994). Finalmente, esto también ha sido documentado en modelos animales donde se usan anticuerpos neutralizantes para estas citocinas (Coffman y cols. 1989; Else y cols. 1992).

Esta respuesta Th₂ durante la infección con *T. spiralis* en modelos murinos se ha relacionado con los cambios inmunes generalmente observados durante la infección, incluyendo el proceso inflamatorio en el intestino, la mastocitosis, la eosinofilia y los niveles altos de IgE. Tanto la mastocitosis como el proceso inflamatorio son controlados por una variedad de citocinas producidas por células Th₂, tales como IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, siendo particularmente la IL-5 importante en la producción de eosinófilos y la IL-4 en la producción de IgE (Mossman y cols. 1986) y en el proceso de maduración y diferenciación de células cebadas (CC) (Galli 1990).

PROCESO DE EXPULSION RAPIDA DE *Trichinella spiralis*

Durante la respuesta inmune en contra de *T. spiralis* se observa un proceso de expulsión del organismo adulto, el cual se considera como el mecanismo principal de defensa del huésped contra la infección. Este mecanismo de expulsión presenta características de memoria inmunológica, ya que animales inmunes, desafiados inmediatamente después de la expulsión del parásito en una infección primaria, pueden desarrollar una respuesta en contra del nuevo inóculo, previniendo su establecimiento y reduciendo la sobrevivencia de los parásitos (Miller 1984). Un aspecto de gran importancia es que en términos generales durante una respuesta inmune contra parásitos helmintos intestinales, incluyendo a *T. spiralis*, los mecanismos inducidos son similares. Brandtzaeg y cols. (1985) propusieron que estos mecanismos pueden incluirse en tres componentes principales **1. La exclusión inmune** que representa la "primera línea" de defensa y que se refiere a la protección por anticuerpos en la superficie de las mucosas, IgA secretora e IgM principalmente y por otros factores innatos; **2. La regulación inmune**, que es un mecanismo complejo de defensa de "segunda línea", el cual implica respuestas celulares específicas, especialmente en las placas de Peyer y en otros tejidos linfoides asociados al intestino y que incluye la diferenciación y activación de células B y su interacción con varias subpoblaciones de células T; **3. La eliminación inmune**, que involucra reacciones inflamatorias específicas e inespecíficas generadas por varios tipos celulares y sus productos que amplifican y aumentan la actividad protectora en la superficie de las mucosas.

Por otro lado, Jarret y cols. (1968) han establecido que en ratas infectadas después de una infección primaria con parásitos helmintos, una proporción de las larvas infectivas es eliminada (fase de pérdida 1), mientras que los sobrevivientes se establecen y maduran (fase de crecimiento), aunque muchos son expulsados (fase de pérdida 2 o "cura espontánea"), quedando una pequeña población residual (fase umbral). Sin embargo, en infecciones secundarias y especialmente en infecciones terciarias, la fase de crecimiento se acorta y los parásitos se expulsan en la fase de pérdida 2 a una velocidad

acelerada. Esto produce la expulsión total de los parásitos alrededor de los 12-14 días después de la infección. En la cura espontánea, mecanismos dependientes de células Th₂ controlan y regulan la respuesta inmune y el proceso inflamatorio. En general, se ha aceptado que la expulsión de los parásitos es causada por cambios inflamatorios en el intestino más que por la respuesta inmune que los precede.

En relación a esto, en ratas infectadas se ha demostrado que en infecciones secundarias por *T. spiralis*, la mayoría de las larvas reinoculadas se expulsan más rápido después de administrado el inóculo (Love y cols.1976), o después de la introducción de los parásitos en el duodeno sin que se establezcan en su nicho intraepitelial (Russell y Castro, 1979). Es así que el término de "expulsión rápida" (ER) fue acuñado por Bell y cols. (1979). Este término de ER se aplica dada la velocidad con que ocurre este proceso. Asimismo, se observó en cepas de ratas singénicas con diferencias de susceptibilidad determinadas genéticamente, que la ER depende del estado inmune, del genotipo del huésped, así como del número de larvas infectivas (Nawa y Miller, 1979).

Tuohy y cols. (1990), demostraron que también diferentes cepas de ratones tienen distinta capacidad para expulsar al organismo adulto de *T. spiralis* del intestino infectado. Así, los ratones de la cepa NIH mostraron una rápida cinética de expulsión, mientras que los SWR tienen una respuesta moderada. Por su parte, los ratones de la cepa B10 tienen una respuesta baja. La pérdida de los parásitos de una infección primaria fue de aproximadamente 90 % en los ratones NIH en el día 15 posterior a la infección (p.i.), mientras que los ratones SWR respondieron hasta el día 20, y los B10 hasta el día 32 después de la infección.

Usando el concepto de ER, Bell y McGregor (1979) determinaron la capacidad de las diferentes fases del ciclo de vida de *T. spiralis* para inducir la expulsión del organismo adulto del intestino de ratas, encontrando que existen diferencias cuantitativas en la capacidad de ER en términos de la cinética de expulsión. Estos investigadores observaron que la ER del parásito se realizaba de manera más efectiva (97 y 95 % en la reducción de la carga parasitaria del adulto), cuando los animales previamente sensibilizados fueron infectados localmente a nivel intestinal con adultos jóvenes (de 1 día) o con LM de *T. spiralis*. Sin embargo, la ER disminuía cuando la infección se realizaba con adultos maduros (de 2 a 4 días). Los investigadores sugirieron que los adultos maduros penetran de manera diferente a la mucosa de como lo hacen las LM y los adultos jóvenes, ya que los primeros no producen una reacción inmune en su contra. Esto probablemente se deba a que existen factores de la LM que son liberados en, o inmediatamente después de la penetración de la mucosa, generando una respuesta inmune más acentuada. La ER del organismo adulto se puede explicar entonces como una consecuencia de la exposición de los estadios de LM y de adultos jóvenes, como se observa en estos resultados experimentales.

Por otro lado, ratas lactantes previamente infectadas con *T. spiralis* son capaces de expulsar el 99 % de los adultos en una infección secundaria con la LM del parásito (Appleton y McGregor 1984). En este caso, se ha observado que la tivelosa

induce la producción de anticuerpos específicos que promueven la ER (Bell y McGregor 1979; Appleton y cols. 1988; Ellis y cols. 1994). Esto es reforzado por el hecho de que las ratas recién nacidas pasivamente inmunizadas con anticuerpos anti-tivelosa presentan la ER después del desafío con la LM de *T. spiralis*. Así, McVay y cols. (1998) evaluaron *in vitro* la protección conferida por los anticuerpos 18H y 9E (IgG2a e IgG2c respectivamente), específicos para tivelosa. En este estudio, se realizaron ensayos de invasión *in vitro* de células epiteliales MDCK con las LM previamente cultivadas con los anticuerpos anti-tivelosa. Los resultados obtenidos mostraron que la presencia de anticuerpos anti-tivelosa protegen a las células epiteliales de ser infectadas por la LM.

Sin embargo, en ensayos *in vivo* se ha observado que otras sustancias como el moco intestinal pueden también ayudar a inhibir la penetración del epitelio por la LM, reteniéndolos en el lumen intestinal, donde posteriormente la LM es cubierta por los anticuerpos anti-tivelosa. No obstante, este proceso es reversible y no es suficiente para tener un efecto importante en la protección (Carlisle y cols. 1990; 1991). Sin embargo, la hipersecreción de moco es una característica principal en el proceso de expulsión de parásitos y se ha señalado que el moco atrapa y/o excluye a las larvas invasoras en las ratas inmunes después de una infección secundaria (Lee y Ogilvie, 1981; Miller y cols. 1981). El efecto inmune del moco se ha hecho evidente porque en él se han encontrado productos humorales tales como anticuerpos y mediadores inflamatorios secretados por varias células de la mucosa intestinal. Así, el moco intestinal junto con otros compuestos tiene una actividad antiparasitaria y puede contribuir directamente en el daño a los parásitos (Miller 1984).

Por otro lado, Appleton y cols. (1987 y 1988) observaron que la capacidad de la ER puede ser transferida a ratas lactantes por anticuerpos IgG₁ e IgG₂ presentes en el suero de ratas infectadas. Estos autores sugieren además que no existe participación de IgE en la expulsión ya que no ocurrió transferencia de inmunidad cuando el suero inmune fue tratado con calor.

Resultados similares en cuanto a la participación de la IgE en la ER fueron obtenidos por Watanabe y cols. (1988) empleando ratones de la cepa SJA/9 deficientes en IgE infectados con *T. spiralis*, observando que la carga parasitaria de la LM en estos ratones y en ratones controles eran muy similares. Sin embargo, Ahmad y cols. (1991), demostraron que la transferencia pasiva de IgE purificada de sueros de ratas infectadas con *T. spiralis*, es capaz de mediar la ER de organismos adultos en ausencia de otras inmunoglobulinas.

Otras evidencias a favor de la participación de IgE en la expulsión del organismo adulto provienen de estudios realizados por Negrao-Corréa y cols. (1996), los autores cuantificaron la IgE presente tanto en intestino como en circulación durante la infección de ratas con *T. spiralis*, demostrando que los niveles de IgE total eran más elevados (2570 µg/día) en el fluido intestinal que en el suero y en la linfa (4.6 y 5.2 µg/día respectivamente). Además, observaron que la producción y el consumo de IgE presente en las ratas 10 días después de la infección intestinal con el parásito ocurre en el lumen del

intestino. Además, la IgE obtenida de lavados intestinales al día 11 p.i. es capaz de reconocer antígenos del adulto y de la LM de *T. spiralis*, sugiriendo que la IgE específica participa en el recubrimiento del parásito y posiblemente en la expulsión de éste.

La participación de IgE en la ER de *T. spiralis* es bastante sugestiva y es importante hacer notar que la respuesta inmune contra parásitos helmintos en humanos y animales parece tener varias características similares a las reacciones alérgicas dependientes de IgE, en donde ocurre aumento en la concentración de IgE total y antígeno específica, incremento en el número de eosinófilos en la sangre y en los tejidos, así como signos y síntomas de activación de células cebadas (CC). Esto es importante porque la respuesta citotóxica mediada por anticuerpos (IgG₄, por ejemplo) puede ser enormemente reforzada por el proceso inflamatorio regulado por IgE como se ha observado en las respuestas inflamatorias agudas iniciadas por reacciones de hipersensibilidad inmediata, la participación de la IgE en la respuesta efectora de células granulocíticas es muy importante en los mecanismos de defensa del huésped en contra de parásitos helmintos invasores (Murray y cols. 1968; Brandtzaeg, 1985). Estudios de Zhang y Castro, (1990) refuerzan el hecho de que los mecanismos de hipersensibilidad tipo I están implicados en la expulsión de la LM de *T. spiralis* de ratas inmunes y que moléculas liberadas por CC son las responsables de los cambios fisiológicos durante la anafilaxis local. Por otro lado, los estudios de Santamarina y cols. (1988) demostraron que antígenos provenientes de las fases enterales de pre-adulto y adulto, así como de la LM de *T. spiralis* inducen la producción de IgE generando un fenómeno típico de hipersensibilidad inmediata.

El papel que juegan las CC en el proceso de expulsión de parásitos intestinales ha sido bien documentado. En relación a esto, Lee y Wakelin (1982) observaron que cambios en el número de CC en ratones NIH (respondedores rápidos) y en ratones CBA (respuesta lenta), durante la expulsión del parásito adulto de *T. spiralis* se asocian a una velocidad diferente de ER. Así también, la expulsión de parásitos en ratones deficientes en CC (W/W^v) y S1/S1^d es prolongada, la fecundidad del parásito aumenta y se recuperan más LM de estos ratones con respecto a los animales normales (Alizadeh y cols. 1984). Lo mismo ocurre en ratones tratados con antagonistas de serotonina, presentan una falla en la expulsión de los parásitos adultos de *T. spiralis* (Uber y cols. 1980; Parmentier y cols., 1987). Además, en ratones W/W^v el trasplante de médula ósea o células de bazo de ratones normales restablece la población de CC, acelerando la expulsión de los organismos adultos (Oku y cols. 1984), quizá debido a la producción de factores de diferenciación y maduración de CC que favorecen la mastocitosis durante la infección. Debido a que las proteasas son un componente muy importante en el contenido total de proteína de las CC, la activación de estas células en la mucosa intestinal (CCMI) de ratas infectadas, ha sido evaluada midiendo la liberación de proteasas tipo serina asociadas a los gránulos (las proteasas de CC de rata tipo II ó RMCPII), ya sea en líquido intestinal o en suero (Woodbury y cols. 1978; Jarrett y Miller 1982; Miller y cols. 1983). Desde el punto de vista funcional, Tuohy y cols. (1990) encontraron que había una correlación entre la expulsión de *T. spiralis*, la

mastocitosis y la liberación de la proteasa producida por las CC de mucosa intestinal de murino (IMCP). La correlación más estrecha se observó en ratones NIH (respuesta rápida) infectados con *T. spiralis*, donde la liberación de grandes cantidades de la proteasa IMCP a los días 9 y 12, coincidieron con una mastocitosis evidente y con la expulsión de los parásitos a partir del día 9 después de la infección mientras que, en las cepas de ratones SWR y B10 (respuesta moderada y baja respectivamente) la liberación de IMCP fue menor y más sostenida observándose un retraso en la expulsión del parásito (Tabla 1). En todas las cepas, la reinfección (día 32) produjo un incremento en las concentraciones de la IMCP.

No obstante estos resultados, la participación directa de estas proteasas en la eliminación de la infección por *T. spiralis* no se ha determinado. Sin embargo, dada su participación en eventos de inflamación se sugiere que son las responsables de los cambios en la permeabilidad del epitelio intestinal, promoviendo el paso de moléculas al lumen del intestino (King y Miller 1984). Además, McKean y Pritchard (1989) han demostrado que las proteasas tipo II pueden degradar *in vitro* moléculas de colágeno tipo IV presentes en la cutícula de *Necator americanus*, lo cual podría alterar la integridad estructural de la cutícula del parásito.

Aunado a los factores de crecimiento de CC en el lumen intestinal, otros factores producidos y liberados por CC activadas se han encontrado en niveles elevados en animales infectados por *T. spiralis*. Así, por ejemplo se ha evaluado el papel de las prostaglandinas (PG) y la histamina liberadas por las CC durante la ER en infecciones secundarias de *T. spiralis* y de otros parásitos helmintos. En estos estudios se ha demostrado que cuando la PGE₂ se administra a ratas 3 días después de la infección con *T. spiralis* a una dosis de 500 µg/rata, se reduce el número de parásitos en el intestino delgado a los 7 días de la infección (Dutoit y cols. 1979) y que la histamina está implicada en el rechazo de *T. spiralis* en ratones (Campbell y cols. 1963). Sin embargo, existen evidencias que sugieren que las PG y la histamina no son importantes en el rechazo de *T. spiralis* en ratas, a pesar de estar presentes en la secreción de fluido intestinal inducida por el parásito (Bell y cols. 1982; Zhang y Castro 1990). Los resultados obtenidos hasta la fecha no han podido establecer de manera clara la participación de estos componentes de CC en el proceso de expulsión.

Con respecto a la participación de otros componentes producidos por las CC durante el proceso de expulsión, se ha determinado que existe un incremento de leucotrienos (LT), los cuales producen contracciones del músculo liso, un aumento en la permeabilidad vascular y estimulación de secreción de moco y participan también en el reclutamiento de células inflamatorias a nivel del lumen intestinal de ratas inmunes desafiadas con *T. spiralis* (Miller 1984).

Tabla 1. Niveles de proteasa de mucosa intestinal (IMCP) determinados en lavados intestinales de cepas de ratones con diferente capacidad de respuesta contra la infección por *Trichinella spiralis*.

μg de IMCP/mg de proteína			
Días p. i.*	NIH ^a	SWR ^b	BIO ^c
0	0.06	0.06	0.00
6	6.95	4.19	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 de desafiaron en el día 32 *posterior a la infección. a) NIH, respuesta rápida; b) SWR, respuesta moderada; c) BIO, respuesta baja

Tomado de Tuohy y cols. (1990)

Existen evidencias de que las citocinas también participan en la ER del parásito adulto de *T. spiralis*. Así por ejemplo, experimentos de Zhu y Bell (1990) analizaron la participación de la IL-1, IL-2 e IL-3 en la expulsión de este parásito en ratones con diferente fondo genético. Como era predecible, observaron que solamente las alteraciones en los niveles de la producción de IL-3 parecen influenciar la mastocitosis, particularmente si se relacionan a variaciones genéticas que modulan la respuesta inmune del huésped.

Más recientemente, Ramaswamy y cols. (1996) analizaron el perfil de citocinas secretadas en el microambiente intestinal de ratas, durante el curso de la respuesta inmune contra *T. spiralis* (Fig. 2). En este estudio se detectaron cambios en la cinética de aparición de las citocinas IL-4, IL-5, IFN γ y TNF α , así como cambios de la actividad diferenciadora de CC después de la infección con *T. spiralis*. Ellos encontraron que las citocinas del tipo Th₂ (IL-4 e IL-5), así como las del tipo Th₁ (IFN γ), se detectan simultáneamente en la linfa intestinal durante los primeros 8 días después de la infección y que la expulsión de los parásitos (en los días 11 y 12), se asocia con un nivel incrementado de IL-4 e IL-5 en la linfa intestinal. A pesar de la predominancia de la respuesta Th₂, los niveles de IFN γ muestran varios ciclos de aumento y disminución en su producción durante las primeras 180 h de la infección, sugiriendo que esta citocina se asocia con la penetración del parásito al epitelio intestinal. En este mismo estudio se demostró que la transferencia adoptiva de células CD4⁺CD45RC⁻ (inductoras de Th₂), desarrolladas en el intestino de ratas infectadas con *T. spiralis* despertaron una respuesta Th₂ más rápida en una infección secundaria que en una infección primaria. En contraste, la transferencia adoptiva de células

CD4⁺CD45RC⁺ (inductores/citotóxicos) muestran una respuesta más rápida Th₁ (IFN γ) y mastocitosis en una infección primaria.

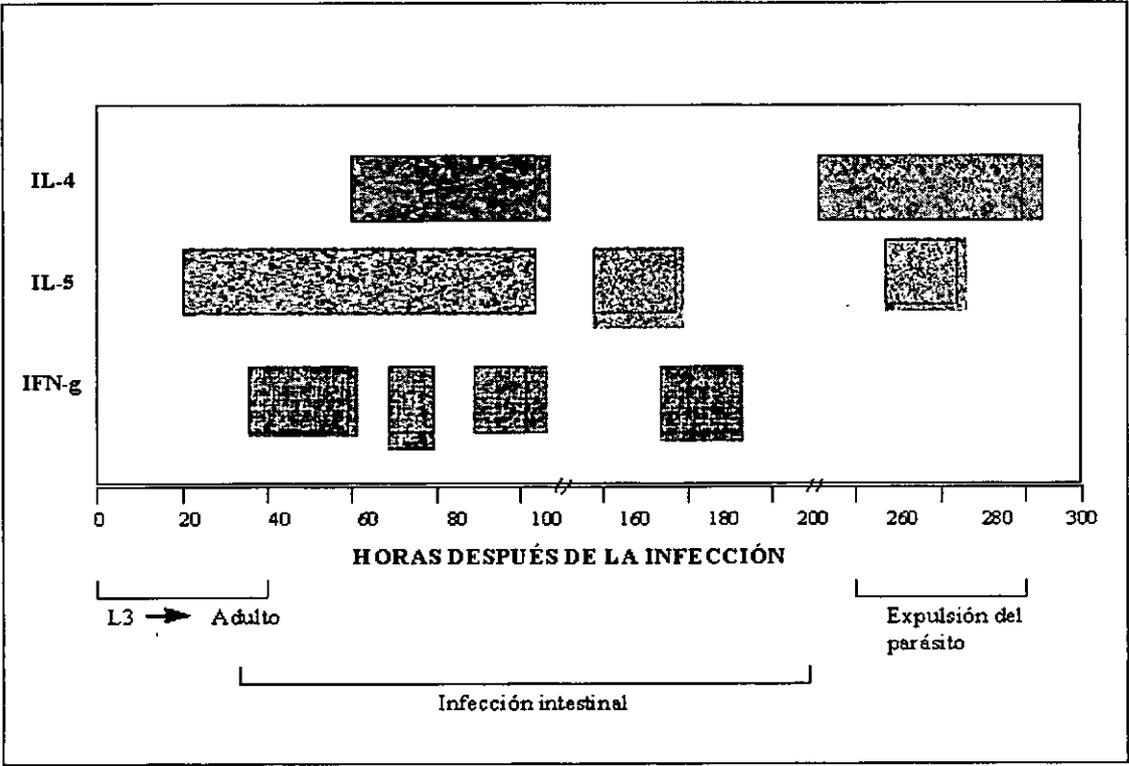


Fig. 2. Representación esquemática del perfil de citocinas secretadas (IL-4, IL-5, IFN γ) en el intestino de ratas de 0 a 300 h después de la infección con *Trichinella spiralis*.

Tomado de Ramaswamy y cols. (1996)

Por otra parte, Faulkner y cols. (1997) encontraron que la actividad de la IL-9 durante la infección con *T. spiralis* en ratones transgénicos para IL-9, está relacionada con una respuesta de IgG₁ específica y con una pronunciada mastocitosis intestinal, la cual se ha sugerido es responsable de la ER del parásito por el huésped. De manera interesante, estos autores observaron que la IL-9 tiene la capacidad para promover la producción de anticuerpos del isotipo IgE los cuales son característicos de una respuesta tipo Th₂ y además podrían regular a su vez la respuesta de hipersensibilidad tipo I antes mencionada.

Si bien la fuente de citocinas reguladoras observadas en los experimentos antes mencionados pueden ser producidas por células T, es importante notar que las CC producen también una gran variedad de citocinas entre las cuales IL-3, IL-4 e IL-10 participan activamente en la regulación de la respuesta inmune del tipo Th₂. Esto es importante porque en la

generalidad de las infecciones por helmintos, la respuesta inmune del huésped tiene características propias de la activación de la población de linfocitos Th₂. Es así que la idea sugerida por Romagnani (1992) resulta atractiva en este contexto, dado que las CC pueden ser las orquestadoras de la respuesta inmune mediante la producción de IL-4. Esta producción pudiera ocurrir directamente por estimulación de las CC por antígenos de parásitos intestinales de tal modo que dicha IL-4 podría regular la respuesta Th₂ observada en las infecciones por helmintos parásitos. Esto puede resultar un aspecto sumamente importante ya que de activarse las CC de manera directa por antígenos parasitarios sin la participación de anticuerpos IgE específicos, la regulación tipo Th₂ observada sería generada por las CC y ocurriría a través de un mecanismo de respuesta inmune innata (Fig. 3).

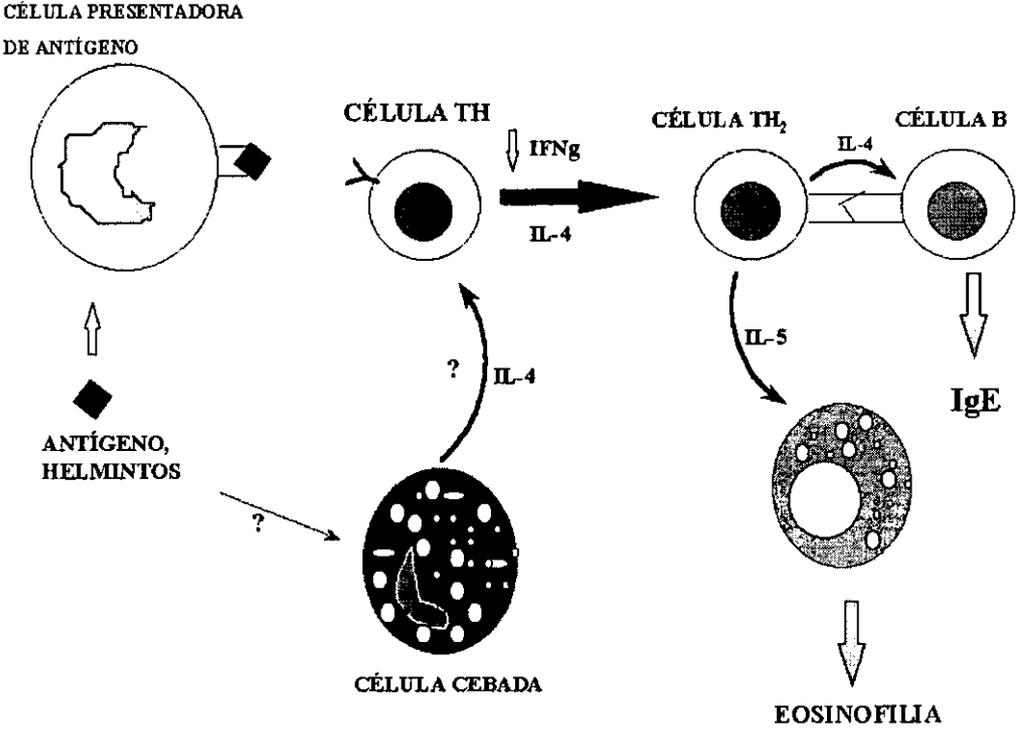


Fig. 3. Participación de las células cebadas en la regulación de una respuesta inmune tipo Th₂, contra parásitos helmintos.

