

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**ANALISIS DE LOS MECANISMOS DE ACTIVACION DE LAS CELULAS CEBADAS POR
ANTIGENOS ESPECIFICOS DE *Trichinella spiralis***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

PRESENTA

M. EN C. NARCY GUADALUPE ARIZMENDI PUGA

COMITÉ TUTORAL:

DRA. LILIAN YEPEZ MULIA (TUTORA)
DRA PATRICIA TATO ZALDIVAR
DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

MEXICO D. F., 9 JUNIO DE 2006



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.

ABREVIATURAS

AHT	amortiguador Hepes Tyrode
ASB	albúmina sérica bovina
CC	células cebadas
CCTC	células cebadas de tejido conectivo
CCMI	células cebadas de mucosa intestinal
CCP	células cebadas de peritoneo de rata
DO	densidad óptica
E/S	antígenos de excreción/secreción
Eq/mL	parásitos equivalentes/mililitro
ER	expulsión rápida
FcεRI	receptor para la fracción cristalizable de la IgE
FC-GM	factor estimulador del crecimiento gránulocito macrófago
HRMC	células cebadas con fenotipo de mucosa intestinal
HRF	factor liberador de histamina
IFN γ	interferon gamma
IMCP	proteasa de mucosa intestinal de murino
kDa	kilo Daltones
KL	ligando de c-kit
LM	larva muscular
LRN	larva recién nacida
LT	leucotrienos
MFI	intensidad de fluorescencia media
mMCP	proteasas tipo serina de ratón
PAR	receptores activados por proteasas
PG	prostaglandinas
RANTES	proteína regulada y secretada por células T activadas
RMCP	proteasas de células cebadas de mucosa intestinal de rata
RR	rojo de rutenio
RT-PCR	transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa
SCF	factor estimulador de células cebadas
S1/S1 ^d	ratones deficientes en el ligando de c-kit
SDS-PAGE	geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
TA	temperatura ambiente
TCTP	proteínas tumorales controladas transduccionalmente
Th	células T cooperadoras
TNF α	factor de necrosis tumoral alfa
UE	unidades equivalentes
W/W ^v	ratones deficientes en el receptor c-kit en células cebadas

	Página
INDICE	3
RESUMEN EN ESPAÑOL	5
RESUMEN EN INGLES	6
 ANTECEDENTES	
Parásitos en salud pública	7
Triquinelosis.....	8
Respuesta inmune contra <i>Trichinella spiralis</i>	11
Proceso de expulsión de <i>T. spiralis</i>	14
Origen y distribución de las células cebadas.....	22
Biología de las células cebadas.....	23
Participación de las células cebadas en la respuesta inmune innata y adquirida.....	26
Moléculas activadoras de CC (secretagogos).....	31
 JUSTIFICACION	 34
 HIPOTESIS	 36
 OBJETIVO GENERAL	 36
 OBJETIVOS PARTICULARES	 36
 MATERIALES Y METODOS	
Infección experimental con <i>Trichinella spiralis</i>	37
Infección experimental con <i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	37
Obtención del extracto total de la LM de <i>T. spiralis</i>	38
Purificación de los antígenos TSL-1 de la LM de <i>T. spiralis</i>	39
Determinación de la concentración de proteínas en los antígenos TSL-1.....	40
Electroforesis en geles de poliácridamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).....	41
Detección de endotoxina en los antígenos TSL-1.....	42
Aislamiento y purificación de células cebadas de peritoneo de rata (CCP).....	43
Estimulación de CCP.....	44
Análisis de la activación de CCP tratadas con diferentes secretagogos empleando la incorporación de rojo de rutenio.....	45
Cuantificación de histamina liberada	46
Cuantificación de β -hexosaminidasa liberada.....	47
Cinética de secreción de histamina inducida por los antígenos TSL-1 y los diferentes secretagogos.....	47
Efecto de la toxina de <i>Bordetella pertussis</i> en la liberación de histamina por CCP estimuladas con los antígenos TSL-1.....	48
Efecto de la neuraminidasa V en la liberación de histamina por CCP estimuladas con los antígenos TSL-1	48
Análisis del estallido respiratorio en CC activadas con los antígenos TSL-1.....	49
Movilización de calcio intracelular mediante la estimulación de CCP por los antígenos TSL-1.....	50
Análisis estadístico.....	51
 RESULTADOS	
Análisis electroforético de los antígenos TSL-1.....	52
Cuantificación de endotoxina presente en los antígenos TSL-1.....	53
Aislamiento y purificación de células cebadas de peritoneo de rata.....	53
Estimulación de CCP por antígenos TSL-1 e incorporación de rojo de rutenio.....	53
Cuantificación de histamina y β -hexosaminidasa liberada por CCP estimuladas con los antígenos TSL-1.....	55
Cinética de secreción de histamina por CCP.....	61
	Página
Modulación de la secreción de histamina por el tratamiento de las CCP	

con la toxina de <i>Bordetella pertussis</i> y neuraminidasa V.....	63
Evaluación del estallido respiratorio por las CCP expuestas a los antígenos TSL-1.....	66
Movilización de calcio intracelular.....	68
DISCUSION	71
CONCLUSIONES	77
REFERENCIAS	78
APENDICE	94

RESUMEN

Las células cebadas (CC) participan en la inducción de cambios fisiológicos en el intestino de animales infectados con *Trichinella spiralis*, así como en la expulsión del organismo adulto del parásito. Actualmente se tiene conocimiento que el neuropéptido, sustancia P, así como los antígenos TSL-1 están presentes durante la infección con *T. spiralis* y ambas moléculas activan de manera directa a las CC, induciendo la secreción de histamina y otras moléculas inflamatorias. El interés de este estudio fué analizar si la activación de las CC de peritoneo de rata no sensibilizada, inducida por los antígenos TSL-1, comparte características con la activación inducida por la sustancia P u otros secretagogos. Así, se determinó que los antígenos TSL-1 indujeron la máxima liberación de histamina ($30 \pm 5.3