Tomado de Romagnani (1992).

Hasta ahora todos los estudios sobre expulsión del parásito realizados a la fecha, han sido realizados con animales infectados con *T. spiralis* o con CC sensibilizadas provenientes de estos animales, lo cual implica la participación de IgE. La idea de una activación directa de CC por antígenos parasitarios debe considerarse, dada la abundancia y localización de estas CC en el intestino, así como el contacto directo con el parásito. Es así que resulta interesante investigar en primera instancia si la activación de las CC puede ocurrir por antígenos de *T. spiralis* mediante un mecanismo independiente de IgE y en segunda instancia, realizar la caracterización de los antígenos parasitarios involucrados en este tipo de estimulación de CC que conlleve a la subsecuente liberación de mediadores inflamatorios por CC.

La colaboración entre linfocitos T y otras células durante el proceso de expulsión se pone de manifiesto ya que en infecciones por *T. spiralis* se puede desarrollar hiperplasia de células caliciformes (Askenase 1977; Befus y Bienenstock 1982; Miller 1984; Lloyd y Soulsby 1987). Ishikawa y cols. (1997) han utilizado el modelo de ratón (cepa NIH) infectado con *T. spiralis* para evidenciar el papel de las células T intestinales en la regulación de la hiperplasia de células caliciformes. En este modelo, el incremento en el número de células caliciformes intestinales está asociado con un incremento en la síntesis de glicoproteínas del tipo de mucina por el día 8 p.i. el cual representa el momento en el cual la expulsión se inicia. Nuevamente en este modelo se observó que ganglios linfáticos mesentéricos estimulados con antígenos de *T. spiralis* tienen una respuesta de citocinas del tipo Th₂. Para establecer la naturaleza de la relación entre la respuesta Th₂ en las células de linfonódulos mesentéricos y la hiperplasia de células caliciformes en el intestino delgado en el día 8 p.i., se realizaron estudios de transferencia de células de linfonódulos mesentéricos de ratones infectados con el parásito 8 días p.i. a ratones singénicos y se observó nuevamente una hiperplasia de células caliciformes. Al realizarse ensayos de transferencia de células a los 2 días p.i. se observó que no había efecto significativo en el número de células caliciformes, lo que sugiere que la hiperplasia de este tipo de células en el intestino delgado es regulado por las células Th₂. Posteriormente, al utilizarse anticuerpos para IL-5 no se observaron cambios significativos en el número de células caliciformes en los ratones infectados con el parásito, sugiriendo que otras moléculas derivadas de las células Th₂ o bien de otro tipo celular puede ser las responsables de la hiperplasia de células caliciformes (Mahida y cols. 1992; Ciacci y cols. 1993).

Otro tipo celular que infiltra la mucosa intestinal de animales parasitados son los eosinófilos. Aunque eosinófilos y CC se han implicado en reacciones inflamatorias protectoras dirigidas contra parásitos helmintos intestinales, la cinética de infiltración de cada tipo celular varía en diferentes sistemas huésped-parásito (Miller 1984).

Es por ello que el incremento en el número de eosinófilos es una forma de evaluar la infección por helmintos, especialmente durante los estadios invasivos del parásito en el huésped inmune (Miller 1984; Befus y Bienenstock 1982; Kay 1985; Spry 1985). Al igual que las CC, los eosinófilos son capaces de liberar potentes mediadores de inflamación,

incluyendo a los leucotrienos C₄ y B₄ (LTC₄ y LTB₄) (Weller y cols. 1984; Shaw y cols. 1984) y proteínas básicas asociadas a gránulos. Los LTC₄ pueden ser generados por los eosinófilos por mecanismos dependientes de IgG, lo que les permiten adherirse y matar larvas de helmintos *in vitro* e *in vivo* cuando son opsonizados apropiadamente (McLaren 1980; Moqbel 1980; Shaw y cols. 1985). A este respecto, existe evidencia de la adhesión de los eosinófilos a la esquistosómula de *Schistosoma mansoni* a través de anticuerpos específicos (IgG), liberando cantidades elevadas de LTC₄ que serían equivalentes al 25 % total de IL-4 generado por el ionóforo de calcio en ensayos *in vitro*.

Con respecto a *T. spiralis*, existen evidencias indirectas que demuestran que hay activación de eosinófilos en varios sitios de la mucosa, ya que hay aumento de fosfolipasa B en el intestino de ratones y ratas infectados con el parásito (Larsh y cols. 1974; Goven 1979; 1983). También se ha sugerido que existe una participación activa de eosinófilos en el proceso de expulsión de los organismos adultos de *T. spiralis* (Wang y cols. 1990). No obstante, existen datos que indican que los eosinófilos son un componente minoritario en los infiltrados celulares inducidos durante una infección con *T. spiralis* (Lamas y cols. 1992). Además, el bloqueo del desarrollo de eosinófilos *in vivo* al administrar anticuerpos contra IL-5 no afecta el proceso de expulsión de *T. spiralis* (Wakelin 1993). Por lo que, a falta de mayor cantidad de datos que apoyen su participación, se considera que estas células en general tienen un papel poco significativo en la ER de *T. spiralis*.

ORIGEN Y DISTRIBUCION DE LAS CELULAS CEBADAS

Las CC están ampliamente distribuidas en el organismo y se les ha implicado en una gran variedad de respuestas biológicas, incluyendo hipersensibilidad retardada, angiogénesis, fibrosis, citotoxicidad en contra de tumores y en la respuesta inmune contra parásitos (Befus y cols. 1986). En el estudio de la participación de CC en las respuestas antes mencionadas, hay que reconocer que existe heterogeneidad poblacional en CC. Así, existe una subpoblación asociada al tejido conectivo (CCTC) y otra subpoblación directamente ligada a mucosas (CCMI). Si bien estas subpoblaciones difieren en sus propiedades morfológicas e histoquímicas, en cuanto al contenido de mediadores y en cuanto a su activación con diferentes moléculas, también es muy importante observar que estas CC responden de manera distinta a factores de crecimiento y de diferenciación liberados por células del sistema inmune. En la figura 4 se muestra la ontogenia de las CC, las cuales se originan de la médula ósea a partir de células precursoras que presentan el marcador de superficie CD45. Su desarrollo implica la participación de ciertos factores de crecimiento, particularmente del factor estimulador de la diferenciación de CC (SCF), IL-3, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-11, pero su desarrollo puede ser inhibido o regulado por IFN γ y por el factor de crecimiento transformante β (TGF β), el factor de crecimiento de granulocitos macrófagos (FC-GM) y por el factor de crecimiento nervioso (NGF). Así también, las prostaglandinas (PGE₂) y agregados de IgE participan en la

regulación del número y fenotipo de las CC, especialmente durante procesos de enfermedad o en eventos de respuesta inmune (Befus y cols. 1987; Nakahata y cols. 1995; Rottem y Metcalfe, 1995).

Aunque las CC son un componente minoritario de la médula ósea normal y del tejido linfoide, se encuentran en gran abundancia en el epitelio gastrointestinal, respiratorio y en el tracto urinario. Algunos animales tienen CC en forma abundante en las cápsulas fibrosas de los órganos internos o en transudados fisiológicos tales como los fluidos peritoneales. Sin embargo, la densidad de las CC varía considerablemente en diferentes especies, esto se debe básicamente a que las CC maduras no circulan en la sangre como ocurre con basófilos. Se ha propuesto que los precursores de las CC están en médula ósea, migran a sangre periférica e invaden los tejidos de la mucosa y el tejido conectivo donde sufren diferenciación a CC morfológicamente maduras.

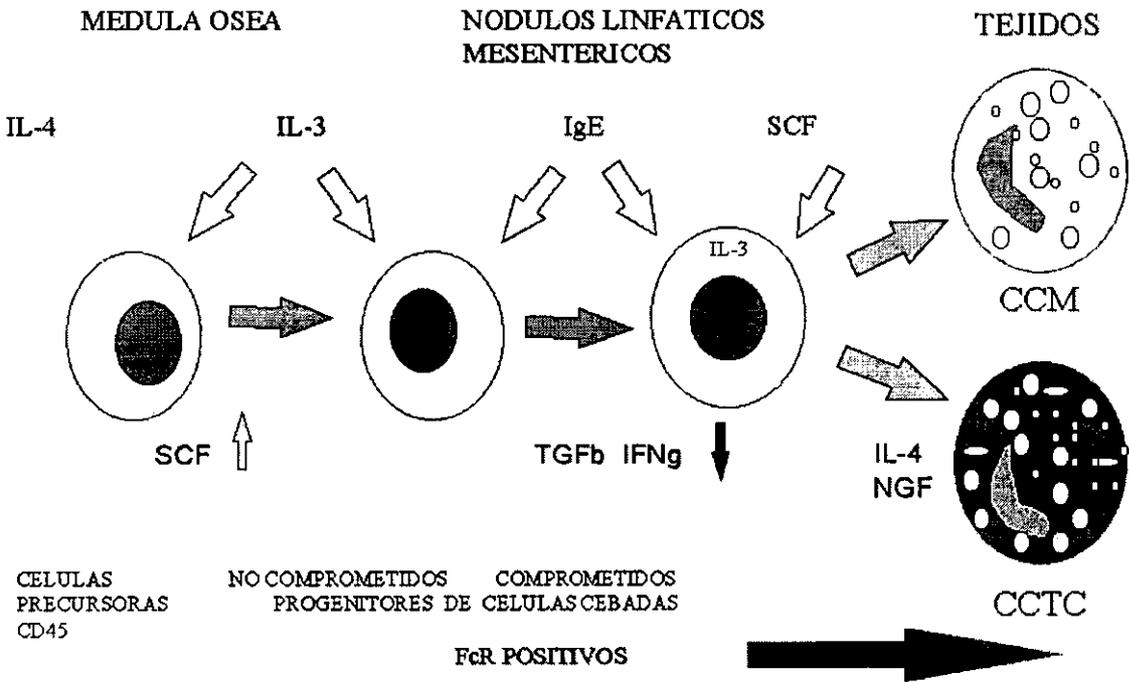


Fig. 4. Ontogenia de células cebadas . IgE inmunoglobulina E, IL- interleucinas, SCF factor estimulador de la diferenciación de células cebadas, TGFβ factor de crecimiento transformante beta, IFNγ interferon gama, NGF factor de crecimiento nervioso, CD grupo de diferenciación; FcR receptor para la fracción cristalizante de inmunoglobulina; ↑ regulación positiva, ↓ regulación negativa, → ruta de diferenciación, CCM células cebadas de mucosa, CCTC células cebadas de tejido conectivo.

Tomado de Befus y cols. (1987)

BIOLOGIA DE LAS CELULAS CEBADAS

Las CC son caracterizadas por la presencia de gránulos secretores que se tiñen metacromáticamente, y por su capacidad de expresar en su superficie al receptor de alta afinidad para IgE (FcεRI). Estas células se localizan en los sitios de tejidos adyacentes a la microvasculatura y en la superficie de la mucosa y del epitelio. La presencia del FcεRI en las CC y basófilos capacita a estos dos tipos celulares para activarse a través de la unión de IgE a su receptor, ocurriendo el subsecuente entrecruzamiento durante el encuentro con el antígeno específico. Este mecanismo ubica a las CC como un componente celular efector importante en la respuesta inmune. Se tiene conocimiento de que las CC liberan una gama de moléculas proinflamatorias, inmunomoduladoras y citocinas mitogénicas, mediadores derivados de lípidos y proteasas neutras. Además se sabe que las CC opsonizan a las moléculas antigénicas para ser el blanco de ataque de otros tipos celulares y funcionan además como células presentadoras de antígeno por lo que se sugiere que las CC tienen un papel fundamental en los procesos inmunes e inflamatorios (Mécheri y David, 1997). Como se mencionó anteriormente también son capaces de producir citocinas inmunomoduladoras tales como la IL-4, que induce la diferenciación a células Th₂, siendo este un ejemplo de como las CC pueden funcionar como células reguladoras de la respuesta inmune.

En 1966 Enerback diferenció en ratas a las CCTC de la piel y de la cavidad peritoneal de las CC de mucosa gastrointestinal (CCMI) por sus propiedades de tinción y por su sensibilidad a agentes de fijación. Asimismo, se ha estimado que la vida media de una CCTC es de aproximadamente 180 días, mientras que la vida media de las CCMI es de cerca de 40 días (Enerback 1986). En estudios más recientes se ha calculado que las CC pueden sobrevivir por periodos de tiempo más prolongados. Otra diferencia importante entre las 2 subpoblaciones de CC se da en términos de la cantidad y composición de los constituyentes preformados de los gránulos secretores (Tabla 2). y en base a su respuesta a secretagogos e inhibidores. Además, las CCTC metabolizan primordialmente ácido araquidónico vía cicloxigenasa para posteriormente generar prostaglandina D₂ (PGD₂), mientras que las CCMI sintetizan predominantemente LTC₄, vía 5-lipoxigenasa.

Tabla 2. Heterogeneidad de Células Cebadas de rata

Mediadores de respuesta inflamatoria	Células Cebadas de Tejido Conectivo (CCTC)	Células Cebadas de Mucosa Intestinal (CCMI)
Histamina	15 - 20 pg/célula	1 - 2 pg/célula
Proteoglicanos	Heparina	Condroitín sulfato
Proteasas	Quimasa 1 (RMCP I 24-30 pg/cél), Proteasa 5 (RMCP 5 y Carboxipeptidasa A (20-25 pg/cél ambas); Triptasa; (0.5 pg/cél)	Quimasa 2 (RMCP II 26 pg/cél)
Eicosanoides	Prostaglandina D ₂	Prostaglandina D ₂ , Leucotrienos B ₄ y C ₄
Citocinas	IL-1,3,4,5,6,8,10, LIF, IFN _γ	?
TNF _α	0.89 pg/célula	0.17 pg/célula

Tomado de Bissonnette y cols. (1996)

Galli y cols. (1982) sugirieron que las diferencias fenotípicas en las poblaciones de CC *in vivo* pueden estar reguladas por factores microambientales que afectan la morfología, así como el contenido de mediadores y su maduración. Además, los procesos inflamatorios e inmunológicos pueden inducir cambios transitorios en microambientes anatómicos que afectan a la población de CC residentes en tales áreas. Por ejemplo, el sitio de una respuesta inflamatoria dependiente de células T puede tener niveles de citocinas que influyen la proliferación o maduración de las CC, las cuales son expresadas de manera muy diferente en la misma localización anatómica bajo circunstancias normales. Por otro lado, cuando el microambiente es rico en IgE y antígenos específicos, se puede alterar el fenotipo de las CC para inducir la degranulación más activa de las mismas. Finalmente, es importante mencionar que a través de la producción de citocinas tales como IL-3 e IL-4, las CC pueden participar en la regulación de su propio número y fenotipo, especialmente durante procesos de enfermedad o en eventos de la respuesta inmune. A este respecto, se ha mencionado previamente que la IL-3 es una señal crítica para la proliferación de la población de CCTC observada en la mucosa intestinal de ratas y ratones durante infecciones parasitarias. Por otro lado, evidencias *in vitro* sugieren que la proliferación de CCTC refleja la influencia combinada de IL-3 e IL-4. Asimismo, la IL-4 también aumenta la producción de IgG₁ y puede aumentar la proliferación de CCMI dependientes de IL-3 generadas *in vitro* y favorecer el crecimiento y maduración *in vitro* de CC con propiedades de CCTC. Así, resulta importante resaltar la participación del ligando de c-kit (KL) y del SCF (factor estimulador de células cebadas) en este proceso, ya que estas moléculas son expresadas tanto por los progenitores de las CC, como por las CC maduras e inmaduras. Esta última molécula promueve la proliferación y maduración de los progenitores de CC, teniendo efectos en el fenotipo y la función de CC, potenciando la secreción de mediadores en respuesta a la señal del FcεRI (Galli y cols. 1994; Gupta y cols. 1996). Aunque Galli y cols. (1994) demostraron el papel crítico del SCF en el desarrollo de CC en ratones deficientes *W/W^v* y en los mutantes *S1/S1^d*, e *in vitro* con líneas celulares, recientemente se ha establecido que el SCF por sí solo no estimula el crecimiento de los progenitores de CC, siendo esencial la presencia de cofactores tales como IL-3, IL-4 e IL-10 en el crecimiento y maduración de los progenitores de CC (Rennick y cols. 1985). Es importante además hacer notar que los requerimientos del SCF por las CCTC y las CCMI para su maduración son diferentes (Arizono y cols. 1993). En el aspecto de infección por helmintos parásitos, es importante notar que el SCF contribuye a la mastocitosis a nivel de mucosa. De esta forma que, ratas tratadas con SCF presentan altos niveles de RMCPII en el yeyuno y en el suero y ratas tratadas con anticuerpos para SCF tienen una marcada disminución en el número de CC así como en los niveles de RMCPII (Newlands y cols. 1995), lo que sugiere que el SCF es requerido en el desarrollo de ambas subpoblaciones de CC, aunque existan diferencias en la dependencia que dichas subpoblaciones tienen hacia esta molécula.

Por otro lado, además de la morfología de los gránulos, las diferencias histoquímicas y la dependencia de moléculas moduladoras para su diferenciación, la expresión de proteasas específicas de gránulos secretores es el marcador más definitivo para la discriminación entre las CC. Así, dos quimasas llamadas RMCP I y RMCP II han sido caracterizadas en la rata. La RMCP I es expresada exclusivamente en CCTC mientras que la RMCP II es expresada sólo en CCMI. La RMCP I es insoluble y está asociada a gránulos y se libera bajo la activación de CC. Por otro lado, la RMCP II es soluble y puede ser detectada en la circulación siguiendo la activación de CCMI (Miller 1983; Miller y cols. 1992). Además, las CCTC de ratas producen tres isoformas de la proteasa 5 (MCP-5) y expresan triptasa y carboxipeptidasa A (CPA). La abundancia de esta triptasa es baja comparada con la triptasa en CC de ratón o de humano (Lagunoff y cols. 1991).

Por otro lado, en CC de ratón se han identificado siete proteasas de tipo serina, cinco con especificidad del tipo quimasa (mMCP-1 a 5) y dos con especificidad tipo triptasa (mMCP-6,7) (Reynolds y cols. 1990; Gurish y cols. 1991; Huang y cols. 1991). Todas estas proteasas están localizadas en el cromosoma 14 de ratón asociadas a granzimas de células T (Gurish y cols. 1993). Además, se ha identificado una carboxipeptidasa A (CPA), la cual es una metaloproteasa de CC (Reynolds y cols. 1989; Natsuaki y cols. 1992). Las mMCP-1 y mMCP2 son buenos marcadores de subpoblaciones de CC porque son expresadas primordialmente por CCMI, mientras que las mMCP-4,5,6 y CPA son expresadas primordialmente por CCTC.

Algunas características son compartidas por las proteasas de diferentes especies. Así, la RMCP I tiene homología con la proteasa 4 de ratón (mMCP4) mientras que la RMCP II es homóloga a la proteasa 1 de ratón (mMCP1). Las especificidades por un sustrato y las funciones de esas proteasas no se conocen completamente, sin embargo, existe evidencia que sugiere que están implicadas en activación de fibroblastos (Rouss y cols. 1991), contracción de músculo liso (Sekizawa y cols. 1989), secreción de glándulas submucosas (Sommerhoff y cols. 1989), degradación de neuropéptidos (Tam y cols. 1990; Bunnett y cols. 1992) y de anafilatoxinas (Kajita y cols. 1991), en el procesamiento de proteínas (Mizutani y cols. 1991; Wypij y cols. 1992), en la degradación de matriz (Lohi y cols. 1992; Banovac y cols. 1993) y en el ataque a osteoblastos (Banovac y cols. 1993).

Para identificar durante una infección por helmintos la expresión de los genes que codifican para diferentes proteasas neutras y que distinguen a las CCTC de las CCMI, se han usado paneles de sondas específicas de esas proteasas. Así, Haig y cols. (1986) señalaron que las CC de peritoneo de rata cultivadas *in vitro* en medio condicionado por células T activadas por antígeno, expresan varias propiedades mostradas por las CCMI de rata, incluyendo síntesis de la proteasa quimiotriptica (RMCP II).

Por otro lado, Arizono y cols. (1987) observaron *in vivo* un cambio en el fenotipo de CCMI al fenotipo de CCTC en las poblaciones de CC pulmonares durante infecciones con *N. brasiliensis*. Muchos otros estudios se han enfocado al cambio fenotípico unidireccional de CCMI a CCTC o de CCTC a CCMI. Así por ejemplo, Kanakura y cols. (1988) al usar

poblaciones clonales de CC indicaron que algunos de estos cambios son reversibles, ya que CC clonadas derivadas de CCTC pueden expresar múltiples alteraciones fenotípicas bidireccionales. Kitamura (1989) ha establecido que el precursor para el fenotipo de CCTC o CCMI puede ser el mismo dependiendo del microambiente. A este proceso se le ha llamado **transdiferenciación**.

Asimismo, con respecto a la expresión de las proteasas específicas de CC, Friend y cols. (1996) observaron en ratones de la cepa BALB/c infectados con *T. spiralis*, que en la primera semana de infección hay un aumento en el número de CC en el intestino, el cual se incrementa hasta 25 veces más hacia la segunda semana. Esta mastocitosis entonces disminuye rápidamente a lo largo de la infección con el parásito, sugiriendo que las CC migran durante la fase de inflamación. En este trabajo se observó además que las CC del yeyuno expresan secuencialmente la mMCP-2, después mMCP-5 y finalmente la mMCP-1. Notoriamente, las CC aparecen primero en la submucosa, luego en la lamina propia y finalmente en el epitelio. Posteriormente las CC dejan de expresar mMCP-1, expresan mMCP5 y finalmente mMCP-2 en la punta del villi, en la base del villi y en la submucosa respectivamente. Es precisamente debido a que las CC pueden alterar su fenotipo de proteasas, que no se puede sugerir una nomenclatura fija, ya que las poblaciones de CC varían en su fenotipo durante el proceso inflamatorio, aún dentro de un tejido particular.

RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR IgE

La respuesta inmune mediada por IgE ocurre cuando un antígeno se une a los anticuerpos que ocupan los numerosos receptores Fc ϵ RI dispuestos sobre la superficie de las CC. En pocos minutos, esta unión causa que las CC degranulen y liberen ciertos mediadores preformados y subsecuentemente, la célula degranulada comienza a sintetizar y liberar mediadores adicionales sintetizados *de novo* (Fig. 5). El resultado es una respuesta de 2 fases; un efecto inicial inmediato en vasos sanguíneos, músculo liso y secreción glandular conocido como hipersensibilidad inmediata, seguido a las pocas horas por infiltración celular en el sitio de inflamación.

El entrecruzamiento del Fc ϵ RI transmite una señal que activa a la CC, resultando en la activación de proteínas tirosina cinasas y un aumento en los niveles del flujo de calcio. Esos eventos de transducción se completan 2 a 3 minutos después de la unión con el antígeno. Inmediatamente después, los gránulos citoplásmicos se fusionan unos con otros y se dirigen a la superficie de la membrana, donde descargan su contenido al exterior. Los basófilos son el único otro tipo celular que expresa los receptores Fc ϵ RI, pero no se sabe si estos contribuyen significativamente a reacciones de hipersensibilidad inmediata.

La unión de las IgE a sus receptores no es covalente, de tal modo que los anticuerpos unidos están en equilibrio constante con la poza de IgE circulante. Como resultado, cada CC puede unir diferentes antígenos o diferentes moléculas

estimuladoras de CC. Sin embargo, es importante mencionar que las CC pueden activarse por diferentes moléculas y consecuentemente liberar diferentes mediadores preformados o sintetizados *de novo* (Fig. 5). El tipo y la cantidad del mediador liberado dependerá del tipo de CC y de la intensidad del estímulo.

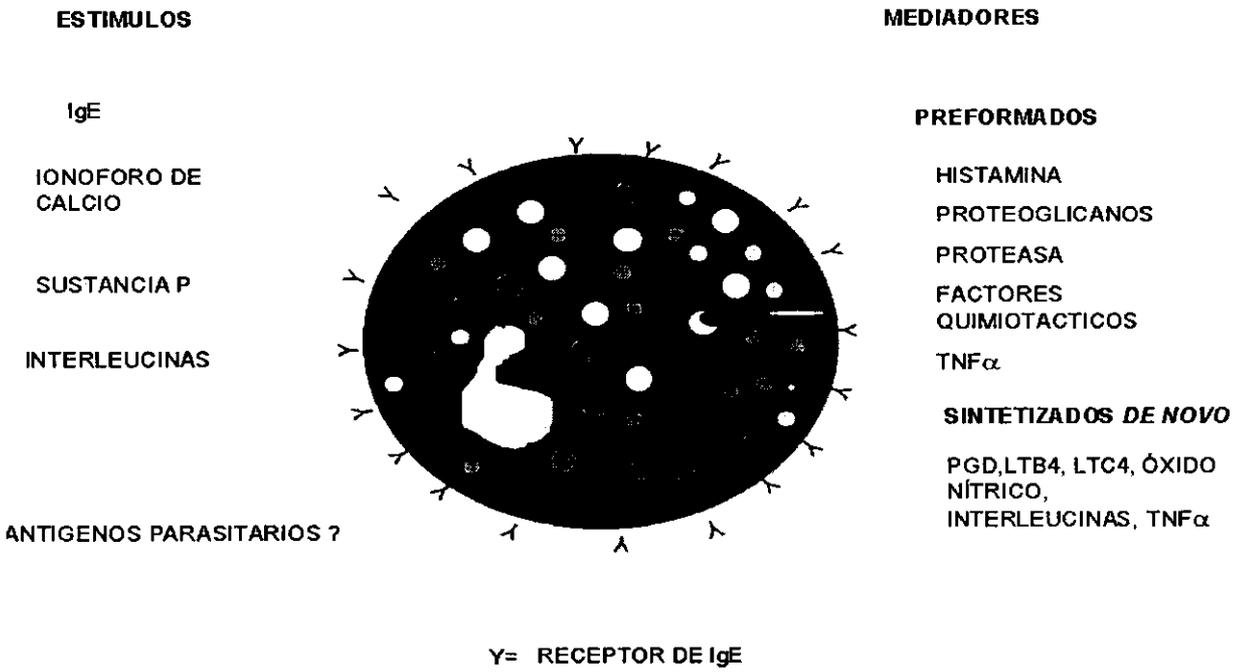


Fig. 5. Diferentes estímulos que activan a células cebadas y mediadores preformados y sintetizados *de novo* que son liberados por CC bajo activación

PARTICIPACION DE LAS CC EN LA RESPUESTA INMUNE CONTRA DIFERENTES AGENTES INFECCIOSOS

La localización de las CC y su gran potencial en la producción de diferentes mediadores de procesos inflamatorios las hacen importantes en la respuesta inmune contra parásitos.

Aunado a la producción de mediadores de inflamación como histamina y factores quimiotácticos, las CC sintetizan diferentes citocinas de gran importancia en la regulación de la respuesta inmune. La primera evidencia directa de que las poblaciones de CC pueden producir citocinas bien caracterizadas fue la demostración de que CC de origen tumoral al ser transformadas por el virus de leucemia murina producen constitutivamente el ARNm y la proteína del Factor estimulador del crecimiento granulocito-macrófago (FC-GM) (Chung y cols. 1986). Posteriormente Brown y cols. (1987) estudiaron un panel

de ambos tipos de CC transformadas y no transformadas con el virus Abelson de leucemia murina y establecieron la expresión variable de IL-3, 4 y FC-GM. Mientras que, Humphries y cols. (1988) observaron la presencia de IL-6 en líneas tumorigénicas.

Por otro lado, se sabe que la IL-10 es un regulador multifactorial de la respuesta inmune e inflamatoria con un amplio rango de actividades biológicas, incluyendo: la inhibición de la función de los monocitos/macrófagos, supresión de la síntesis de citocinas por las células T y las células asesinas naturales (NK) y modulación de las funciones de las células B (Mosmann 1994). Para las CC, la IL-10 es un potente factor de crecimiento, particularmente cuando se hallan presentes SCF, IL-3 e IL-4 (Rennick y cols. 1985; Thompson-Snipes y cols. 1991). Durante el desarrollo de las CC, la IL-10 induce la expresión de la RMCPII *in vivo* e *in vitro* (Ghildyal y cols. 1993). Recientemente, el papel de la IL-10 ha sido analizado en células cebadas de peritoneo de rata (CCP) y en células cebadas de médula ósea (BMMC) encontrándose que inhibe al TNF α , IL-6 y al FC-GM sin afectar la liberación de histamina, β -hexosaminidasa y LTC $_4$. Esto sugiere que es capaz de regular diferencialmente la secreción de varios mediadores de CC (Marshall y cols. 1996; Arock y cols. 1996). Asimismo, el tratamiento de CCP con anticuerpos para IL-10 aumenta la producción de TNF α inducido por antígeno de *N. brasiliensis* (Lin y Befus, 1997), de tal forma que la IL-10 ejerce diferentes efectos reguladores en la función secretora de CC, pero además la IL-10 producida por CC tiene potencial para regular la función de las CC en una manera autocrina, efecto que puede ser relevante en la modulación de las CC activadas.

Por otro lado, el TNF α fue la primera citocina asociada con poblaciones de CC normales (Brown y cols. 1987). Así existen varios estudios que vinculan la bioactividad con la expresión de TNF α como un evento de actividad citotóxica de CC sobre células blanco. En general, la citotoxicidad expresada por las CC sobre células blanco es similar a la expresada por células asesinas naturales (NK) presentes en las preparaciones de células de bazo. Además, las células NK de ratón dependientes de IL-3 generadas *in vitro* mostraron similitud con las CC de ratón dependientes de IL-3 aisladas previamente bajo condiciones similares de cultivo. Así mismo, se ha demostrado la actividad citotóxica asociada con los gránulos de CC, la cual puede ser parcialmente inhibida por anticuerpos contra TNF α . Young y cols. (1987) mostraron que las CC de peritoneo de ratón cultivadas *in vitro* con o sin IL-3 contenían una citocina asociada a los gránulos citoplásmicos que tenía actividad inmunológica y citotóxica muy similar a la de TNF α /caquexina. Sin embargo, esta bioactividad se presentó solo cuando las CC se estimulaban con acetato de formol miristato (PMA) y concanavalina A (Con A) ó con lipopolisacárido. En relación a esto, Gordon y Galli (1990) establecieron que las CC de peritoneo de ratón producen aproximadamente el doble de la bioactividad de TNF α de manera constitutiva que la cantidad producida por los macrófagos peritoneales de ratón estimulados con lipopolisacárido. Estos datos indican que la síntesis de algunas citocinas asociadas a las CC difieren significativamente de las citocinas de otros tipos celulares. Así, los macrófagos y las células T y B contienen muy poco o

nada de $\text{TNF}\alpha$ preformado mientras que las CC de peritoneo contienen $\text{TNF}\alpha$ preformado almacenado en los gránulos, el cual está listo para liberarse inmediatamente después del estímulo apropiado (Plaut y cols., 1989). En el caso de la activación de CC de ratón dependiente de IgE, el $\text{TNF}\alpha$ almacenado es liberado y la síntesis de RNAm así como la síntesis de la proteína se ven incrementadas considerablemente (Gordon y Galli, 1990). Estos resultados sugieren que la bioactividad del $\text{TNF}\alpha$ preformado así como del que es sintetizado *de novo* varía de acuerdo al tiempo y a las condiciones de estimulación. Por otro lado, Bissonnette y cols. (1995) observaron que el $\text{IFN}\gamma$ y el $\text{IFN}\alpha/\beta$ inhibían la liberación de $\text{TNF}\alpha$ de las CC de peritoneo de ratas (CCP) siendo este efecto dependiente de la concentración y del tiempo. Enciso y cols. (1996) propusieron que la regulación de la liberación del $\text{TNF}\alpha$ de las CCP puede ocurrir por acción de $\text{IFN}\gamma$ e $\text{IFN}\alpha/\beta$ como un efecto directo en la transcripción del $\text{TNF}\alpha$. Así, el tratamiento con $\text{IFN}\gamma$ e $\text{IFN}\alpha/\beta$ de las CC de rata en cultivo (RCMC) y de la línea HRMC (células con fenotipo de células cebadas de mucosa intestinal), así como de las CCP recién purificadas *in vitro* disminuyen los niveles del RNAm para $\text{TNF}\alpha$.

La capacidad de las CC para liberar citocinas tales como IL-1, 3, 6, 8, 10, 12, 13, FC-GM, $\text{TNF}\alpha$, y quimiocinas tales como MCP-1, MIP 1 α y RANTES indican que las CC tienen un enorme potencial para dirigir la respuesta inmune y regular la acción de células T y células B (Mécheri y David, 1997). A este respecto, la IL-4 producida por CC en la fase temprana de la respuesta inmune puede jugar un papel decisivo en la regulación de la respuesta tipo Th_2 observada en infecciones por helmintos intestinales. Debido a las características antes mencionadas se ha sugerido que las CC pueden participar en la respuesta contra bacterias y parásitos tanto en la respuesta inmune innata como en la respuesta inmune adquirida (Mécheri y David, 1997). Actualmente se sabe que la membrana de las CC tiene una gran cantidad de receptores para diferentes moléculas incluyendo los que promueven el reconocimiento y unión de bacterias. Este reconocimiento, es independiente de IgE y está mediado por la interacción de una molécula receptora que contiene manosa presente en la superficie de las CC con las fimbrias del tipo I de las enterobacterias (Malaviya y cols. 1994). Malaviya y cols. (1996 a,b) han señalado además que las CC pueden ser activadas directamente por patógenos y que éstas procesan y expresan los antígenos bacterianos en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad tipo I. Asimismo, considerando que las CC poseen moléculas del complejo de histocompatibilidad tipo I, se sugiere que puedan participar en el reconocimiento y presentación de antígenos a células T.

Se ha sugerido que en la membrana de las CC se expresan también receptores para antígenos parasitarios, los cuales pueden inducir la activación directa de las CC con la consecuente liberación de productos proinflamatorios tanto preformados como sintetizados *de novo*. Actualmente se cuenta con la evidencia de activación directa de CC por el parásito *Leishmania infantum* y *L. major*, sin embargo se requiere la participación del parásito completo, ya que preparaciones antigénicas de este no son capaces de activar a las CC. En cuanto a la participación de las CC en la

respuesta inmune adquirida, este requiere del reconocimiento de antígenos bacterianos o de parásitos helmintos por la IgE, y es precisamente este complejo IgE-bacteria/parásito, el cual se une al receptor FcεR presente en la membrana de las CC. Los mediadores liberados por estas células incrementan la permeabilidad vascular, activan eosinófilos, producen una hipersecreción de moco e incrementan la peristalsis, lo cual puede alterar el proceso de adhesión de ciertos parásitos, impidiendo así el establecimiento de la infección y promoviendo la expulsión de los parásitos (Murray y cols. 1972; King y Nutman, 1992).

JUSTIFICACION

El proceso de expulsión de *T. spiralis* se considera como el principal mecanismo de defensa del huésped en contra de la infección. Este proceso está dirigido principalmente en contra de la LM, que es la fase infectiva del parásito y del pre-adulto del parásito. Existen evidencias que indican la participación de las CC intestinales y de IgE en la inducción del proceso de expulsión tanto en una infección primaria como secundaria en ratones y ratas. La interacción de las CC y de la IgE con moléculas del parásito inducen la liberación de moléculas proinflamatorias por parte de las CC. Estos mediadores liberados por las CC incrementan la permeabilidad vascular, activan eosinófilos, producen una hipersecreción de moco e incrementan la peristalsis, originando un proceso inflamatorio en el intestino de los animales infectados, lo cual puede impedir el establecimiento del parásito y promover la expulsión de este. En este proceso se considera la existencia de diferentes fases, en donde diversos mecanismos innatos, adquiridos e inflamatorios juegan un papel muy importante. Las CC tienen la capacidad para producir una gran cantidad de moléculas proinflamatorias, incluyendo interleucinas y recientemente se ha sugerido su participación tanto en una respuesta inmune innata como adquirida. A este respecto, existen evidencias que apoyan la participación de las CC en la respuesta inmune innata contra bacterias y parásitos protozoarios. Por lo anterior es posible que las CC puedan estar participando en el proceso de expulsión del organismo adulto de *T. spiralis* durante la fase temprana de este, en donde se involucran procesos inflamatorios. Lo anterior permite suponer que la participación de las CC en una respuesta inmune innata, requiere que estas células puedan ser activadas directamente, a través de un mecanismo independiente de IgE. Además, como se mencionó anteriormente con respecto a la expulsión del organismo adulto de *T. spiralis*, existen evidencias a favor de la participación de mecanismos tanto innatos como regulados por anticuerpos, por lo que las CC pudieran estar participando en una respuesta innata temprana durante este proceso, pero también en una respuesta tardía, donde existe una regulación. Considerando lo anteriormente mencionado, resulta de interés evaluar la estimulación directa de CC con antígenos de la larva muscular de *T. spiralis* determinando la liberación de moléculas proinflamatorias del tipo de histamina, proteasas y $TNF\alpha$, en particular con los antígenos de superficie que son inmunodominantes y reconocidos por una gran variedad de huéspedes además de participar en la inducción de inmunidad contra la infección por el parásito.

HIPOTESIS

Los antígenos de la larva muscular de *Trichinella spiralis* activan directamente a las células cebadas de peritoneo de rata.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de antígenos de la larva muscular de *Trichinella spiralis* en la activación *in vitro* de las células cebadas de peritoneo de rata mediante un mecanismo independiente de IgE.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Cuantificar la liberación de histamina, proteasas (Proteasa 5 y Carboxipeptidasa A) y $\text{TNF}\alpha$ por células cebadas de peritoneo de rata expuestas a los antígenos de superficie de la larva muscular de *Trichinella spiralis*
2. Analizar las diferencias entre células cebadas de peritoneo de rata infectadas y no infectadas durante la estimulación con los antígenos de superficie purificados de la larva muscular de *Trichinella spiralis*.

HIPOTESIS

Los antígenos de la larva muscular de *Trichinella spiralis* activan directamente a las células cebadas de peritoneo de rata.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de antígenos de la larva muscular de *Trichinella spiralis* en la activación *in vitro* de las células cebadas de peritoneo de rata mediante un mecanismo independiente de IgE.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Cuantificar la liberación de histamina, proteasas (Proteasa 5 y Carboxipeptidasa A) y TNF α por células cebadas de peritoneo de rata expuestas a los antígenos de superficie de la larva muscular de *Trichinella spiralis*
2. Analizar las diferencias entre células cebadas de peritoneo de rata infectadas y no infectadas durante la estimulación con los antígenos de superficie purificados de la larva muscular de *Trichinella spiralis*.

HIPOTESIS

Los antígenos de la larva muscular de *Trichinella spiralis* activan directamente a las células cebadas de peritoneo de rata.

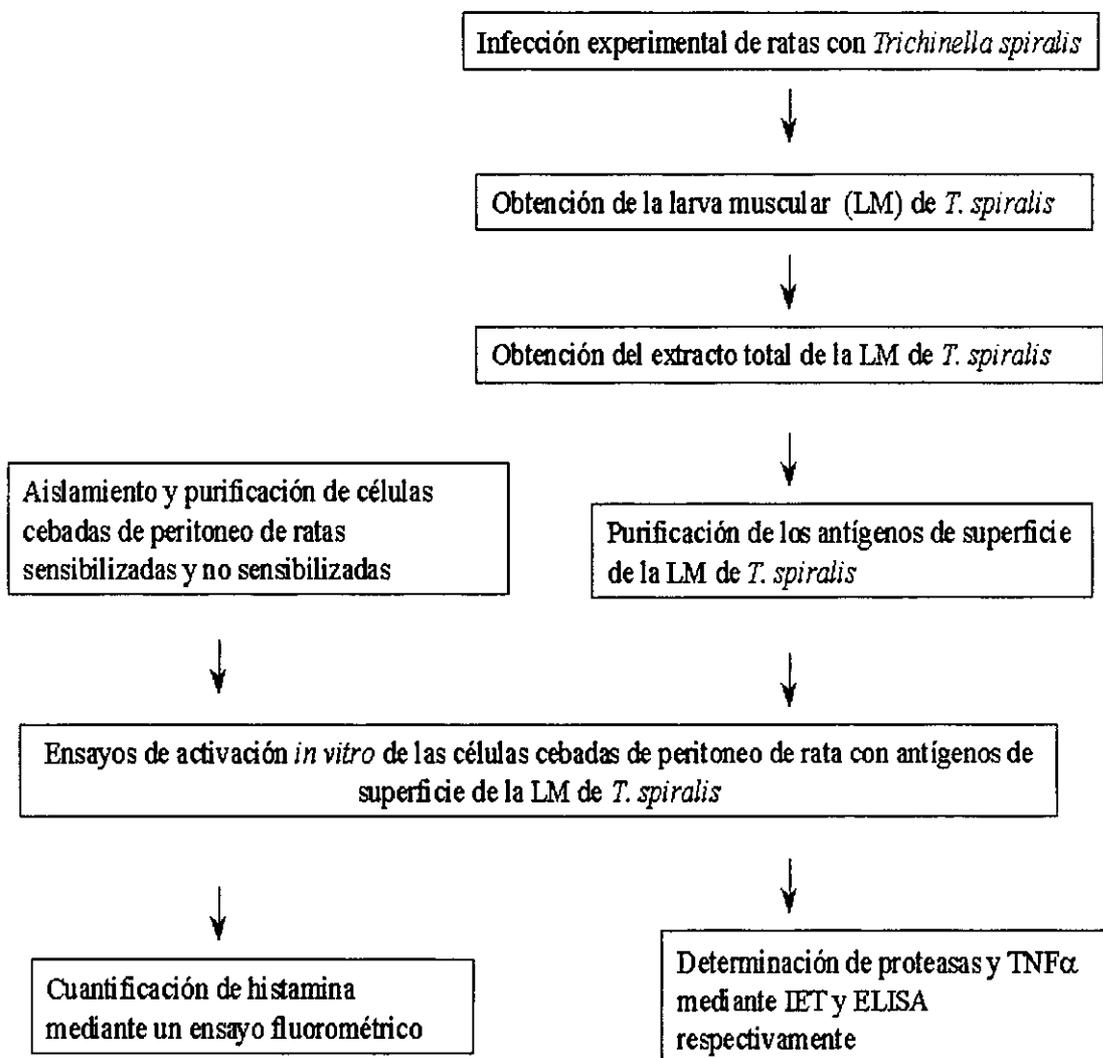
OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de antígenos de la larva muscular de *Trichinella spiralis* en la activación *in vitro* de las células cebadas de peritoneo de rata mediante un mecanismo independiente de IgE.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Cuantificar la liberación de histamina, proteasas (Proteasa 5 y Carboxipeptidasa A) y TNF α por células cebadas de peritoneo de rata expuestas a los antígenos de superficie de la larva muscular de *Trichinella spiralis*
2. Analizar las diferencias entre células cebadas de peritoneo de rata infectadas y no infectadas durante la estimulación con los antígenos de superficie purificados de la larva muscular de *Trichinella spiralis*.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



MATERIALES Y METODOS

INFECCION EXPERIMENTAL EN RATAS CON *Trichinella spiralis*

Ratas de la cepa Sprague Dawley de 12 semanas de edad se infectaron experimentalmente con 1500 larvas musculares (LM) de *T. spiralis*. Las LM se obtuvieron a partir de la digestión del músculo esquelético de ratas infectadas experimentalmente con el parásito, de acuerdo al protocolo descrito por Dennis y cols. (1970). Después de 28 días de infección, las ratas se sacrificaron por dislocación cervical procediendo a quitarles la piel, cabeza, extremidades y vísceras. El músculo esquelético se maceró finamente y se colocó en un matraz que contenía una solución de Pepsina (Sigma Co., USA)-HCl (Merck, México) al 1% y se incubó a 37°C durante 3 h con agitación constante. Transcurrido este tiempo de incubación, la solución se pasó por un tamiz de 137 μm y se dejó que las LM se sedimentaran por un tiempo aproximado de 20 min, después se transfirieron a tubos Falcon de 15 ml (Corning-Costar, USA) y se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min en una centrifuga Sorvall RT6000D (Du Pont, USA). El sobrenadante se decantó y las LM se lavaron varias veces con amortiguador salino de fosfatos (PBS: NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 1.44 g, KH₂PO₄ 0.24 g, pH a 7.4 y aforar a 1 L). Las LM así aisladas se emplearon, por un lado, para la obtención del extracto total (ET) del parásito y por otro lado para mantener el ciclo de vida del parásito.

Con el objeto de mantener el ciclo de vida del parásito, las LM obtenidas, se resuspendieron en PBS y enseguida se realizó una dilución 1:100 en Bacto Agar (Difco Laboratories USA) al 0.2%; de esta suspensión se tomaron alícuotas de 5 μl y con la ayuda de un microscopio óptico (BHA, Olympus, Japón) se contaron las LM. Posteriormente las ratas Sprague Dawley se inocularon con 1500 LM empleando una cánula gástrica.

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

El ET soluble de la LM a partir de la cual se purificaron los antígenos de superficie, se obtuvo siguiendo el método descrito por Parkhouse y cols. (1981). Así, un paquete de 1 ml de la LM se resuspendió en 1 volumen de amortiguador de Tris-base 10 mM, pH 8.3 (Sigma Co., USA) conteniendo inhibidores de proteasas: N- α -p Tosil-L-Lisina Clorometil Cetona (TLCK) 50 $\mu\text{g/ml}$ diluido en etanol, Fenil Metil Sulfonil Fluoruro (PMSF) 25 $\mu\text{g/ml}$ diluido en isopropanol y L-1-Tosilamida-2-fenil etilcrometil cetona (TPCK) 174 $\mu\text{g/ml}$ diluido en agua. Los inhibidores empleados fueron de Sigma Co. (San Louis Mo. USA).

Los parásitos se homogeneizaron durante 20 min a 4°C con un homogeneizador manual (Potter Wheaton, USA). Posteriormente, se agregó deoxicolato de sodio (DOC, Sigma Co., USA) al 2% homogeneizando los parásitos y dejándolos reposar durante 20 min. Pasado este tiempo se homogeneizaron nuevamente por otros 20 min. El extracto se clarificó

mediante centrifugación a 12000 rpm por 30 min a 4°C en una centrifuga eppendorf (Brinkmann Instruments Inc. Germany) y el sobrenadante se almacenó a -20°C. El ET así obtenido se utilizó para la purificación de los antígenos de superficie.

Por otra parte, para la obtención del ET que fué utilizado en los ensayos de estimulación de CC, los parásitos se homogeneizaron durante 20 min a 4°C con un homogeneizador manual (Potter Wheaton, USA) pero sólo se utilizó PBS sin DOC, siguiendo el método descrito por Jarvis y Pritchard (1992).

La cuantificación de las proteínas se realizó mediante el método de Lowry y cols. (1951) con algunas modificaciones. En la cuantificación del ET obtenido con DOC, la curva estándar se preparó con albúmina sérica bovina (ASB, Sigma Co. USA) a diferentes concentraciones, añadiéndose DOC a una concentración final de 2 %.

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

La purificación de los antígenos de superficie de la LM de *T. spiralis* se realizó mediante una columna de afinidad empleando el anticuerpo monoclonal NIM-M1 que tiene especificidad por las moléculas de superficie de 47, 52, 67 y 72 kDa, acoplado a Sefarosa 4B (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia) de acuerdo al protocolo descrito por Parkhouse (1984).

Para la preparación de la columna, se tomó un volumen de 5 ml de Sefarosa 4B-anticuerpo monoclonal NIM-M1 y se empacó en una columna (BIO RAD, USA) de 1.3 x 30 cm. La columna de afinidad se lavó con un volumen de agua y un volumen de amortiguador alkali-strip pH 11.3 (365 µl de Dietilamina 50 mM, Deoxicolato de Sodio 2%, pH a 11.3 y aforar a 100 ml) y se equilibró con varios volúmenes de amortiguador de columna pH 8.3 (Tris-HCl 20 mM, Deoxicolato de Sodio 0.5 %, pH a 8.3 y aforar a 100 ml) hasta que el pH de la resina fuera de 8.3.

Posteriormente, 20 mg del ET se centrifugaron a 100,000 rpm por 10 min en una microultracentrífuga (AirFuge, Beckman, USA), para descartar precipitados que pudieran interferir con la cromatografía de afinidad. El sobrenadante se pasó por la columna tres veces y ésta se lavó con el amortiguador de columna hasta que la densidad óptica (DO) de las fracciones colectadas fuera de 0.0, midiendo la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro (DU-65, Beckman, USA). La elución del antígeno adherido a la columna fue llevado a cabo en condiciones de pH básico empleando dos tipos de amortiguadores pre-strip y alkali-strip (pre-strip: Glicina 50 mM, Deoxicolato de Sodio 2%, pH a 9.3 y aforar a 100 ml y Alkali-strip: 365 µl de Dietilamina 50 mM, Deoxicolato de Sodio 2%, pH a 11.3 y aforar a 100 ml)). El cambio de amortiguador se realizó de acuerdo a la DO de las fracciones colectadas. El material eluido se colectó en fracciones de 0.5 ml y la cantidad de proteínas se evaluó espectrofotométricamente midiendo la DO a 280 nm. Las fracciones eluidas con alkali-strip que contenían proteína se ajustaron a un pH de 8.3 con una solución de Tris-HCl (Sigma Co. USA) 1M. Al término de la elución la columna se reconstituyó lavando con dos volúmenes de amortiguador de columna, dos volúmenes

de agua bidestilada y con amortiguador PBS hasta que el pH de la resina fuera igual al de este último. El gel se preservó en PBS-azida de sodio al 0.1%. De acuerdo al patrón de elución, las fracciones que contenían proteína se juntaron y se dializaron extensivamente contra una solución de Tris-HCl 20mM pH 8.3.

La concentración de proteínas 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 utilizó Acuazide (Calbiochem, San Diego, Ca. USA)

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS EN LOS ANTIGENOS DE *Trichinella spiralis*

Para la determinación de proteínas se utilizó el método de Lowry modificado (1951) en donde se prepararon las siguientes soluciones: Sulfato de cobre heptahidratado (Merck, México) al 0.5% (solución A), Carbonato de sodio (J. T. Baker, México) al 2% en hidróxido de sodio 0.1N (solución B), Tartrato de sodio y potasio (J. T. Baker, México) al 2% (solución C), se mezcló un volumen de la solución A con un volumen de la solución C (solución D) y la mezcla de cincuenta volúmenes de la solución B con un volumen de la solución D (solución E). Después, se preparó una curva patrón de Albúmina Sérica Bovina (ASB). Una vez que se depositó la solución de ASB o de los antígenos del parásito se agregó un volumen de agua destilada y 2.5 ml de la solución E preparada inicialmente. Se mezcló el contenido de cada tubo y la mezcla se incubó durante 10 min a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, a cada tubo se le agregaron 250 µl de Folin-Ciocalteu (Sigma Co. USA) diluido 1:2 con agua bidestilada y 500 µl de SDS (BIO-RAD, USA) al 5% y se agitó en vortex dejándolos reposar durante 30 min a TA. Posteriormente la DO se leyó a 750 nm en un espectrofotómetro (DU-65, Beckman, USA). La concentración del extracto total y de los antígenos de superficie purificados de la larva muscular de *T. spiralis* se obtuvo mediante la interpolación de los valores de DO en la curva patrón de ASB (10-100 µg).

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

El análisis electroforético del ET, antígenos de superficie purificados de la LM de *T. spiralis*, así como de las pastillas de CCP estimuladas con los antígenos de superficie de *T. spiralis* se realizó en geles de poliacrilamida-SDS al 10 % de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). Una vez que se obtuvieron las proteínas para su análisis electroforético se añadió el amortiguador de muestra 5X y se hirvió esta mezcla durante 3 min adicionando βMercaptoetanol (Bio Rad, USA). En el análisis electroforético se empleó una cámara de electroforesis vertical miniprotean II (Bio Rad, USA). Para preparar los geles, la mezcla para el gel espaciador al 10 % (H₂O 4.0 ml, Acrilamida/Bisacrilamida (30%) 3.3 ml, Tris 1.5 M (pH 8.8) 2.5 ml, SDS 10 % 0.1 ml, Persulfato de Amonio 10% 0.1 ml, TEMED 0.004 ml) se colocó entre los vidrios y después se agregó 1 ml de isopropanol para lograr una polimerización uniforme del gel. Después de que se realizó la polimerización, se lavó el gel espaciador con agua para eliminar el isopropanol y se colocó un peine de 10 pozos. Posteriormente se

depositó la mezcla del gel concentrador al 5 % (H₂O 3.4 ml, Acrilamida/Bisacrilamida (30%) 0.83 ml, Tris 1 M (pH 6.8) 0.63 ml, SDS 10% 0.05 ml, Persulfato de Amonio 10% 0.05 ml, TEMED 0.005 ml) dejándose polimerizar por 15 min. La separación electroforética se realizó inicialmente a 100 V con amortiguador de corrida Tris-Glicina (Trisma base 3.0 g, Glicina 14.4 g, pH a 8.3 y agregar 5.0 ml de SDS al 20%, aforar a 1 L) hasta que penetraron las muestras al gel espaciador y después se aumentó el voltaje a 140 V para la separación de las proteínas.

En el análisis electroforético de las proteínas se incluyeron marcadores de alto y bajo peso molecular (BIO RAD): Miosina (200 kDa), β Galactosidasa (116 kDa), Fosforilasa B (97 kDa), Albúmina Sérica (66 kDa), Ovoalbúmina (45 kDa), Anhidrasa Carbónica (31 kDa), Inhibidor de Tripsina (21 kDa), Lisosima (14 kDa), Aprotinina (6 kDa). Los geles que no fueron analizados por Inmuno-electrotransferencia (IET) se tiñeron con azul de Coomassie al 0.1 % con agitación constante por 15 min a TA y después se destiñeron por 30 min a TA con una solución de alto metanol.

Setenta y cinco microgramos de proteína se separaron en geles de poliacrilamida-SDS al 10 % bajo condiciones desnaturalizantes y posteriormente se incubaron con amortiguador de transferencia (primero se preparo el amortiguador de transferencia 8X: Trisma base 0.2 M (12.11 g), Glicina 57.68 g, aforar a 500 ml y después se preparo el amortiguador de transferencia 1 X: 250 ml del stock 8X y 400 ml de Metanol, aforar a 2 lt) durante 1 h a 4°C con un cambio de la solución a los 30 min y las proteínas se transfirieron a papel de nitrocelulosa de 0.45 μ m, haciendo una modificación a la metodología descrita por Befus y cols. (1995). Para esto se empleó papel filtro Whatman del número 3 y fibra scotch brite. La transferencia de las proteínas al papel de nitrocelulosa se llevó a cabo durante 1 h a 100 mV en una cámara de transferencia (Bio Rad, USA). Posteriormente, los filtros se bloquearon con PBS-ASB al 3%, durante toda la noche a 4°C.

DETECCION DE ENDOTOXINA EN EL EXTRACTO TOTAL Y EN LOS ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE LA LARVA MUSCULAR DE *Trichinella spiralis*

Para la evaluación de la presencia de endotoxina en el ET y en los antígenos de superficie purificados de la LM de *T. spiralis* se utilizó el Kit de E-Toxate® (Limulus amoebocyte lysate)(Sigma Co. USA). En este Kit se utilizó un estándar de endotoxina (4000 EU/ml) y se elaboraron diluciones seriadas.

Usando el vial de pruebas múltiples de E-Toxate®, se marcaron 9 tubos de vidrio de 5 ml, los cuales previamente se lavaron exhaustivamente y se enjuagaron varias veces con agua desionizada estéril. Posteriormente, los tubos esterilizados por autoclave durante 1 h a 171°C se dejaron secar en el horno durante 3 h a 80°C.

Los tubos A y B fueron utilizados para el ET y los antígenos de superficie respectivamente, el tubo C se incluyó como control negativo, los tubos D, E, F, G, H e I que contenían 0.5, 0.25, 0.125, 0.06, 0.03, 0.015 EU/ml respectivamente, fueron utilizados para determinar la sensibilidad de la solución de trabajo del E-Toxate® y también sirvieron como

controles positivos. Las soluciones con las muestras y con la endotoxina se colocaron directamente en la base de los tubos. La solución de trabajo se agregó a cada uno de los tubos, permitiendo que fluyera por la pared del tubo.

Después se mezcló el contenido de los tubos y se cubrieron las bocas de los tubos con parafilm y con papel aluminio y se incubaron por 1 h a 37°C sin agitar y en una superficie plana.

Para la interpretación de los resultados del ensayo de E-Toxate®, después de la incubación de 1 h los tubos se secaron cuidadosamente y se invirtieron 180° lentamente, para observar si existía polimerización de la mezcla. La prueba positiva fue la formación de un gel duro que permitiera la inversión completa del tubo sin que se rompiera el gel. Otros resultados como: geles suaves, turbidez, incremento en la viscosidad y líquido claro, se consideraron negativos.

ASLAMIENTO Y PURIFICACION DE CELULAS CEBADAS DE PERITONEO DE RATA (CCP)

Las CC se aislaron de la cavidad peritoneal de ratas macho de la cepa Sprague Dawley de 400 gr, las que se sacrificaron por dislocación cervical, separando las ratas no infectadas de las ratas infectadas con *T. spiralis* 28 días p.i. Posteriormente, se les realizó una incisión en la garganta y se sangraron para eliminar una posible contaminación con eritrocitos. Se procedió a desprender la piel, para exponer el músculo por medio de un corte longitudinal, sobre el abdomen y se inyectaron dentro de la cavidad peritoneal 20 ml de amortiguador Hepes-Tyrode (AHT) pH 7.4 (HEPES 1.43 g, NaCl 4.0 g, D-Glucosa 0.5 g, KCl 0.10 g, CaCl₂ 0.074 g, ASB 0.5 g, NaH₂PO₄ 0.03 g, pH a 7.4 y se aforo a 500 ml), seguido de un suave masaje en el abdomen. Enseguida se hizo una incisión en la línea media y se colectó el amortiguador con una pipeta de transferencia (ELKAY Labsystems, Inc. Finlandia), y se depositó el fluido en un tubo falcon cónico de 50 ml (Corning Costar, USA) en hielo. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 1000 rpm en una centrifuga Sorvall RT 6000D (DuPont) durante 5 min a 4°C. El paquete celular resultante se resuspendió en 5 ml de AHT, para formar una suspensión celular que se agregó cuidadosamente a un gradiente discontinuo de percoll (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia) 30%-80% (RPMI 1648 completo: 50 ml de RPMI 1648 2X, Suero fetal de bovino 5 ml, 1 ml de Bicarbonato de Sodio 7.5 %, 1 ml de Hepes 2 M, 1 ml de L-Glutamina y 2ml de Penicilina- Steptomycin 2 ml, aforar a 100 ml y Percoll isotónico Percoll 40.0 ml, 376 ml de solución salina de Hanks al 10X, 0.4 ml de Hepes 1M y 4 gotas de HCl 1 N; gradiente 30 %: RPMI 14 .0 ml, Percoll isotónico 6.0 ml, 80 %: RPMI 3.2 ml, Percoll isotónico 12.8 ml), el cual se centrifugó durante 20 min a 1600 rpm a 4°C según el protocolo descrito por Lee y cols. (1985). Las CC de peritoneo de rata (CCP) se recuperaron de la base del tubo y se lavaron con 40 ml de AHT mediante centrifugación durante 5 min a 1000 rpm. Las CCP lavadas se resuspendieron en 2 ml de AHT y se realizó la cuantificación de la viabilidad y la pureza mediante los colorantes de exclusión azul de tripano (0.4 % en PBS) y azul de toluidina (0.5 % en H₂O), respectivamente. Las CCP se dejaron estabilizar con 20 ml de AHT, durante 2 h a 37°C en una incubadora (Multiblock Lab-Line. Mod. 2050, USA) con

atmósfera húmeda de CO₂ al 5%. Una vez estabilizadas, las CCP se lavaron con AHT y se procedió a estimularlas con las diferentes concentraciones de las preparaciones antigénicas. Sólo las CCP con viabilidad y pureza superior a 95 % se utilizaron en los experimentos.

ESTIMULACION DE CCP CON EL EXTRACTO TOTAL Y LOS ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE LA LM DE *Trichinella spiralis*

En los ensayos de estimulación se emplearon tanto CCP de ratas infectadas con la LM de *T. spiralis* como CCP de ratas no infectadas, las cuales se incubaron *in vitro* con el ET o con los antígenos de superficie del parásito. Las concentraciones del ET empleadas fueron: a 0.01, 0.1, 0.15, 0.5 y 1 µg/ml y la de los antígenos de superficie purificados de: 5, 10, 30, 50 y 100 ng/ml. En estos ensayos, se incluyeron como controles negativos a las CCP sin tratamiento (liberación espontánea) y como controles positivos a las CCP en presencia del ionóforo de Calcio A23187 (Sigma Co. USA), a una concentración de 2.5 µM. En los ensayos de determinación de TNF α , se incluyó como control positivo a las CCP en presencia de lipopolisacárido de *Escherichia coli* serotipo 055:B5 (Sigma, Co. USA) a una concentración de 40 UE/ml.

En los ensayos de estimulación se utilizaron diferente número de células según se tratase de un ensayo para determinar liberación de histamina, proteasas ó TNF α . Así, se emplearon: 25 x 10³ CCP para histamina, 75 X 10³ CCP para proteasas y 1 X10⁶ CCP para TNF α .

En tubos eppendorf de 0.5 ml se colocaron las CCP en un volumen de 0.1 ml de AHT, a las cuales se les añadieron las diferentes concentraciones de las dos preparaciones antigénicas (ET y antígenos de superficie) de la LM de *T. spiralis*, hasta un volumen final de 0.2 ml. Los tubos se incubaron por 30 min a 37°C en presencia de CO₂ al 5%. En el caso de los ensayos para la determinación de TNF α , la incubación de las CCP con los antígenos de superficie se llevó a cabo durante 8 h. Posteriormente, se colocaron los tubos en hielo durante 5 min y se centrifugaron a 3400 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se transfirió a tubos eppendorf. Las pastillas como los sobrenadantes obtenidos se emplearon para la determinación de histamina y de proteasas (P5 y CPA) mientras que la evaluación de TNF α liberado se hizo únicamente en los sobrenadantes.

CUANTIFICACION DE HISTAMINA LIBERADA POR CCP ESTIMULADAS CON ANTIGENOS DE *Trichinella spiralis*

La estimulación de las CCP se determinó mediante la liberación de histamina, que se midió con el ensayo fluorométrico descrito por Siraganian (1974) con algunas modificaciones. En este ensayo se utilizaron los sobrenadantes y las pastillas obtenidos de las CCP estimuladas con cada una de las diferentes concentraciones antigénicas y de los controles positivos

y negativos (liberación espontánea). Así, las pastillas de las CCP se resuspendieron en 200 µl de AHT y los tubos se hirieron por 10 min, colocándose posteriormente en hielo. Por otro lado, a los tubos con los sobrenadantes correspondientes a cada una de las pastillas se les agregaron al igual que a los tubos con las pastillas 20 µl de ácido Tricloracético (TCA, Boehinger Mannheim, Alemania) al 25%. Los tubos se agitaron y se permitió que se llevara a cabo la reacción por 10 min. Los tubos con la proteínas precipitadas se centrifugaron a 8000 rpm por 10 min. Posteriormente se transfirieron 190 µl de cada tubo (sin tocar la pastilla) en una placa Fluoro Nunc MaxiSorp (Nunc, Inc. Dinamarca). Una vez colocadas las muestras en la placa, se agregaron 20 µl de NaOH 4N (J. T. Baker, México) a cada pozo y se agitaron lentamente por 5 min. Transcurrido este tiempo se le agregó a cada pozo 50 µl del o-ptaldialdehído (Merck, México) (OPT, 1.3 mg/ml de metanol grado espectrofluorométrico (Sigma Co. USA) y se agitaron lentamente durante 4 min. Para completar la reacción se agregaron 26 µl de HCl 3N (Merck, México) a cada pozo y se llevó la placa al vortex durante 20 min. El volumen final por pozo fue de 286 µl. En este momento se formó un producto fluorescente estable a pH ácido que se leyó en un espectrofluorómetro Fluoroskan II (Lab. System, Finlandia), usando un juego de filtros de emisión (430 nm) y de excitación (360 nm). Los porcentajes de histamina liberada se calcularon utilizando la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de histamina liberada} = \frac{\text{DO sobrenadante}}{\text{Total (DO del sobrenadante + DO de la pastilla)}} \times 100 - \text{liberación espontánea.}$$

La liberación espontánea se calculó considerando:

$$\text{Liberación espontánea} = \frac{\text{DO del sobrenadante}}{\text{Total (DO del sobrenadante + DO de la pastilla)}} \times 100$$

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA TOTAL EN SOBRENADANTES DE CCP ESTIMULADAS POR LOS ANTÍGENOS DE SUPERFICIE DE *Trichinella spiralis*

Se evaluó la actividad proteolítica total en sobrenadantes de CCP estimuladas con el ET y con los antígenos de superficie purificados de la LM de *T. spiralis*, mediante el Kit de Enzchek (Molecular Probes Inc., USA). Este Kit está diseñado para detectar proteasas del tipo serina y con grupos sulfidril, mediante el sustrato Bodipy-fl-caseína, que libera péptidos-Bodipy-fl fluorescentes después de la digestión proteolítica.

El procedimiento utiliza un vial del conjugado de Bodipy-fl-caseína al cual se le agregaron 200 µl de agua desionizada estéril y esta mezcla se agregó al amortiguador de digestión 2X preparado con agua desionizada estéril (a esta solución final se le llamó solución de trabajo). Se agregaron 50 µl de los sobrenadantes de las CCP estimuladas con las diferentes preparaciones antigénicas, así como de los controles negativos (CCP sin tratamiento) y positivos (CCP estimuladas con el

Ionoforo de Calcio A23187 2.5 μ M), a una placa Fluoro Nunc Maxisorp (Nunc, Inc. Dinamarca) y se añadieron 50 μ l de la solución de trabajo. La solución se mezcló y se dejó incubando en la oscuridad por 24 h a TA. Después de la incubación se leyó la placa en un espectrofluorómetro Fluoroskan II (Labsystems, Finlandia) con un juego de filtros de emisión (520 nm) y de excitación (480 nm).

El incremento en la actividad de fluorescencia de los sobrenadantes de las CCP tratadas con las diferentes preparaciones antigénicas (siendo el valor de actividad proteolítica espontánea restado previamente), se consideró proporcional a la actividad proteolítica total.

INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE PROTEASAS DE SERINA Y METALOPROTEASAS EN SOBRENADANTES DE CCP ESTIMULADAS POR LOS ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE *Trichinella spiralis*

La presencia de proteasas de serina y metaloproteasas en los sobrenadantes de las CCP estimuladas inicialmente con los antígenos de superficie purificados de la LM de *T. spiralis*, se determinó usando el mismo kit de Enzchek descrito anteriormente y empleando los inhibidores de proteasas Pefabloc (proteasas de serina) y EDTA-Na (metaloproteasas), a una concentración final de 2mM y 10 mM respectivamente. Los tubos con los sobrenadantes y los inhibidores se incubaron por 30 min a 37°C. Después de la incubación se leyó la placa en un espectrofluorómetro Fluoroskan II con un juego de filtros de emisión (520 nm) y de excitación (480 nm).

El porcentaje de inhibición determinado para cada tipo de proteasa, se calculó con respecto al control positivo (sobrenadante de CCP sin inhibidores). A los valores obtenidos se les restó el obtenido con el control negativo (liberación espontánea).

DETERMINACION DE PROTEASA 5 Y CARBOXIPEPTIDASA A LIBERADAS POR CCP ESTIMULADAS CON ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE *Trichinella spiralis*

Mediante ensayos de IET y análisis por densitometría se determinó la cantidad total de proteasa 5 (P5) y carboxipeptidasa A (CPA), presentes en las pastillas de 75×10^3 CCP de ratas infectadas y CCP de ratas no infectadas (equivalentes a 75 μ g de proteína total), sin tratamiento con los antígenos de superficie purificados y se infirió la cantidad de proteasas liberadas por las CCP tratadas con las diferentes concentraciones del antígeno. Para esto, las proteínas totales obtenidas de las pastillas se separaron electroforéticamente de acuerdo a Laemmli (1970) y se llevó a cabo su electrotransferencia (IET) de acuerdo a Towbin y cols. (1979). Para la inmunodetección de las proteasas liberadas se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo anti-rata para P5 y CPA siguiendo el protocolo descrito por Befus y cols., (1995), a una dilución de 1:200 y 1:100 respectivamente empleando como diluyente una solución de albúmina al 10 % (ASB 4 g, 4 ml de Tritón X-

100 (10 %), 2 ml de SDS 20%, aforar a 10 ml). Los filtros de nitrocelulosa se incubaron durante 3 h a 37°C y posteriormente se lavaron una vez con PBS-Tritón X-100 al 1% y dos veces más con PBS por 10 min en cada lavado. Al término de los lavados las tiras se incubaron con el conjugado de cabra anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa (Gibco BRL, USA) diluido 1:750 en PBS, durante 2 h a 37°C. Después de la incubación los filtros se lavaron de la misma forma como ya se mencionó anteriormente y posteriormente se les agregó la solución de sustrato para peroxidasa (4 ml del stock 6X de 4-cloro-1-naftol 3 mg/ml en Metanol absoluto, PBS 20 ml y 8µl de H₂O₂ 30%), hasta revelar las bandas proteicas (aproximadamente 5 min). La reacción se detuvo con agua destilada. El análisis densitométrico se realizó por medio de un densitómetro personal y usando el programa ImageQuant (Molecular Dynamics, Corp, USA), para determinar las diferencias del contenido celular de proteínas a partir de los valores en unidades arbitrarias de DO. A los valores de DO obtenidos con las pastillas de las CCP sin tratamiento (control negativo) se les restaron los valores obtenidos con las CCP estimuladas con las diferentes concentraciones de los antígenos de superficie y la diferencia obtenida correspondió al nivel de las proteasas liberadas.

CUANTIFICACION DE TNF α LIBERADO EN SOBRENADANTES DE CCP ESTIMULADAS CON LOS ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE *T. spiralis*

La cuantificación del TNF α se realizó mediante un inmunoensayo en los sobrenadantes de las CCP expuestas por 30 min y 8 h a los antígenos de superficie purificados de la LM de *T. spiralis*. En este ensayo se utilizó un Kit de ELISA para la cuantificación de TNF α de rata (ENDOGEN Inc. MA. USA) y los ensayos se realizaron de acuerdo a las instrucciones del proveedor: La curva estándar utilizada en este protocolo se preparó mediante la reconstitución del vial estándar de TNF α con 1.4 ml de agua desionizada. Una vez reconstituido, éste se mezcló perfectamente mediante la inversión del tubo y se procedió a la preparación de diluciones seriadas preparadas con AHT para generar concentraciones de 833, 278, 93, 46, 31, 15 y 0 pg/ml de TNF α . Cincuenta µl de los estándares de TNF α así como de las muestras se incubaron en la placa de ELISA por 1 h a TA. Al terminar la incubación, se decantó la solución y la placa se lavó 3 veces por 30 seg cada vez con una solución de lavado. Después se agregaron 50 µl del anticuerpo biotinilado anti TNF α en cada pozo, se tapó la placa y se incubó por 2 h a TA. Una vez que terminó la incubación, se decantó la solución y se realizaron 3 lavados como se mencionó anteriormente. Posteriormente, se agregaron 100 µl de la solución del conjugado streptavidina-HRP a todos los pozos, se cubrió la placa y se procedió a incubar nuevamente por 30 min a TA. Una vez realizado esto, se decantó la solución y la placa se lavó 3 veces como se mencionó anteriormente. Se agregaron 100 µl de la solución de sustrato TMB (del Kit) a cada uno de los pozos y se incubó nuevamente la placa por otros 30 min a TA en la obscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación se agregaron 100 µl de la solución de paro del kit. Finalmente la placa se leyó en un Lector de ELISA

a una absorbancia de 450 nm. Los valores de DO obtenidos con la muestra se interpolaron en la curva estándar para $TNF\alpha$.

ANALISIS ESTADISTICO

Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de grupos independientes y con 0.5 de intervalo de confianza para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos con las CCP de ratas infectadas y CCP de ratas no infectadas.

RESULTADOS

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

El ET preparado de acuerdo a lo descrito por Parkhouse y cols. (1984) a partir del cual se purificaron los antígenos de superficie se analizó electroforéticamente en geles de poliacrilamida en presencia de SDS bajo condiciones desnaturizantes (Fig. 6). El ET obtenido según la metodología reportada por Jarvis y Pritchard (1992) usado en los ensayos de liberación de histamina, se analizó también electroforéticamente bajo las mismas condiciones (Fig. 6). En este análisis se observó para las dos preparaciones un patrón proteico complejo con aproximadamente 22 proteínas, con pesos moleculares que iban de 20 a 200 kDa destacando proteínas con pesos moleculares de 32, 40 y 47 a 72 kDa.

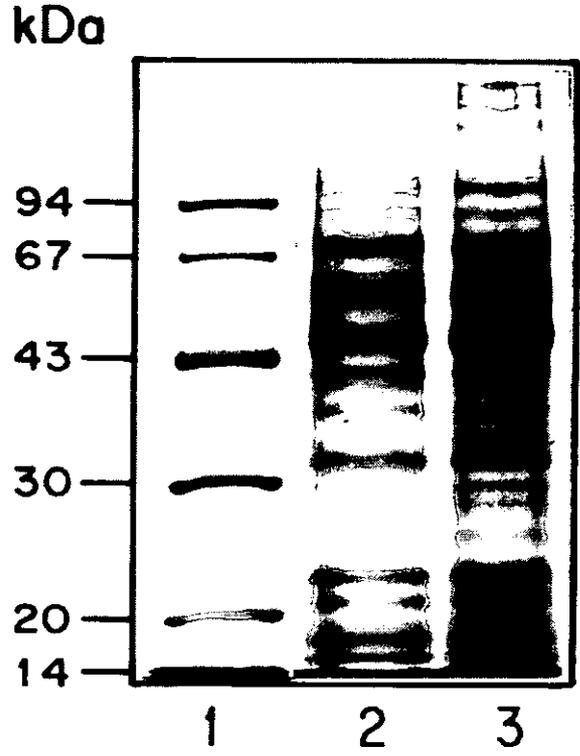


Fig. 6. Análisis electroforético del extracto total (ET) de la LM de *T. spiralis*. El ET de la LM del parásito, se obtuvo como se describió en materiales y métodos y se separó electroforéticamente en geles de poliacrilamida-SDS al 10 % bajo condiciones desnaturizantes. El peso molecular de las proteínas empleadas como estándares se presentan en el carril 1. En el carril 2 se muestra el patrón proteico del ET obtenido mediante el método descrito por Jarvis y Pritchard (1992) y en el carril 3 se muestra el patrón proteico del ET obtenido mediante el protocolo descrito por Parkhouse y cols. (1984).

ANÁLISIS DE LOS ANTIGENOS DE SUPERFICIE PURIFICADOS DE LA LARVA MUSCULAR DE *Trichinella spiralis*

A partir de 20 mg del ET de la LM de *T. spiralis* se purificaron los antígenos de superficie de este parásito mediante cromatografía de afinidad, empleando al anticuerpo monoclonal NIM-M1 acoplado a Sefarosa 4B. En la purificación se emplearon los amortiguadores pre-strip y alkali-strip; las fracciones obtenidas con estos amortiguadores se concentraron y se analizaron electroforéticamente (Fig. 7). En las fracciones alkali-strip se obtuvieron principalmente 4 proteínas con pesos moleculares de 47, 52, 67 y 72 kDa (Fig. 7, carril 3) que corresponden a los antígenos de superficie previamente reportados por Ortega-Pierres y cols. (1989). Estos antígenos así purificados se utilizaron en los ensayos de estimulación de CCP de ratas infectadas y no infectadas, con la finalidad de evaluar su participación en la activación de este tipo celular en la presencia y en la ausencia de IgE.

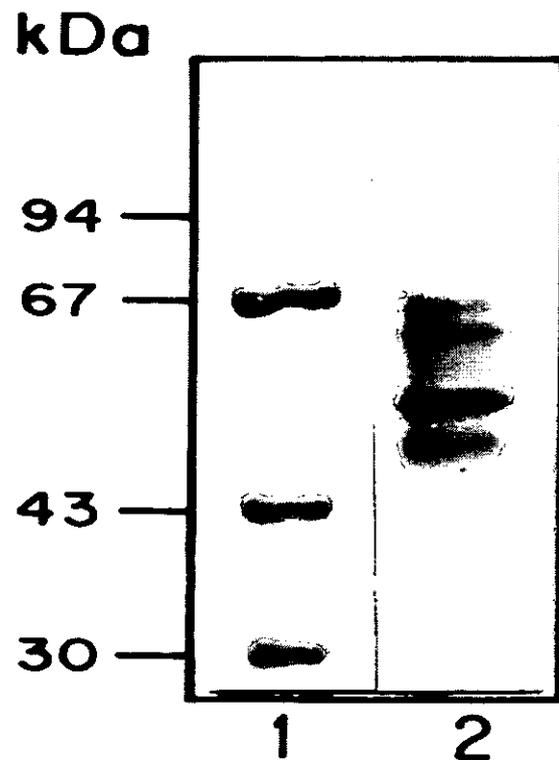


Figura 7. Análisis electroforético de los antígenos de superficie purificados de la LM de *T. spiralis*. Los antígenos de superficie se purificaron mediante cromatografía de afinidad empleando al anticuerpo monoclonal NIM-M1 acoplado a Sefarosa 4B. Los antígenos de superficie purificados se separaron electroforéticamente en geles de poliácridamida-SDS al 10 % bajo condiciones desnaturizantes. El peso molecular de las proteínas empleadas como estándares se presentan en el carril 1. En el carril 2 se muestran los antígenos purificados de la fracción alkali-strip.

CUANTIFICACION DE ENDOTOXINA PRESENTE EN LAS PREPARACIONES ANTIGENICAS OBTENIDAS DE *Trichinella spiralis*

La presencia de endotoxina en el ET y los antígenos de superficie purificados de la LM se evaluó mediante el Kit de E-Toxate® (Sigma, Co. USA). Los resultados indicaron la presencia de 0.015 UE/ml, que se considera como valor negativo de acuerdo a las instrucciones del Kit. Este resultado fue reproducible en tres experimentos realizados por duplicado cada uno.

AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE CELULAS CEBADAS DE PERITONEO DE RATA

Mediante la metodología descrita por Lee y cols. (1985) empleando gradientes discontinuos de Percoll (30% -80%) para el aislamiento de CCP de ratas infectadas y CCP de ratas no infectadas se obtuvo un valor promedio de aproximadamente 1.2×10^6 CCP/rata no infectada y de aproximadamente 2.3×10^6 CCP/rata infectada con el parásito. La pureza con la que se obtuvieron las células fue del 99 % y la viabilidad promedio fue del 98 % en ambos casos. Las CCP que se obtenían con valores menores del 95 % de viabilidad o de pureza se desecharon. Además, las preparaciones celulares que mostraron al microscopio presencia de degranulación no fueron utilizadas en los ensayos de activación.

CUANTIFICACION DE HISTAMINA LIBERADA POR CELULAS CEBADAS DE PERITONEO DE RATA ESTIMULADAS CON ANTIGENOS DE *Trichinella spiralis*

En la figura 8 se muestran los valores promedio de histamina liberada por CCP de ratas infectadas y no infectadas con el parásito, estimuladas con diferentes concentraciones del ET de la LM de *T. spiralis*. El promedio de la liberación espontánea de histamina fue del 4 %. Las CCP de ratas infectadas (barras en color gris) liberaron el mayor porcentaje de histamina (38%) con la concentración de 0.1 $\mu\text{g/ml}$, siendo estadísticamente significativa ($p < 0.05$) a los valores obtenidos con las CCP de ratas no infectadas (19 %) (barras en color blanco), tratadas con la misma dosis del ET. Con respecto a las CCP de ratas no infectadas, estas liberaron el mayor porcentaje de histamina a la concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (43%), el valor fue estadísticamente mayor ($p < 0.05$) al obtenido con las CCP de ratas infectadas (5%) tratadas a esta concentración. Cuando se empleó la dosis de 0.15 $\mu\text{g/ml}$ se observó que las CCP de ratas no infectadas liberaron 39 % de histamina, siendo significativamente mayor al obtenido con las CCP de ratas infectadas tratadas a la misma concentración ($p < 0.05$). Con respecto a los valores obtenidos con las CCP de ratas infectadas y CCP de ratas no infectadas tratadas con ionóforo de calcio A23187 a una concentración de 2.5 μM , se obtuvo un 57 y 65 % de histamina liberada no siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

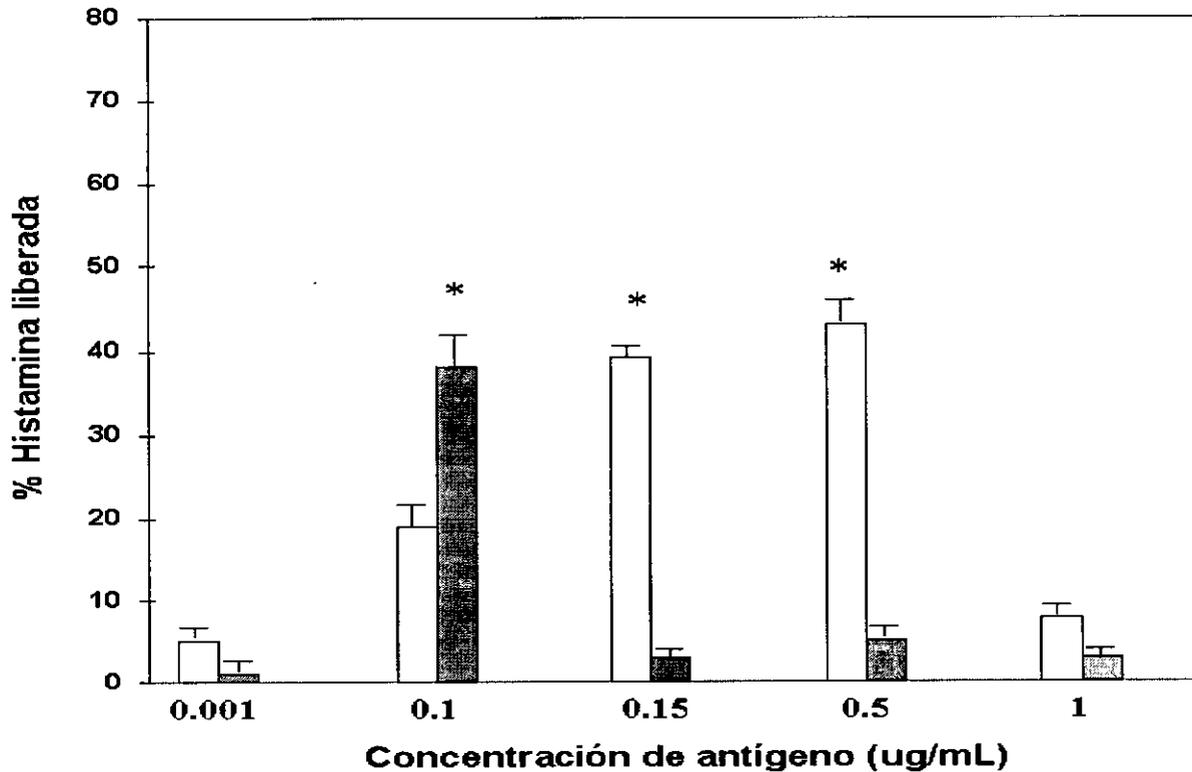


Fig. 8. Porcentaje de histamina liberada por células cebadas de peritoneo (CCP) estimuladas con el extracto total (ET) de la LM de *Trichinella spiralis*. Veinticinco mil CCP de ratas no infectadas (barra blanca) e infectadas con el parásito (barra gris) se incubaron durante 30 min a 37°C con diferentes concentraciones de ET de la LM de *T. spiralis*. Los valores de liberación espontánea de histamina obtenida de las CCP no tratadas con los antígenos se restaron y los valores absolutos se indican en la figura. El porcentaje de histamina liberada de las CCP de ratas no infectadas e infectadas con el parásito expuestas a 2.5 μM de ionóforo de calcio A23187 fué de 57% y 65% respectivamente. Los datos graficados son promedio de 2 experimentos ± desviación estándar. *Valores estadísticamente significativos (p<0.05); con respecto a los obtenidos por el otro grupo de células tratadas a la misma concentración.

Por otro lado, cuando las CCP de ratas no infectadas se estimularon con los antígenos de superficie purificados de la LM de *T. spiralis* (Fig. 9), se observó un máximo de liberación de histamina a 30 η g/ml (34 %) (barras en color blanco) siendo estadísticamente significativa ($p < 0.05$) al compararlo con los valores obtenidos con las CCP de ratas infectadas a esta misma concentración de antígeno (12 %). La máxima liberación de histamina en el caso de las CCP de ratas infectadas se obtuvo a la concentración de 10 η g/ml (35 %) (barras en color gris), siendo estadísticamente significativa ($p < 0.05$) a los valores obtenidos a la misma dosis con las CCP de ratas no infectadas. Con respecto a los valores obtenidos con las CCP de ratas no infectadas e infectadas con el parásito tratadas con el ionóforo de calcio a la concentración de 2.5 μ M se obtuvo una liberación de histamina del 55 % y 50 % respectivamente, no existiendo diferencia estadísticamente significativa.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA TOTAL EN SOBRENADANTES DE CELULAS CEBADAS DE PERITONEO ESTIMULADAS CON LOS ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE *Trichinella spiralis*

La liberación de proteasas por CCP de ratas infectadas y no infectadas con el parásito, tratadas con los antígenos de superficie purificados a las diferentes concentraciones se cuantificó con el Kit de Enzchek (Molecular Probes Inc USA) (Fig. 10). Se utilizaron para ello setenta y cinco mil CCP de ratas no infectadas (barras en color blanco) como CCP de ratas infectadas con el parásito (barras color gris) y se incubaron con los antígenos de superficie purificados por 30 min a 37°C. Los valores máximos de actividad proteolítica total liberada por las CCP de ratas no infectadas e infectadas se observaron en la concentración de 50 η g/ml de los antígenos de superficie con 131 ± 6.6 y 140 ± 7 unidades de DO respectivamente, no siendo estadísticamente significativas entre sí ($p < 0.05$). Sin embargo, los valores obtenidos a esta concentración en ambos grupos de células con respecto a las otras concentraciones usadas sí fueron estadísticamente significativos. Los resultados obtenidos con las concentraciones de 5 a 50 η g/ml, sugieren que existe una dosis-respuesta, no habiendo diferencias entre los valores obtenidos con CCP de ratas infectadas y CCP de ratas no infectadas, observándose a 100 η g/ml una disminución en los valores de actividad proteolítica liberada. Con respecto a los valores de la actividad proteolítica total presente en los sobrenadantes de CCP tratadas con 2.5 μ M del ionóforo de calcio, los valores promedio fueron de 53 y 49 unidades de DO para las CCP de ratas no infectadas y sensibilizadas respectivamente, mostrando que no hay diferencias significativas entre sí ($p < 0.05$).

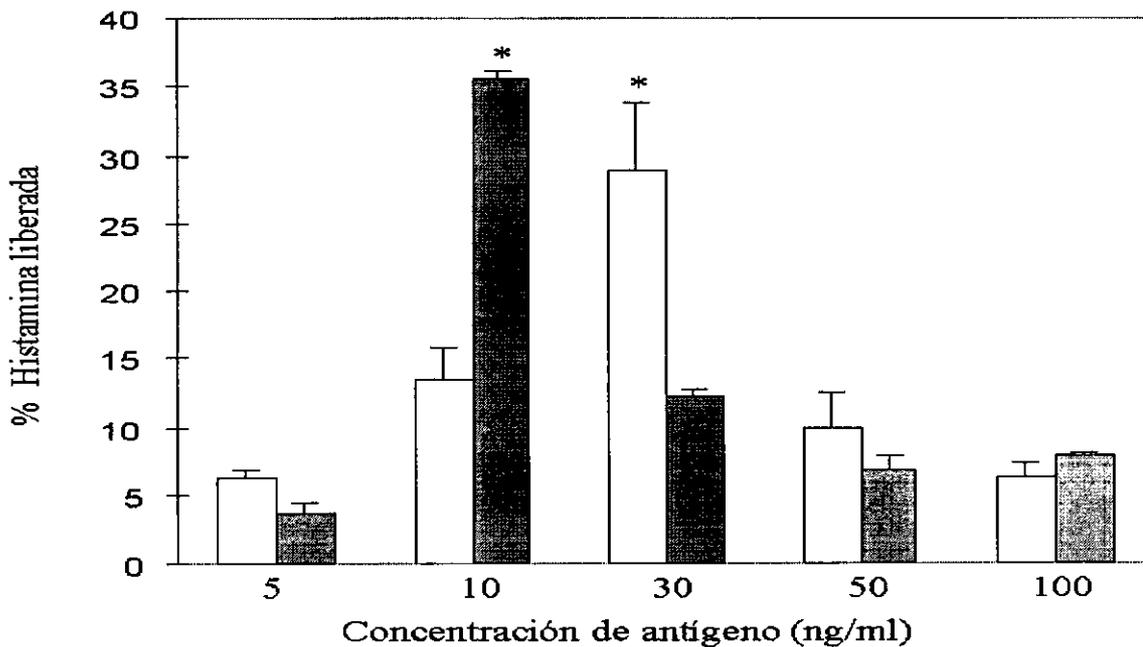


Fig. 9. Porcentaje de histamina liberada por células cebadas de peritoneo(CCP) estimuladas con los antígenos de superficie de la LM de *Trichinella spiralis*. Veinticinco mil CCP de ratas no infectadas (barra blanca) e infectadas con el parásito (barra gris) se incubaron durante 30 min a 37°C con diferentes concentraciones de los antígenos de superficie de la LM de *T. spiralis*. Los valores de liberación espontánea de histamina de las CCP no tratadas con los antígenos se restaron en cada experimento y los valores promedio resultantes se indican en la figura. El porcentaje de histamina liberada de las CCP de ratas no infectadas e infectadas con el parásito expuestas a 2.5 μ M de ionóforo de calcio A23187 fueron de 55% y 50% respectivamente. Los datos graficados son promedio de 2 experimentos \pm desviación estándar. * Valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$); con respecto a los obtenidos a esa misma concentración por el otro grupo de células, así como con respecto en cada grupo a las otras concentraciones empleadas.

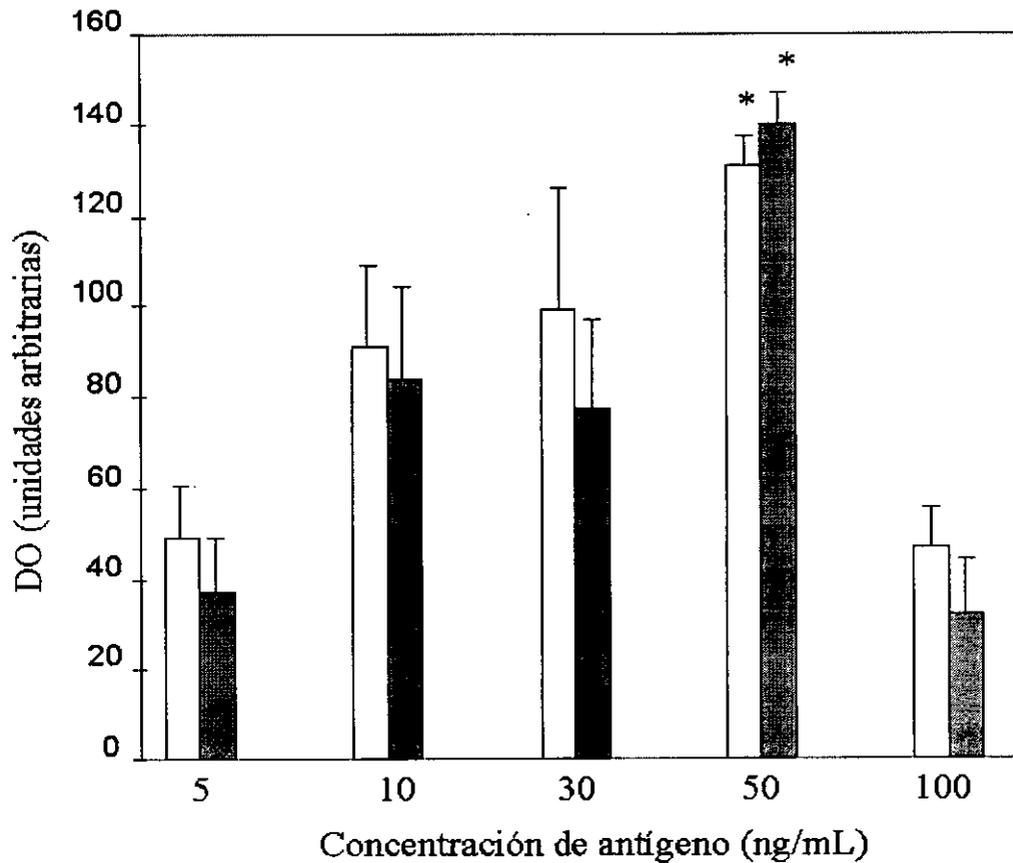


Fig. 10. Niveles de actividad proteolítica total presente en sobrenadantes de células cebadas de peritoneo (CCP) tratadas con los antígenos de superficie de la LM de *Trichinella spiralis*. Setenta y cinco mil CCP de ratas no infectadas (barra blanca) e infectadas con el parásito (barra gris) se incubaron durante 30 min a 37°C con diferentes concentraciones de los antígenos de superficie y la actividad proteolítica se evaluó en los sobrenadantes de las CCP estimuladas usando un Kit de Enzchek (Molecular Probes, Inc, USA). Los valores absolutos de los diferentes grupos señalados en la figura, se obtuvieron restando la actividad proteolítica presente en los sobrenadantes de CCP no estimuladas. La actividad proteolítica de las CCP de ratas no infectadas e infectadas con el parásito tratadas con a 2.5 μ M de ionóforo de calcio A23187 fue de 53 y 49 unidades de DO. En la gráfica se muestran los valores promedio de 4 experimentos \pm desviación estándar. *Valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$) con respecto a las demás concentraciones empleadas en cada grupo de células.

CARACTERIZACION DE LAS PROTEASAS LIBERADAS POR LAS CCP TRATADAS CON LOS ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE LA LM DE *T. spiralis*

Una vez que se evaluó la actividad proteolítica total en los sobrenadantes de las CCP tratadas con las diferentes concentraciones de los antígenos de superficie de la LM de *T. spiralis*, se procedió a caracterizar el tipo de proteasas liberadas. Considerando que la proteasa 5 y que la CPA son marcadores específicos de CCP y dado que estas proteasas son de tipo serina y metaloproteasas, se procedió a determinar la liberación específica de estos dos tipos de proteasas en los sobrenadantes de CCP estimuladas con los antígenos de superficie. Para esto, se utilizaron inhibidores específicos de proteasas tipo serina (Pefabloc) y metaloproteasas (EDTA), usando el Kit de Enzchek. En la figura 11 se observa la inhibición de la actividad de proteasas de tipo serina, la cual fue de un 92 % en ambos grupos de células probadas siendo estadísticamente significativas ($p < 0.05$), con respecto a los porcentajes de inhibición obtenidos con las concentraciones de 5 y 100 ng/ml. En relación con la liberación de metaloproteasas, el máximo porcentaje liberado fue de 15% y 13 % por las CCP de ratas infectadas y CCP de ratas no infectadas respectivamente (Fig. 12). De los resultados anteriores se observa que el principal tipo de proteasa liberada por las CCP de ratas infectadas y CCP de ratas no infectadas es del tipo serina, ya que no hubo inhibición con EDTA (figura 12).

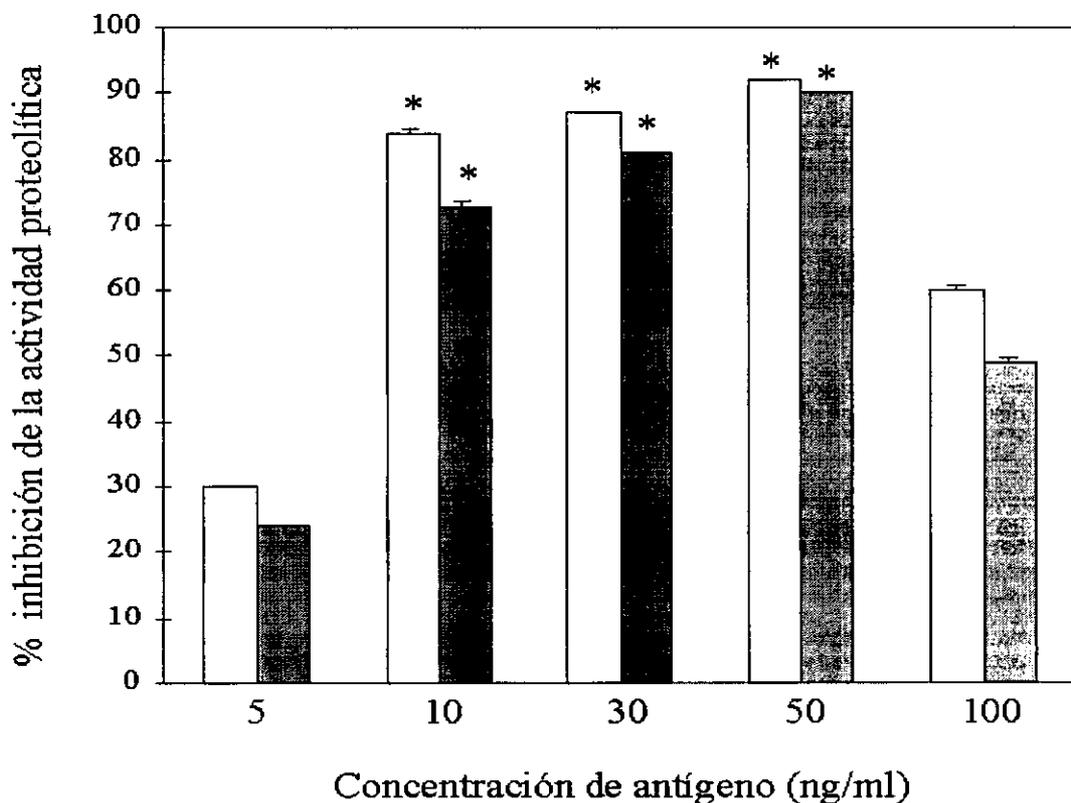


Fig 11. Porcentajes de inhibición de proteasas tipo serina presentes en sobrenadantes de células cebadas de peritoneo (CCP) tratadas con los antígenos de superficie de la LM de *Trichinella spiralis*. Setenta y cinco mil CCP de ratas no infectadas (barra blanca) e infectadas con el parásito (barra gris) se incubaron durante 30 min a 37°C con diferentes concentraciones de los antígenos de superficie. Posteriormente los sobrenadantes se trataron durante 30 min a 37°C con el inhibidor de proteasas del tipo serina (Pefabloc 2mM) usando un Kit de Enzchek (Molecular Probes, Inc, USA). Los valores absolutos de los diferentes grupos señalados en la figura se obtuvieron restando el porcentaje de inhibición presente en los sobrenadantes de las CCP no estimuladas. La actividad proteolítica de las CCP de ratas no infectadas e infectadas tratadas con a 2.5 μ M de ionóforo de calcio A23187 fue de 68% y 65% respectivamente. En la gráfica se muestran los valores promedio de 3 experimentos \pm desviación estándar. *Valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$) con respecto a los porcentajes de inhibición obtenidos con las CCP sin tratamiento.

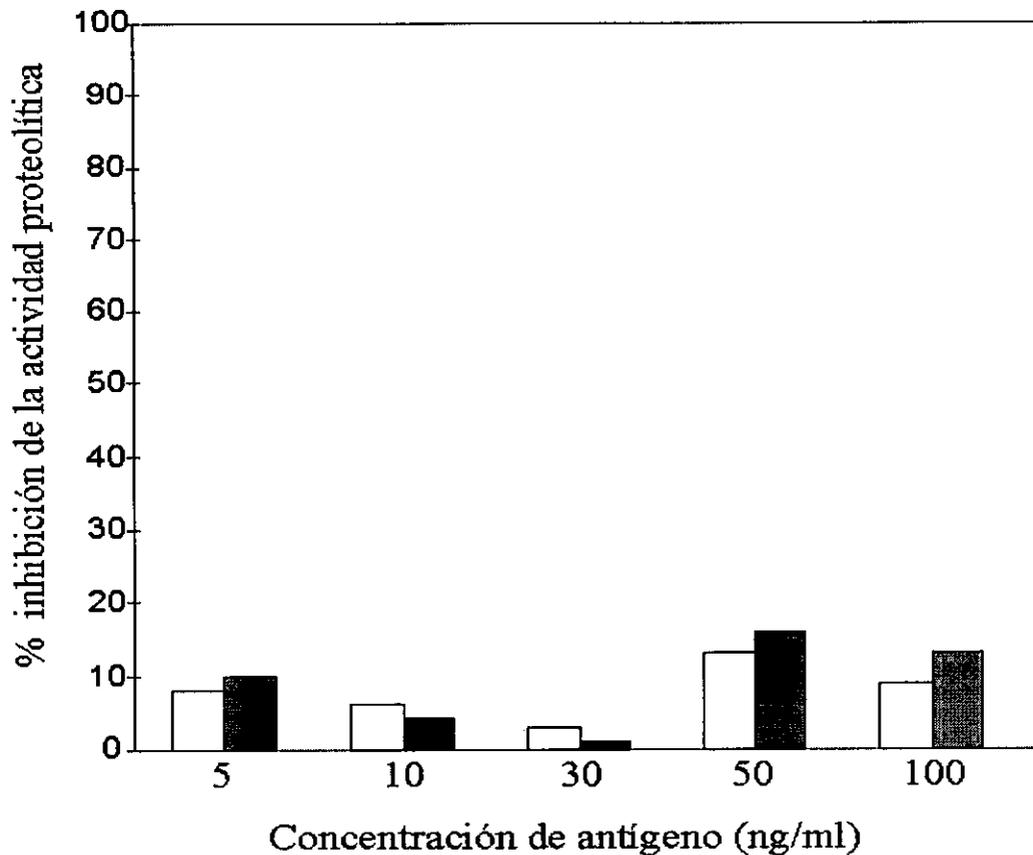


Fig. 12. Porcentajes de inhibición de metaloproteasas presentes en sobrenadantes de células cebadas de peritoneo (CCP) tratadas con los antígenos de superficie de la LM de *Trichinella spiralis*. Setenta y cinco mil CCP de ratas no infectadas (barra blanca) y sensibilizadas (barra gris) se incubaron durante 30 min a 37°C con diferentes concentraciones de los antígenos de superficie. Posteriormente los sobrenadantes se trataron durante 30 min a 37°C con el inhibidor de proteasas del tipo metalo (EDTA 10 mM) usando un Kit de Enzchek (Molecular Probes, Inc, USA). Los valores absolutos de los diferentes grupos señalados en la figura se obtuvieron restando el porcentaje de inhibición presente en los sobrenadantes de las CCP no estimuladas. La actividad proteolítica de las CCP de ratas no infectadas e infectadas con el parásito tratadas con 2.5 μ M de ionóforo de calcio A23187 fue de 5% y 9% respectivamente. En la gráfica se muestran los valores promedio de 3 experimentos \pm desviación estándar.

DETERMINACION ESPECIFICA DE PROTEASA 5 Y CARBOXIPEPTIDASA A LIBERADAS POR LAS CELULAS CEBADAS DE PERITONEO TRATADAS CON LOS ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE *Trichinella spiralis*

La liberación de proteasa 5 (P5) y carboxipeptidasa A (CPA) por CCP estimuladas con los antígenos de superficie purificados de la LM de *T. spiralis* se determinó de manera indirecta mediante un ensayo de IET de las pastillas de las CCP estimuladas empleando anticuerpos policlonales específicos contra estas dos proteasas. En el ensayo de IET para P5 se evidenció una banda ancha con peso molecular aproximado de 30 kDa (Fig. 13A). En relación con CPA se observó una banda de aproximadamente 35 kDa (Fig 13B). Posteriormente mediante un análisis densitométrico se determinó la cantidad de proteasas presente en las pastillas de las CCP estimuladas a las diferentes concentraciones de antígenos de superficie y después se hizo una inferencia de la cantidad de proteasas liberadas con respecto a la cantidad total de proteasas presente en la pastilla de CCP sin tratamiento. Los valores máximos de P5 liberada por las CCP de ratas no infectadas e infectadas con el parásito fueron de 830 y 490 unidades de DO a la concentración de 30 ng/ml siendo estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre sí, reduciéndose en ambos casos los valores obtenidos a concentraciones menores y mayores de 30 ng/ml.

Por otro lado, los valores de CPA liberada tanto por las CCP de ratas infectadas como no infectadas con el parásito fueron similares, no habiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Es importante resaltar que lo mismo sucedió con los controles positivos, CCP de ratas infectadas y no infectadas con el parásito tratadas con 2.5 μ M de ionóforo de calcio, en donde tampoco hubo diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre sí. En estos ensayos, los valores de DO de la liberación espontánea de la CPA se restó de los valores de DO obtenidos después de la estimulación de las CCP con las diferentes concentraciones de los antígenos de superficie del parásito.

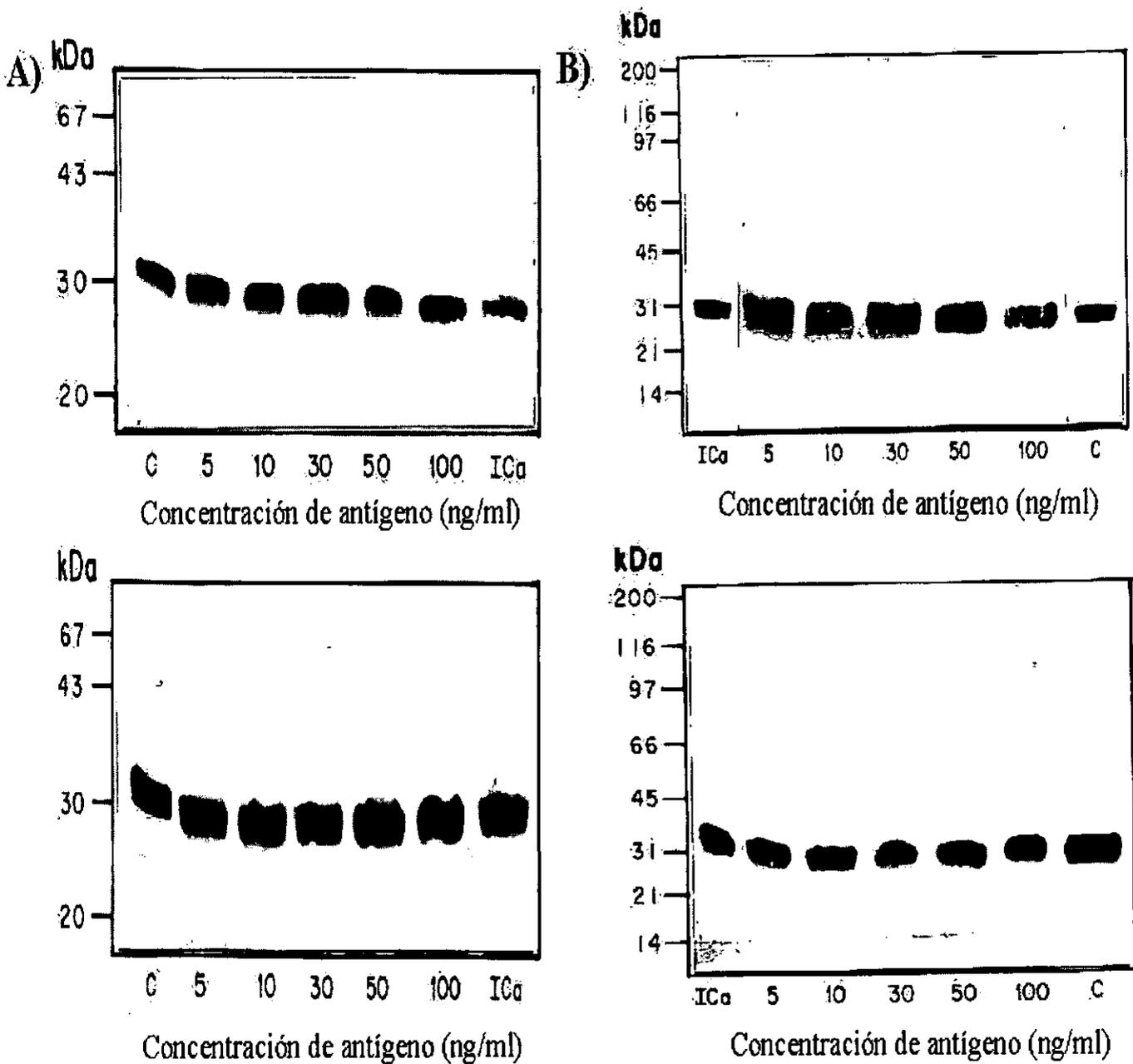


Fig 13. Análisis del reconocimiento de las proteasas P5 y CPA presentes en la pastilla de células cebadas de peritoneo tratadas con diferentes concentraciones de los antígenos de superficie de la LM de *T. spiralis*. Las pastillas de setenta y cinco mil CCP se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10 % en presencia de SDS bajo condiciones desnaturalizantes y se transfirieron a papel de nitrocelulosa (PNC). Posteriormente el PNC se reaccionó con los anticuerpos policlonales anti-P5 a una dilución 1:200 (Panel A, CCP de ratas no infectadas arriba; CCP de ratas infectadas con el parásito abajo) y anti-CPA a una dilución 1:100 (Panel B, CCP de ratas no infectadas arriba; CCP de ratas infectadas con el parásito abajo). C: CCP sin tratamiento, 5, 10, 30, 50 y 100 ng/ml del antígeno, ICa: CCP tratadas con 2.5 μ M de ionóforo de calcio.

CUANTIFICACION DE TNF α LIBERADO POR LAS CELULAS CEBADAS DE PERITONEO TRATADAS CON LOS ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE *Trichinella spiralis*

Los valores promedio de TNF α liberado por CCP estimuladas con diferentes concentraciones de los antígenos de superficie de la LM de *T. spiralis* se muestran en la figura 14. Las CCP de ratas no infectadas (barras en color blanco) liberaron 48 pg/ml de TNF α a partir de 1 ng/ml de los antígenos de superficie, alcanzando la máxima liberación (437 pg/ml) con la concentración de 50 ng/ml, mostrando un respuesta de tipo dosis-respuesta. En el caso de CCP de ratas infectadas, aún a concentraciones bajas de 1 ng/ml se obtuvieron 239 pg/ml de TNF α liberado, aumentando ligeramente conforme la concentración se incrementó, sin embargo la máxima liberación se obtuvo a 100 ng/ml (424 pg/ml). El análisis estadístico reveló que en el caso de las CCP de ratas infectadas no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los valores de TNF α liberado a las concentraciones de antígeno de 1 a 50 ng/ml, pero sí entre éstas y el valor obtenido con 100 ng/ml (424 pg/ml). Con respecto a los resultados obtenidos con CCP de ratas no infectadas existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los valores de TNF α liberados a las diferentes concentraciones de antígeno. Como control positivo se analizaron CCP de ratas no infectadas e infectadas con el parásito, estimuladas con el lipopolisácarido de *E. coli* serotipo 055:B5 a una concentración de 40 UE/ml, obteniéndose 478 y 444 pg/ml de TNF α liberado respectivamente, en este caso no hay diferencias significativas ($p < 0.05$) entre sí.

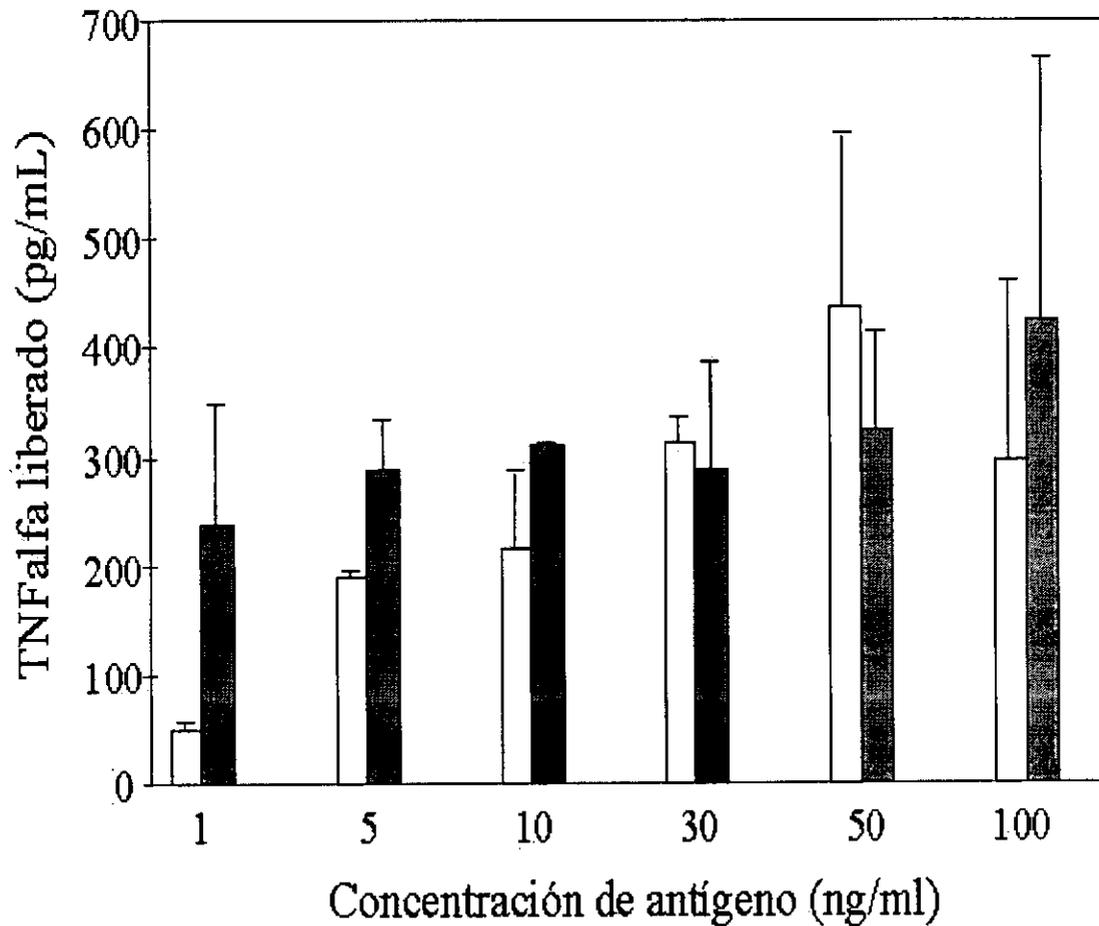


Fig. 14. TNF α liberado por células cebadas de peritoneo (CCP) tratadas con los antígenos de superficie de la LM de *Trichinella spiralis*. Un millón de CCP de ratas no infectadas (barra blanca) e infectadas con el parásito (barra gris) se incubaron durante 8 h a 37°C con diferentes concentraciones de los antígenos de superficie de la LM de *T. spiralis*. Los niveles de TNF α presentes en los sobrenadantes de las CCP estimuladas con los antígenos de superficie se determinaron por medio de un ensayo inmunoenzimático como se describe en materiales y métodos. Los valores de liberación espontánea de las CCP no tratadas con los antígenos de superficie se restaron y los valores absolutos se indican en la figura. Los valores de TNF α liberada de CCP de ratas no infectadas e infectadas con el parásito tratadas con 40 UE/ml de lipopolisacárido fue de 478 y 444 pg/ml respectivamente. En la gráfica se muestran los valores promedio de 2 experimentos \pm desviación estándar.

DISCUSION

Algunas de las funciones biológicas de las CC como la fagocitosis, procesamiento de antígeno, producción de citocinas y liberación de sustancias vasoactivas, aunados a su localización anatómica, han sido consideradas por diferentes investigadores para evidenciar la participación de las CC en una respuesta de inmunidad innata contra parásitos y bacterias (Nutman 1993; Echtenacher y Hültner 1996; Mécheri y David 1997). Actualmente existen evidencias que demuestran la activación directa de CC por antígenos presentes en las fimbrias de bacterias gram negativas así como por parásitos del género *Leishmania*, en ambos casos dicha activación conlleva a la liberación de $\text{TNF}\alpha$ y el reclutamiento de neutrófilos que en el caso de *E. coli* resulta de gran importancia para la eliminación del microorganismo.

Sin embargo, la importancia de la participación de las CC en la respuesta inmune innata en contra de parásitos helmintos, se puede manifestar no sólo en el hecho de una expulsión rápida, como es el caso de *T. spiralis*, sino en el contexto de la respuesta inmune que regula la eliminación de la infección. Así, se ha observado generalmente que una respuesta mediada por células Th_2 , en la que predomina la síntesis de anticuerpos IgE, favorece la eliminación de parásitos, mientras que en infecciones virales, predomina una respuesta de tipo citotóxico, con la participación y proliferación de células Th_1 . De ahí que la capacidad de las CC para activarse directamente y de forma temprana por antígenos de *T. spiralis*, permita sugerir que estas células pueden ser un elemento clave en el control de la respuesta inmune adquirida, al liberar interleucinas reguladoras de las poblaciones de células T cooperadoras.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las CC se pueden activar directamente por antígenos purificados del parásito helminto liberando mediadores proinflamatorios, sugiriendo su participación en la respuesta inmune innata contra *T. spiralis* posiblemente durante la fase temprana del proceso de expulsión del organismo adulto. Es posible que ocurra la participación de las CC en el proceso de exclusión inmune que forma parte del proceso de expulsión, al estimularse directamente por dichos antígenos parasitarios, sin la participación de IgE. La activación directa de las CC por antígenos de *T. spiralis* es evidente en los resultados de los ensayos de activación de CCP de ratas infectadas y CCP de ratas no infectadas tratadas inicialmente con el ET de la LM de *T. spiralis*, donde se muestran porcentajes de liberación de histamina similares (38 y 45 % respectivamente). Es notable, sin embargo que existe una diferencia en cuanto a la dosis requerida para estimular al máximo a las 2 poblaciones de CCP, siendo necesaria en el caso de las células sensibilizadas una concentración de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ mientras que para las CCP de ratas no infectadas de 0.5 $\mu\text{g/ml}$. Algo similar sucedió cuando se emplearon los antígenos de superficie purificados de la LM de *T. spiralis*, obteniéndose la máxima liberación de histamina para las CC sensibilizadas (35 %) con 10 ng/ml y con las CC CCP de ratas no infectadas (29%) con 30 ng/ml. Esto sugiere que aunque la activación de CC por antígenos de *T. spiralis* puede ocurrir en ambos casos, siempre es más eficiente la liberación en células sensibilizadas, probablemente porque la activación clásica a través de los receptores de

IgE sea más eficiente que a través de un receptor diferente. Un aspecto importante de mencionar es que el porcentaje de histamina liberada varió entre diferentes experimentos realizados. Sin embargo, el patrón de liberación mostrado fue similar, encontrándose un comportamiento característico de liberación de histamina por las CC tratadas con el ET y con los antígenos de superficie de la LM de *T. spiralis*. Las diferencias observadas entre experimentos puede tener su explicación en el hecho de que existen variaciones en la cantidad de histamina/célula y de serotonina/célula en PMC, ya que cada célula evaluada individualmente tiene diferente cantidad de histamina y serotonina en sus gránulos. Además, la cantidad secretada por las CC estimuladas puede variar dependiendo del tipo de estímulo (Pihel y cols. 1995).

Debido a que en los antígenos de superficie se obtuvo estimulación de las CCP semejante a la obtenida en el ET y considerando que los antígenos de superficie purificados están mejor caracterizados y contenían un menor número de componentes (4 a 5 moléculas), se realizaron ensayos de estimulación utilizando únicamente estos antígenos de superficie purificados. El utilizar estos antígenos nos permitió tener una idea más cercana de cual o cuales pudieran ser las moléculas responsables de la estimulación de las CC. No obstante, en los productos de excreción-secreción y en el ET de la LM de *T. spiralis* puede existir también una gran gama de moléculas que podrían tener una participación importante en los mecanismos de expulsión del parásito (Wakelin y Denham, 1983).

En vista de que los antígenos de superficie de la LM de *T. spiralis* fueron capaces de estimular directamente a las CC, es posible imaginar que moléculas liberadas por las CC así activadas inducen cambios en el microambiente intestinal. En el caso de histamina, ésta participa en el control de la secreción gástrica y propicia además la participación de otras células inflamatorias así también puede intervenir en el control local del flujo sanguíneo, promoviendo que los tejidos cercanos tengan los vasos más dilatados y por consiguiente un mayor flujo sanguíneo y permeabilidad capilar, permitiendo que otras moléculas proteicas se distribuyan entre el plasma y los espacios intestinales. Este proceso inflamatorio incrementa la filtración de otras células que también son estimuladas para liberar mediadores de respuesta inflamatoria, lo que conduce a un incremento en la peristalsis y como consecuencia final a la expulsión de los parásitos. En este sentido, es importante observar que los valores de histamina liberada por las CC estimuladas con 10 y 30 ng/ml de los antígenos de superficie utilizados en este trabajo, son considerablemente elevados con respecto a las CC sin tratamiento, sugiriéndose un papel importante de las CC activadas directamente en el proceso inflamatorio que se observa durante el proceso de expulsión.

La presencia de proteasas en el microambiente intestinal es importante en la respuesta inmune para eliminar agentes infecciosos, ya que estas moléculas participan activamente en la eliminación de parásitos y bacterias (Murray y cols. 1968; Malaviya y cols. 1996). Particularmente en nuestro modelo de activación de CC con antígenos de superficie de la LM de *T. spiralis*, se observó la liberación de una cantidad importante de proteasas, particularmente del tipo serina. Este tipo de

proteasas puede causar daño en tejido, modulando la actividad de colagenasas y otros sistemas de reparación tisular (Whitaker-Menezes y cols., 1995). Por otro lado, podrían participar en la alteración de la fecundidad de las hembras o afectando componentes de la cutícula de los parásitos al nivel de colágena tipo IV (McKean y Pritchard, 1989).

En nuestro modelo se puso de manifiesto que en los sobrenadantes de las CCP de ratas infectadas como CCP de ratas no infectadas fue escasa la presencia de metaloproteasas, las cuales participan como las proteasas tipo serina, en la modificación secuencial de proteínas presentes en los sitios de degranulación de las CC (Schwartz y cols., 1982). La razón de una liberación específica de serina y no de metaloproteasas se desconoce. Sin embargo, probablemente existan vías de liberación independientes para cada proteasa.

También se detectó la presencia de las proteasas específicas proteasa 5 (P5) y carboxipeptidasa A (CPA), en los sobrenadantes de las CC expuestas a los antígenos de *T. spiralis*. En relación a los niveles de CPA liberada por las CCP estimuladas con los antígenos de superficie, se observó una liberación constante de esta proteasa, no importando que los sobrenadantes fueran de CCP de ratas infectadas o CCP de ratas no infectadas. Asimismo, los niveles de liberación de CPA fueron por debajo de los observados para P5, lo cual correlaciona con los niveles de proteasas observados cuando se emplearon inhibidores de serina y metaloproteasas.

La presencia de bandas anchas de proteasas identificadas en el ensayo de IET, puede ser debida que los múltiples pesos moleculares de la P5 (28 a 30 kDa) son el resultado de la glicosilación diferencial del producto de un mismo gene, como lo han reportado Befus y cols. (1995). En ensayos *in vitro* se demostró que esta glicosilación diferencial influencia la actividad enzimática de la proteasa, pero se desconoce si esto sucede en la célula ó durante los fenómenos de almacenamiento o secreción. Hasta el momento no se conocen los factores ontogénicos y microambientales que regulan la expresión de las proteasas de CC en ratas, sin embargo, existe evidencia de estudios en ratones que sugiere que las citocinas podrían estar involucradas en la acción de transducción de señales (Caughey y cols. 1993; Ghildyal y cols. 1992). Así, se sabe que la IL-3 aumenta la expresión de la P5 y que la IL-9 influye en la expresión de las proteasas 1 y 2, mientras que la IL-3 disminuye la capacidad de IL-9 para inducir la expresión de estas proteasas (Eklund y cols. 1993).

Es importante notar que la máxima liberación de P5 por parte de las CCP de ratas no infectadas ocurrió a la misma concentración de antígeno (30 ng/ml) a la cual se obtuvieron los máximos porcentajes de histamina liberada.

Resulta, además interesante mencionar que en las CCP de ratas no infectadas se liberó una mayor cantidad de P5 en comparación con las CCP de ratas infectadas, sugiriendo que la señal transmitida a través de un mecanismo independiente de IgE resultó más efectiva para inducir la liberación de P5. Sin embargo, la cantidad de CPA liberada fue menor en ambos grupos de células. Asimismo, es interesante observar que el ionóforo de calcio no indujo liberación de CPA, lo cual sugiere que la liberación de CPA no es mediada por calcio.

Se tiene conocimiento de que las CCP expresan constitutivamente niveles de TNF α (890 fg/célula), la cual puede ser aumentada por mecanismos dependientes e independientes de IgE, produciendo niveles altos del ARNm para TNF α (Gordon y Galli 1990). Estas observaciones muestran a las CC como una fuente importante de TNF α preformado e inmunológicamente inducible y sugiere que la liberación de esta molécula por las CC puede contribuir a la defensa del hospedero así como a la patofisiología de diferentes enfermedades alérgicas. Por lo que en el contexto de la infección por *T. spiralis*, es posible que el TNF α liberado por CC participe de manera importante en la inducción de un proceso inflamatorio que promueve a su vez otros mecanismos que ayuden a controlar la infección.

En este estudio también se analizó la liberación de TNF α preformado y sintetizado *de novo*. Así, se analizó la liberación de TNF α inducida por los antígenos de *T. spiralis* a los 30 min y a las 8 h posteriores a la exposición de los antígenos del parásito. A los 30 min de incubación con los antígenos del parásito se observó muy poca cantidad de TNF α en los sobrenadantes de CC (resultados no mostrados), indicando que el TNF α que es liberado a corto plazo (almacenado), probablemente este participando en mecanismos de citotoxicidad en el microambiente. Por otro lado, el TNF α sintetizado *de novo* fue mayor, lo cual sugiere que esta molécula puede actuar a nivel local influenciando la expulsión de los parásitos e impidiendo el establecimiento de los mismos en el hospedero infectado. La síntesis *de novo* de TNF α podría evidenciarse mejor al evaluar la síntesis del ARNm, ya sea por ensayos tipo "Northern blot" o RT-PCR. Los resultados muestran que en el caso de la liberación de TNF α por las CCP de ratas normales se presenta una respuesta dosis dependiente, aunque cabe mencionar que conforme las concentraciones aumentaron, la desviación estándar también aumentó, por lo que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones usadas. En el modelo de estimulación de CCP con antígenos de superficie de la LM de *T. spiralis* es muy importante tener en consideración que las CCP son aisladas sin factores de crecimiento y que además, sufren de un "stress" severo durante el proceso de extracción del peritoneo del animal y posteriormente durante la separación en los gradientes de percoll para su purificación. En el presente trabajo se utilizaron a las CCP obtenidas de varias ratas, con la finalidad de obtener suficientes células y además para reducir la variación en la liberación espontánea. Esto puede explicar las desviaciones estándar obtenidas durante el desarrollo del presente trabajo. Sin embargo, para controlar estos cambios, diferentes a la acción de los antígenos de *T. spiralis*, solamente se utilizaron las CCP que presentaban más del 95 % de viabilidad, y muy bajo nivel de liberación espontánea de histamina y TNF α .

Como puede observarse, los mecanismos de liberación para TNF α parecen ser distintos a aquellos implicados con la liberación de histamina. Esto podría ser explicado en términos de las concentraciones usadas, las cuales están entre los 10 a 50 ng/ml de los antígenos de superficie de la LM de *T. spiralis*. Por otro lado, parece que existen diferentes mecanismos de liberación para cada una de las moléculas evaluadas en este trabajo, sugiriendo que cada molécula tiene

su propio mecanismo de liberación y la cascada de transducción de señales para la liberación de las diferentes moléculas implicadas puede tener vías de inicio independientes. En este sentido es importante mencionar que toda la maquinaria de citoesqueleto en las CC estimuladas podría tener un papel muy importante en cuanto al proceso de la estimulación que conduce finalmente a la liberación de diferentes mediadores, que pudieran participar en un momento dado como estimuladores o reguladores de la respuesta inmune innata o adquirida. En este sentido, la alteración en el citoesqueleto causado por la influencia de los antígenos del parásito podría modificar la capacidad de las CC para secretar histamina y otras moléculas.

Es importante mencionar que los resultados obtenidos en este estudio muestran por primera vez que puede ocurrir la activación de CCP por antígenos de superficie de la LM de *T. spiralis* independientemente de IgE. Recientemente, ha sido demostrada la participación de las CC en la respuesta inmune innata contra bacterias y parásitos protozoarios (Malaviya y cols., 1996; Bidri y cols., 1997). También se ha mostrado la participación de las CC durante el proceso de expulsión del adulto de *T. spiralis*, en animales "knock out" para la cadena γ del Fc ϵ RI que han sido infectados con el parásito, observándose mastocitosis y liberación de proteasas (Grencis, 1997). Este modelo animal aporta evidencias a la participación de CC independientemente de IgE en el proceso de expulsión del parásito.

El mecanismo por el cual estos antígenos estimulan de manera directa a las CCP requiere ser estudiado y entre los aspectos de interés está determinar si en las CC existe un receptor específico para la tivelosa, la cuál parece ser una molécula común que se encuentra presente en cantidades elevadas en los antígenos de superficie usados en este estudio. Además, la caracterización del receptor para estas moléculas requiere ser estudiado, así como los mecanismos de transducción que se llevan a cabo durante la estimulación de las CCP.

Si bien hay activación de CC y liberación de mediadores inducida por antígenos de superficie purificados de *T. spiralis* sería importante analizar si los niveles de la síntesis de interleucinas, tipo Th₂ es también modulado por dichos antígenos. De suceder lo anterior, esto apoyaría la sugerencia hecha por Romagnani (1992), en el sentido de la participación de CC en la inducción temprana de una respuesta del tipo Th₂, cuando ocurren infecciones por helmintos intestinales.

De esta forma en el caso de *T. spiralis*, la activación de CC mediante un mecanismo independiente de IgE podría inducir una respuesta inmune innata en contra del parásito, pero también podría regular los mecanismos inmunes que finalmente determinan el curso de la infección.

Considerando lo antes mencionado, es de interés realizar estudios empleando modelos animales, posiblemente ratones "knock out" para la cadena γ del Fc ϵ R que permitan determinar en detalle la participación de los antígenos de superficie de la LM de *T. spiralis* en el proceso de eliminación del organismo adulto a través de la estimulación de CC y obtener CC de estos animales para comprobar que hay activación por estos antígenos mediante un mecanismo independiente de IgE.

CONCLUSIONES

- 1) El extracto total de la larva muscular de *T. spiralis* estimuló la liberación de histamina de CCP de ratas infectadas y CCP de ratas no infectadas.
- 2) Los antígenos de superficie purificados de la larva muscular de *T. spiralis* son mejores inductores de activación de las CCP, particularmente de las CCP de ratas infectadas.
- 3) Los antígenos de superficie de la larva muscular de *T. spiralis* estimulan la liberación de histamina, proteasa 5, carboxipeptidasa A y TNF α de CCP de ratas infectadas y CCP de ratas no infectadas.
- 4) Los antígenos de superficie de la larva muscular de *T. spiralis* pueden inducir la activación de CCP mediante un mecanismo independiente de IgE.
- 5) Los niveles de liberación de histamina, proteasas específicas y TNF α de CCP de ratas no infectadas fueron similares a los obtenidos con las CCP de ratas infectadas, sugiriendo rutas alternas de activación de CC por la liberación de estos mediadores pro-inflamatorios.
- 6) Los antígenos de superficie de la larva muscular de *T. spiralis* inducen principalmente la liberación de proteinasa 5 y en menor cantidad de carboxipeptidasa A.
- 7) La activación de las células cebadas por un mecanismo independiente de IgE puede tener un papel muy importante en la respuesta innata inicial contra el adulto de *T. spiralis* pero también en la regulación del mecanismo inmune que finalmente determina el curso de la infección.

REFERENCIAS

- Ahmad A., Wang C.H. and Bell R.G. (1991) A role for IgE in Intestinal Immunity. Expression of rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in rats transfused with IgE and thoracic duct lymphocytes. *J. Immunol.* 146(10):3563
- Alizadeh H. and Murrell K.D. (1984) The intestinal mast cell response to *Trichinella spiralis* infection in mast cell deficient *W/W^v* mice. *J. Parasitol.* 70:767
- Almond N. M., Parkhouse R. M. E., Chapa-Ruiz M. R. and García Ortigoza E. (1986) The response of humans to surface and secreted antigens of *Trichinella spiralis*. *Trop. Med. Parasitol.* 37:381
- Appleton J. A. and McGregor D. D. (1984) Rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in suckling rats. *Science* 226: 70
- Appleton J. A. and McGregor D. D. (1987) Characterization of the immune mediator of rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in suckling rats. *Immunol.* 62:477
- Appleton J. A., Schain L. R. and McGregor D. D. (1988) Rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in suckling rats: mediation by monoclonal antibodies. *Immunol.* 65:487
- Appleton J.A., Bell R.G., Homan W. and van Knapen F. (1991) Consensus on *Trichinella spiralis* antigens and antibodies. *Parasitol. Today* 7(8):190
- Arizono N., Koreto O., Nakao S., Iwai Y., Kushima R. and Takaoka O. (1987) Phenotypic changes in mast cells proliferating in the rat lung following infection with *Nippostrongylus brasiliensis*. *Virchows Arch.* B.54:1
- Arizono N., Kasugai T., Yamada M., Okada M., Morimoto M., Tei H., Newlands G. F., Miller H. R. and Kitamura Y. (1993) Infection of *Nippostrongylus brasiliensis* induces development of mucosal-type but not connective tissue-type mast cells in genetically mast cell deficient *W^s/W^s* rats. *Blood* 81:2572
- Arock M., Zuany-Amorim C., Singer M., Benhamou M. and Pretolani M. (1996) Interleukin-10 inhibits cytokine generation from mast cells. *Eur. J. Immunol.* 26:166
- Arriaga C., Muñoz E., Morilla A. and Ortega-Pierres G. (1989) *Trichinella spiralis*: Recognition of muscle larvae antigens during experimental infection of swine and its potential use in diagnosis. *Exp. Parasitol.* 69:363
- Askenase P. W. (1977) Immune inflammatory responses to parasites: the role of basophils, mast cells and vasoactive amines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26: 96
- Banovac K., Banovac F., Yang J. and Koren E. (1993) Interaction of osteoblast with extracellular matrix: effect of mast cell chymase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 203:221
- Befus D. and Bienenstock J. (1982) Factors involved in symbiosis and host resistance at the mucosa-parasite interface. *Prog. Allergy* 31:76
- Befus A.D., Bienenstock J. and Denburg J.A. (1986) Mast cell differentiation and heterogeneity. Raven Press, New York. pp.426
- Befus A.D., Dyck N., Goodacre R. and Bienenstock J. (1987) Mast cells from the human intestinal lamina propria. Isolation, histochemical subtypes, and functional characterization. *J. Immunol.* 138:2604

- Befus A. D. (1994) Inflammation: mast cells. In Handbook of mucosal Immunology. (P.L. Ogra, J. Mestecky, M. E. Lamm, W. Strober, J. R. McGhee and J. Bienenstock, eds.) Academic Press, USA.
- Befus A. D., Chin B., Pick J., Evans S., Osborn S and Forstrom J. (1995) Proteinases of rat mast cells. Peritoneal but not intestinal mast cells express mast cell proteinase 5 and carboxypeptidase A. *J. Immunol.* 155:4406
- Bell R. G. and McGregor D.D. (1979) *Trichinella spiralis*: role of different cycle phase in induction, maintenance and expression of rapid expulsion in rats. *Exp. Parasitol.* 48:51
- Bell R. G., McGregor D. D. and Despommier D. D. (1979) *Trichinella spiralis* mediation of the intestinal component of protective immunity in the rat by multiple phase specific, antiparasitic response. *Expl. Parasit.* 47:140
- Bell R.G., McGregor D.D. and Adams L.S. (1982) Studies on the inhibition of rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in rats. *Int Arch. Allergy Appl. Immunol.* 69:73
- Bell R. G., Korenaga M. and Wang C. H. (1987) Characterization of a cell population on thoracic duct lymph that adoptively transfers rejection of adult *Trichinella spiralis* to normal rats. *Immunol.* 61: 221
- Bidri M., Vouldoukis I., Mossalayi M. S., Debré P., Guillosso J. J., Mazier D. and Arock M. (1997) Evidence for direct interaction between mast cells and *Leishmania parasites*. *Parasite Immunol.* 19:475
- Bissonnette E. Y., Chin B. and Befus A. D. (1995) Isolation and characterization of rat intestinal mucosal mast cells. In *Methods of Gastrointestinal Pharmacology: A handbook.* (T. S. Gaginella, ed.) CRC Press, USA.
- Bissonnette E. Y., Enciso J. A. and Befus A. D. (1996) Inhibitory effects of sulfasalazine and its metabolites on mediator release from mast cells. *J. Immunol.* 156:218
- Brandtzaeg P. (1985) Research in gastrointestinal Immunology: State of the art. *Scand. J. Gastroenterol.*, 20(114):137
- Brandtzaeg P., Valnes K., Scott H., Rognum T. O., Bjerke K. and Baklien K. (1985) The human gastrointestinal secretory immune system in health and disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 20 (114):17
- Brown M. A., Pierce J. H., Watson C. J., Falco J., Ihle J. N. and Paul W. E. (1987) B cell stimulatory factor-1/interleukin-4 mRNA is expressed by normal and transformed mast cells. *Cell* 50:809
- Bunnett N. W., Goldstein S. M. and Nakazato P. (1992) Isolation of a neuropeptide-degrading carboxypeptidase from the human stomach. *Gastroenterol.*102:76
- Burd P. R., Rogers H. W., Gordon J. R. (1989) Interleukin 3-dependent and -independent mast cells stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines. *J. Exp. Med.* 170: 245
- Campbell W. C., Hartman R. K. and Cuckler A. C. (1963) Induction of immunity to Trichinosis in mice by means of chemically abbreviated infections. *Exp. Parasitol.* 14:29
- Carlisle M. S., McGregor D. D. and Appleton J. A. (1990) The role of mucus in antibody-mediated rapid expulsion of *Trichinella spiralis* suckling rats. *Immunol.* 70:126
- Carlisle M. S., McGregor D. D. and Appleton J. A. (1991) Intestinal mucus entrapment of *Trichinella spiralis* larvae induced by specific antibodies. *Immunol.* 74:546

LIBRARY RESERVING SALE
DE LA BIBLIOTECA

- Chung S. W., Wong P. M. C., Shen-Ong G., Russeti S., Ishizaka T. and Eaves C. J. (1986) Production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by Albenson virus-induces tumorigenic mast cells lines. *Blood* 68:1074
- Ciacci C., Mahida Y. R., Dignass A., Koizumi M. and Podolsky D. K. (1993) Functional interleukin-2 receptors on intestinal epithelial cell. *J. Clin. Invest.* 92:527
- Coffman R. L., Seymour B. W. P., Hudak S., Jackson J. and Rennick D. (1989) Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* 245:308
- Dennis, D. T., Despommier D. D. and Davis N. (1970) Infectivity of the new born larvae of *Trichinella spiralis* in the rat. *J. Parasit.* 56:974
- Despommier D. D. (1998) How does *Trichinella spiralis* make itself at home? *Parasitol Today* 14(8):318
- Dutoit E., Tronchin G., Vernes A. and Biguet J. (1979) The influence of prostaglandins and vasoactive amines on the intestinal phase of experimental trichinellosis in CBA mice and Wistar rats. *Annal Parasitol. Humaine et Comparee* 554:465
- Echtenacher B., Mannel D. N. and Hultner L. (1996) Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 381: 75
- Enciso J. A., Bissonnette E. Y. and Befus A. D. (1996) Regulation of mRNA levels of TNF-alpha and the alpha chain of the high-affinity receptor for IgE in mast cells by IFN-gamma and alpha/beta. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 110:114
- Eklund K. K., Ghildyal N., Austen K. F. and Stevens R. L. (1993) Induction by IL-9 and supression by IL-3 and IL-4 of the levels of chromosome 14-derived transcripts that encode late expressed mouse mast cell proteases. *J. Immunol.* 151:4266
- Ellis L. A., Iglesias R., Ubeira F. M. (1994) Glycans as targets for monoclonal antibodies that protect rats against *Trichinella spiralis*. *Glycobiol.* 4:585
- Else K. J., Hultner L. and Grecis R. K. (1992) Cellular immune responses to the nematode parasite *Trichuris muris*. II. Differential induction of Th cell subsets in resistant versus susceptible mice. *Immunol.* 75:232
- Enerback L. (1966) Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 1. Effect of fixation. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 66:289
- Enerback L. (1986) Mast cell heterogeneity: the evolution of the concept of a specific mucosal mast cell. En: *Mast cell differentiation and heterogeneity* (A. D. Befus, J. Bienenstock, J. A. Denburg eds.): Raven Press, New York.
- Faulkner H., Humphreys N., Renauld J. C., van Snick J. and Grecis R. (1997) Interleukin-9 is involved in host protective immunity to intestinal nematode infection. *Eur. J. Immunol.* 27:2536
- Friend D. S., Ghildyal N., Austen K. F., Gurish M. F., Matsumoto R. and Stevens R. L. (1996) Mast cells that reside at different locations in the jejunum of mice infected with *Trichinella spiralis* exhibit sequential changes in their granule ultrastructure and chymase phenotype. *J. Cell Biol.* 135(1):279
- Galli S. J., Dvorak A. M., Marcum J. A., Ishizaka T., Nabel G., Der Simonian H., Pyne K., Goldin J. M. Rosenberg R. D., Cantoe H. and Dvorak H. F. (1982) Mast cell clones: a model for the analysis of cellular maturation. *J. Cell Biol.* 95:435
- Galli S.J. (1990) New insights into "the riddle of the mast cells": Microenviromental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab. Invest.* 62:5
- Galli S. J., Zsebo K. M. and Geissler E. N. (1994) The kit ligand, stem cell factor. *Adv. Immunol.* 55:1

- Gamble H. R. and Graham C. E. (1984) Monoclonal antibody-purified antigen for the immunodiagnosis of trichinosis. *Am. J. Vet. Res.* 45(1):67
- Ghildyal N., Friend D. S., Nicodemus G. F., Austen K. F. and Stevens R. L. (1993) Reversible expression of mouse mast cell protease 2 mRNA and protein in cultured mast cells exposed to IL-10. *J. Immunol.* 151:3206
- Gómez Dantés O. and Khoshnood B. (1991) La evolución de la salud internacional en el siglo XX. *Salud Pública Méx.*; 33:314
- Gordon J. R. and Galli S. J. (1990) Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- α /cachectine. *Nature* 346: 274
- Goven A. J. (1979) The phospholipase B content of the intestines of infected with varied larvae doses of *Nippostrongylus brasiliensis*. *Int. J. Parasitol.* 9:345
- Goven A. J. (1983) Effect of anti-eosinophil serum on phospholipase B activity in mice infested with *Trichinella spiralis*. *J. Parasitol.* 69:88
- Grancis R. K., Hultner L. and Else K. J. (1991) Host protective immunity to *Trichinella spiralis* in mice: activation of Th cell subsets and lymphokine secretion in mice expressing different response phenotypes. *Immunol.* 74:329
- Grancis R. K. (1997) Th₂-mediated host protective immunity to intestinal nematode infections. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 352:1377
- Gupta A. A., Leal-Berumen I., Croitoru K. and Marshall J. S. (1996) Rat peritoneal mast cells produce IFN- γ following IL-12 treatment but not in response to IgE-mediated activation. *J. Immunol.* 157:2123
- Gurish M. F., Ghildyal N. and Arm J. (1991) Cytokine mRNAs are preferentially increased relative to secretory granule protein mRNA in mouse bone marrow-derived mast cells that have undergone IgE-mediated activation and degranulation. *J. Immunol.* 146:1527
- Gurish M. F., Nadeau J. H., Johnson K. R., McNeil H. P., Grattan K. M., Austen K. F. and Stevens R. L. (1993) A closely linked complex of mouse mast cell-specific chymase genes on chromosome 14. *J. Biol. Chem.* 268:11372
- Haig D. M., McMennamin C., Jarrett E. E. E. (1986) En: Mast cell development in the rat. In mast cell differentiation and heterogeneity, (Befus A. D., Bienenstock J., Denburg J. A. eds.) New York, Raven Press.
- Huang R., Blom T. and Hellman L. (1991) Cloning and structural analysis of MMCP-1, MMCP-4 and MMCP-5, three mouse mast cell-specific serine proteases. *Eur. J. Immunol.* 21:1611
- Humphries R. K. (1988) Activation of multiple hemopoietic growth factor genes in Abelson virus-transformed myeloid cells *Exp. Hematol.* 16:774
- Huntley J.F., Gooden C., Newlands G.F.J., Mackellar A., Lammas D.A., Wakein D., Tuohy M., Woodbury R.G. and Miller H. P. R. (1990) Distribution of intestinal mast cell proteinase in blood and tissues of normal and *Trichinella spiralis* infected mice. *Parasite. Immunol.* 12:85
- Ishikawa N., Wakelin D. and Mahida Y. R. (1997) Role of T helper 2 cells in intestinal goblet cell hyperplasia in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Gastroenterol.* 113:542
- Jarvis L. M. and Pritchard D. J. (1992) An evaluation of the role of carbohydrate epitopes in immunity to *Trichinella spiralis* *Parasite Immunol.* 14:489

- Jarret W. F. H., Jarret E. E. E., Miller H. R. P. and Urquhart G. M. (1968) Quantitative studies on the mechanism of self cure in *Nippostrongylus brasiliensis* infections. En: Reaction of Host to Parasitism, (Soulsby. E. L. ed.) Academic Press, Inc., New York
- Jarrett E.E.E. and Miller H. R. P. (1982) Production and activities of IgE in helminth infection. *Prog. Allergy* 31:178
- Kajita T. and Hugli T. E. (1991) Evidence for *in vitro* degradation of C3a anaphylatoxin by mast cell chymase: I. Nonspecific activation of rat peritoneal mast cells by C3a_{des Arg} *Am. J. Pathol.* 138:1359
- Kanakura Y., Thompson H., Nakano T., Yamamura T., Asai H., Kitamura Y., Metcalfe D. D. and Galli S. J. (1988) Multiple bidirectional alterations of phenotype and changes in proliferative potential during the *in vitro* and *in vivo* passage of clonal mast cell populations derived from mouse peritoneal mast cells. *Blood* 72: 877
- Kay A. B. (1985) Eosinophils: role in asthma, allergy and parasite immunity. *N. Engl. Reg. Allergy Proc.* 6:341
- King, S.J. and Miller, H.R.P. (1984) Anaphylatic release of mucosal mast cell protease and its relationship to gut permeability in *Nippostrongylus*-primed rats. *Immunol.* 51:653
- King C. L. and Nutman T. B. (1992) Biological role of helper T-cell subsets in helminth infections. *Chem. Immunol. Basel, Karger* 54:136
- Kitamura Y., Nakayama H. and Fujita J. (1989) Mechanism of mast cell deficiency in mutant mice of *W/W^v* and *S1/S1^d* genotype. En: Mast cell and basophil differentiation and function in health and disease. (Galli S. J., Austen K. F. eds) Raven Press, New York
- Korenaga M., Wang C. H., Bell R. G., Zhu D. and Ahmad A. (1989) Intestinal immunity to *Trichinella spiralis* is a property of OX8-OX22- T-helper cells that are generated in the intestine. *Immunol.* 66:588
- Krco, C. J., David, C. S. and Wassom, D. L. (1982) Characterization of an *in vitro* proliferation response to solubilized *Trichinella spiralis* antigens: role of Ia antigens and Ly-1⁺ T cells. *Cell Immunol.* 68:359
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680
- Lagunoff D., Richard A. and Marquardt C. (1991) Rat mast cell tryptase. *Arch. Biochem. Biophys.* 219: 52
- Lamas D. A., Wakelin D., Mitchell L. A., Tuohy M, Else K. J. and Grecis R. K. (1992) Genetic influences upon eosinophilia and resistance in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Parasitol.* 105:117
- Larsh J. E., Ottolenghi A. and Weatherly N. F. (1974) *Trichinella spiralis*: Phospholipase in challenged mice and rats. *Exp. Parasitol.* 36:299
- Lee G. B. and Ogilvie B. M. (1981) The mucus layer in intestinal nematode infections. En: The mucosal immune system in health and disease. (Ogra, P. L. and Bienenstock J. eds) Proceedings of the 81st Ross Conference on Pediatric Research, Ross Laboratories, Columbus, Ohio.
- Lee T. D. G. and Wakelin D. (1982) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 67:302
- Lee T. D. J., Shanahan F., Miller H. R. P. Bienenstock J. and Befus D. (1985) Intestinal mucosal mast cells: Isolation from rat lamina propria and purification using unit gravity velocity sedimentation. *Immunol.* 55:721

Lin T. J. and Befus A. D. (1997) Mast cells and eosinophils in mucosal defenses and pathogenesis. En: Mucosal Immunology Second edition (Pearay L. Ogra, Jiri Mestecky, Michael E. Lamm, Warren Strober, Jerry R. McGhee and John Bienenstock., eds) Academic Press, San Diego.

Ljungstrom I., Hammarstrom L., Kociecka W. and Smith C.I.E. (1988) The sequential appearance of IgG subclasses and IgE during the course of *Trichinella spiralis* infection. Clin. Exper. Immunol. 74:230

Lloyd S. and Soulsby E. J. L. (1987) Immunobiology of gastrointestinal nematodes in ruminants. En: Immune responses in parasitic infections: Immunology, immunopathology and immunoprophylaxis. Vol. 1 (edited by Soulsby E. J. L.) CRC Press. Boca Raton.

Lohi J., Harvima I. and Keski-Oja J. (1992) Pericellular substrates of human mast cell tryptase: 72,000 dalton gelatinase and fibronectin. J. Cell. Biochem. 50:337

Love R.J., Ogilvie B.M. and McLaren D.J. (1976) The immune mechanisms that expell the intestinal stage of *Trichinella spiralis* from rats. Immunol. 30:7

Lowry O. N., Rosenbrauh N. J., Al Farr A. L., and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the folin-phenol reagent. J. Biochem. 193:265

Maizels R. M., Bundy D. A. P., Selkirk M. E., Smith D. F. and Anderson R. M. (1993) Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. Nature 365: 797

Mahida Y. R., Ciacci C. and Podolsky D. K. (1992) Peptide growth factors: role in epithelial-lamina propria cell interactions. Ann NY Acad Sci 664:148

Malaviya R., Ross E. A., MacGregor J. I., Ikeda T., Little J. R., Jakschik B. A. and Abraham S. N. (1994) Mast cells phagocytosis of FimH-expressing enterobacteria. J. Immunol. 152:1907

Malaviya R., Ikeda T., Ross E. and Abraham S. N. (1996) Mast cells molulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- α . Nature 381: 77

Marshall J. S., Leal-Berumen I., Nielsen L., Gilbetic M. and Jordana M. (1996) Interleukin (IL)-10 inhibits long-term IL-6 production but not preformed mediator release from rat peritoneal mast cells. J. Clin. Invest. 97:1122

McKean P.G. and Pritchard D. I. (1989) The action of a mast cell protease on the cuticular collagens of *Necator americanus*. Parasite Immunol. 11:293

McLaren D. J. (1980) *Schistosoma mansoni*: The parasite surface in relation to host immunity. (En: Brown, K.N. ed.) Tropical Medicine Research Studies Series of Monographs, vol. I. Chichester, John Wiley.

McLaren D. J., Ortega-Pierres G. and Parkhouse R. M. E. (1987) *Trichinella spiralis*: immunocytochemical localization of surface and intracellular antigens using monoclonal antibodies probes. Parasitol. 6:167

McVay C. S., Tsung A. and Appleton J. (1998) Participation of parasite surface glycoproteins in antibody-mediated protection of epithelial cells against *Trichinella spiralis*. Infec. and Immunity 66(5):1941

Mécheri S. and David B. (1997) Unravelling the mast cells dilemma: culprit or victim of its generosity? Immunol.Today 18(5):212

Miller H. R., Huntley J. F. and Wallace G. R. (1981) Immune exclusion and mucus trapping during the rapid expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* from primed rats. Immunol. 44:419

- Miller H. R. P. and Huntley J. F. (1982) Protection against nematodes by intestinal mucus. *Ad. Exp. Med. and Biol.* 144: 243
- Miller H. R. P., Woodbury R. G., Huntley J. F. and Newlands G. F. J. (1983) Systemic release of mucosal mast cells protease in primed rats challenged with *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunol.* 49:471
- Miller H. R. (1984) The protective mucosal response against gastrointestinal nematodes in ruminants and laboratory animals. *Vet. Immunol. Immunopathol* 6:167
- Miller, H.P.R. (1990) Distribution of intestinal mast cell proteinase in blood and tissues of normal and *Trichinella spiralis* infected mice. *Parasite Immunol.* 12:85
- Miller H. R. P. (1992) Mast cells: their function and heterogeneity. (En: Moqbel R. ed.) *Allergy and immunity to helminths. Common mechanisms or divergent pathways?* London: Taylor and Francis.
- Mizutani H., Schechter N., Lazarus G., Black R. A. and Kupper T. S. (1991) Rapid and specific conversion of precursor interleukin 1 β (IL-1 β) to an active IL-1 species by human mast cells chymase. *J. Exp. Med.* 174:821
- Moqbel R. (1980) Histopathological changes in rats following primary, secondary and repeated infections with *Strongyloides ratti*, with special reference to tissue eosinophils. *Parasite Immunol.* 2:11
- Moqbell R., Wakelin D., MacDonald A. J., King S. J., Grecis R. K. and Kay A. B. (1987) Release of leukotrienes during rapid expulsion of *Trichinella spiralis* from immune rats. *Immunol.* 60:425
- Mosmann T. R. (1994) Properties and functions of interleukin-10. *Adv. Immunol.* 56:1
- Mossman T.R.H., Cherwinski M.W., Bond M.W., Giedlin M.A. and Coffman, R.L. (1986) Two types of murine helper T cell clone. 1. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136:2348
- Murray, M., Miller, H.R.P. and Jarret, W.F.H. (1968) The globule leukocyte and its derivation from the subepithelial mast cell. *Lab. Invest.* 19(2):22
- Murray M. (1972) Immediate hypersensitivity effector mechanisms. II. *In vivo* reactions. En: *Immunity to animal parasites.* (Soulssy E. J. L. ed.) Academic Press, New York.
- Murrell K. D. (1985) Strategies for the control of human trichinosis transmitted by pork. *Food Technol.* 39(3):65 y 110
- Murrell K. D. F., Stringfellow J. B., Dame D. A., Leiby D. A. and Schad G. A. (1987) *Trichinella spiralis* in an agricultural ecosystem. 11. Evidence for natural transmission of *Trichinella spiralis spiralis* from domestic swine to wildlife. *J. Parasitol.* 73(1):103
- Nakahata T., Tsuji K., Tanaka R., Muraoka K., Okumura N., Sawai N., Takagi M., Itoh S., Ra. C. and Saito H. (1995) Synergy of stem cell factor and other cytokines in mast cell development. En: *Biological and Molecular Aspects of Mast Cells and Basophil Differentiation and Function* (Y. Kitamura, S. Yamamoto, S. J. Galli and K. F. Austen eds) Raven Press, New York.
- Natsuaki M., Stewart C. B., Vanderslice P., Schwartz L. B., Wintroub B. U., Rutter W. J. and Goldstein S. M. (1992) Human skin mast cell carboxypeptidase: functional characterization, cDNA cloning and genealogy. *J. Invest. Dermatol.* 99:138
- Nawa Y. and Miller H. R. P. (1979) Adoptive transfer of intestinal mast cell response in rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. *Cellular Immunol.* 42:225

- Negrao-Corréa D., Adams L. S. and Bell R. G. (1996) Intestinal transport and catabolism of IgE: a major blood-independent pathway of IgE dissemination during a *Trichinella spiralis* infection of rats. *J. Immunol.* 157(9):4037
- Newlands G. F. J., Miller H. R. P., MacKellar A. and Galli S. J. (1995) Stem cell factor contributes to intestinal mucosal mast cell hyperplasia in rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis* or *Trichinella spiralis*, but anti-stem cell factor treatment decreases parasite egg production during *N. brasiliensis* infection. *Blood* 86(5):1968
- Nutman T. B. (1993) Mast cells and their role in parasitic helminth infection. En: *The mast cell in health and disease* (M. A. Kaliner and D. D. Metcalfe eds.) New York Dekker.
- Oku Y., Itayama H. and Kamiya M. (1984) Expulsion of *Trichinella spiralis* from the intestine of *W/W^v* mice reconstituted with haemopoietic and lymphopoietic cells and the origin of mucosal mast cells. *Immunol.* 53:337
- Organización Mundial de la Salud. Prevención y control de infecciones parasitarias intestinales. Ginebra: OMS, 1987.
- Ortega-Pierres G., Chayen A., Clark N. W. and Parkhouse R. M. (1984) The occurrence of antibodies to hidden and exposed determinants of surface antigens of *Trichinella spiralis*. *Parasitol.* 88:359
- Ortega-Pierres, G., Muñiz, E., Coral-Vázquez, R. and Parkhouse, R.M.E. (1989) Protection against *Trichinella spiralis* induced by purified stage-specific surface antigens of infective larvae. *Parasitol. Res.* 75:563
- Parkhouse R. M. E., M. Phillip and Ogilvie B. M. (1981) Characterization of surface antigens of *Trichinella spiralis* infective larvae. *Parasite Immunol.* 3:339
- Parkhouse R. M. E. (1984) Immunopurification. *Res. Med. Bulletin* 40(3):297
- Parmentier H. K., de Vries C., Ruitenbergh E. J. and van Loveren H. (1987) Involvement of serotonin in intestinal mastocytosis and inflammation during a *Trichinella spiralis* infection in mice. *Int. Arch. Allergy Appl Immunol.* 83:31
- Pihel K., Hsieh S., Jorgenson J. W. and Wightman R. M. (1995) Electrochemical detection of histamine and 5-hydroxytryptamine at isolated mast cells. *Anal. Chem.* 67:4514
- Phillipp, M., Parkhouse R.M.E, and Ogilvie B.M. (1980) Changing Proteins on the surface of a parasitic nematode. *Nature* 287:538
- Plaut M, Pierce J. H., Watson C. J., Hanley-Hyde J., Nordan R. P. and Paul W. E. (1989) Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of FcεRI or to calcium ionophores. *Nature* 339:64
- Pond L., Wassom D. L. and Hayes C. E. (1992) Influence of resistant and susceptible genotype, IL-1, and lymphoid organ on *Trichinella spiralis*-induced cytokine secretion. *J. Immunol.* 149:957
- Ramaswamy K., Goodman R. E. and Bell R. (1994) Cytokine profile of protective anti- *Trichinella spiralis* CD4⁺OX22⁻ and non-protective CD4⁺X22⁺ thoracic duct cells in rats: secretion of IL-4 alone does not determine protective capacity *Parasite Immunol.* 16:435
- Ramaswamy K., Negrao-Corréa D. and Bell R. (1996) Local intestinal immune responses to infection with *Trichinella spiralis* *J. Immunol.* 156:4328
- Rennick D. M., Lee F. D., and Yokota T. (1985) A cloned MCGF cDNA encodes a multilineage hematopoietic growth factor with multiple activities of interleukin 3. *J. Immunol.* 134:910

- Reynolds D. S., Stevens R. L., Gurley D. S., Lane W. S., Austen K. F. and Serafin W. E. (1989) Isolation and molecular cloning of mast cell carboxypeptidase A. A novel member of the carboxypeptidase gene family. *J. Biol. Chem.* 264:20094
- Reynolds D. S., Stevens R. L., Lane W. S., Carr M. H., Austen K. F. and Serafin W. E. (1990) Different mouse mast cell populations express various combinations of at least six distinct mast cell serine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3230
- Riedlinger J., Grecnis R.K. and Wakelin, D. (1986) Antigen specific T cell lines transfer protective immunity against *Trichinella spiralis* "in vivo". *Immunol.* 58:57
- Robinson M, Krco C. J, Beito T. G. and David C. S. (1991) Genetic control of the immune response to *Trichinella spiralis*: recognition of muscle larval antigens. *Parasite Immunol.* 13(4):391
- Rodewald H. R., Dessing M., Dvorak A. M. and Galli S. J. (1996) Identification of a committed precursor for the mast cell lineage. *Science* 271: 818
- Romagnani, S. (1992) Induction of Th₁ and Th₂ responses: a key role for a "natural" immune response?. *Immunol. Today*, 13(10):379
- Rothwell T. L. W., Love R. J. and Evans D. P. (1978) Studies on the role of histamine and 5-hydroxytryptamine in immunity against the nematode *Trichostrongylus colubriformis*. IV. Inhibition of the expulsion of worms transplanted into the duodenum of immune guinea pigs. *Int. Arch. of Allergy and Appl. Immunol.* 56:457
- Rottem M. and Metcalf D. D. (1995) Development and maturation of mast cells and basophils. En: *Asthma and Rhinitis* (W. W. Busse and S. T. Holgate eds.) Blackwell Scientific Publications Inc. Boston.
- Ruoss S. J., Hartmann T. and Caughey G. H. (1991) Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 88:493
- Russel D. A. and Castro G. A. (1979) Physiological characterization of a biphasic immune response to *Trichinella spiralis* in the rat. *J. Infect. Dis.* 139:304
- Salinas-Tobón M. R., Méndez-Loredo B., Valdés-Cruz C. and Chapa-Ruiz M. R. (1996) Class and subclass specific antibody responses to TSL-1 antigens during *Trichinella spiralis* human infection: En: *Proceedings of the 9th International Conference on Trichinellosis*. México, City.
- Santamarina M.T., Leiro J., Garrido M.J., Sanmartin M., Duran L. and Ubeira, F.M. (1988) The effect of the intestinal worms and migrating L1 larvae of *Trichinella spiralis* on the production of antiparasitic IgE antibodies. *Parasitol. Research*, 74:581
- Schwartz L. B., Riedel C., Schratz J. J. and Austen K. F. (1982) Localization of carboxypeptidase A to the macromolecular heparin proteoglycan-protein complex in secretory granules of rat mast cells. *J. Immunol.* 128(3):1128
- Sekizawa K., Caughey G. H., Lazarus S. C., Gold W. M. and Nadel J. A. (1989) Mast cell tryptase causes airway smooth muscle hyperresponsiveness in dogs. *J. Clin. Invest.* 83:175
- Shaw R. J., Cromwell O. and Kay A. B. (1984) Preferential generation of leukotriene C₄ by human eosinophils. *Clin. Exp. Immunol.* 56:716
- Shaw R. J., Walsh G. M., Cromwell O. Moqbel R., Spry C. J. F. and Kay A. B. (1985) Activated human eosinophils generate SRS-A leukotrienes following IgG-dependent stimulation. *Nature* 316:150
- Silberstein D.S. (1983) En: *Trichinella and Trichinosis* (Campbell WC ed.) Plenum Press. NewYork.

- Siraganian R. P. (1974) An automated continuous-flow system for the extraction and fluorometric analysis of histamine. *Anal. Biochem.* 57:383
- Sommerhoff C. P., Caughey G. H., Finkbeiner W. E., Lazarus S. C., Basbaum C. B. and Nadel J. A. (1989) Mast cell chymase. A potent secretagogue for airway gland serous cells. *J. Immunol.* 142: 2450
- Spry C. J. F. (1985) Synthesis and secretion of eosinophil granule substances. *Immunol. Today* 6: 332
- Stewart G. (1983) Pathophysiology of the muscle phase. En: *Trichinella and Trichinosis* (W. C. Campbell ed) Plenum Press, New York.
- 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. Microscopy*, 40:136
- Tam E. K. and Caughey G. H. (1990) Degradation of airway neuropeptides by human lung tryptase. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 3: 27
- Taveme J. (1994) Transgenic mice and the study of cytokine function in infection. *Parasitol. Today* 10:258
- Thompson-Snipes L., Dhar V., Bond M. V., Mosmann T. R., Moore K. W. and Rennick D. M. (1991) Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J. Exp. Med.* 173:507
- Towbin H., Staehelin and L. Gordon (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceed. of the Nat. Acad. Sc. USA*
- Tuohy M., Lammas D. A., Wakelin D., Huntley J. F., Newlands G. F. J. and Miller H. R. P. (1990) Functional correlations between mucosal mast cell activity and immunity to *Trichinella spiralis* in high and low responder mice. *Parasite Immunol.* 12:675
- Uber C. L., Roth R. L. and Levy D. A. (1980) *Nature* 287:226
- Urban J. F., Madden K. M., Svetic A., Cheever A., Trotta P. P., Gause W. C., Katona I. M. and Finkelman F. D. (1992) The importance of Th₂ cytokines in protective immunity to nematodes. *Immunol. Rev.* 127:204
- Wakelin D. (1978) Immunity to intestinal parasites. *Nature* 273:617
- Wakelin D. and Denham D. (1983) The immune response. En: *Trichinella and Trichinosis*, (WC Campbell ed.) New York: Plenum Press.
- Wakelin D. (1993) *Trichinella spiralis*: Immunity, ecology and evolution. *J. Parasitol.* 79(4):488
- Wang C. H. M., Korenaga M., Greenwood A. and Bell R. G. (1990) T helper subset function in the gut of rats: differential stimulation of eosinophils, mucosal mast cells and antibody forming cells by OX⁻ OX22⁻ and OX8-OX22⁺ cells. *Immunol.* 71:166
- Warren K. (1990) An integrated system for the control of the major human helminth parasites. *Acta Leidensia*; 59 (1-2): 433
- Watanabe N., Katakura K., Kobayashi A., Okumura K. and Ovary Z. (1988) Protective immunity and eosinophilia in IgE-deficient SJA19 mice infected with *Nippostrongylus brasiliensis* and *Trichinella spiralis*. *Proceedings of the National Academic of Science, USA*, 85:4460
- Weller P. F., Lee C. W., Foster D. W., Corey E. J., Austen K. F. and Lewis R. A. (1984) Generation and metabolism of 5-lipoxygenase pathway leukotrienes by human eosinophils: predominant production of leukotriene C₄. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:7626

- Whitaker-Menezes D., Schechter N. M. and Murphy G. F. (1995) Serine proteinases are regionally segregated within mast cell granules. *Lab Inv.* 72(1):34
- Wisnewski N., McNeil M., Grieve R. B. and Wassom D. L. (1993) Characterization of novel fucosyl containing glycoconjugates from *Trichinella spiralis* muscle stage larvae. *Mol. and Bioch. Parasitol.* 61:25
- Woodbury R. G., Katunuma N., Kobayashi K., Titani K. and Neurath H. (1978) Covalent structure of a group-specific protease from rat small intestine *Biochem.* 17: 811
- Woodbury R.G., Miller H. R. P., Huntley J. F., Newlands G. F. J., Palliser A. C. and Wakelin D. (1984) Mucosal mast cells are functionally active during spontaneous expulsion of intestinal nematode infections in rats. *Nature* 312:450
- Wypij D. M., Nichols J. S., Novak P. J., Stacy D. L. Berman J. and Wiseman J. S. (1992) Role of mast cell chymase in the extracellular processing of big-endothelin-1 to endothelin-1 in the perfused rat lung. *Biochem. Pharmacol.* 43:845
- Yépez-Mulia L., Arriaga, C., Peña M. A., Gual F. and Ortega-Pierres M. G. (1996) Serologic survey of trichinellosis in wild mammals kept in a Mexico City Zoo. *Vet. Parasitol* 67:237
- Young J. D. E., Liu C. C., Butler G., Cohn Z. A. and Galli S. J. (1987) Identification, purification and characterization of a mast cell-associated cytolytic factor related to tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:9175
- Zhang S. and Castro G. A. (1990) Involvement of type I hypersensitivity in rapid rejection of *Trichinella spiralis* from adult rats. *Int. Arch. Allergy Appl Immunol.* 93:272
- Zhi-Qing H., Naoko Z. and Tadakatsu S. (1996) Down-regulation by IL-4 and up-regulation by IFN- γ of mast cell induction from mouse spleen cells. *J. Immunol.* 156:3925
- Zhu D. and Bell R. G. (1990) Genetic analysis of the relationship between interleukin production and worm rejection in *Trichinella spiralis*-infected inbred mice. *J. Parasitol.* 76(5):703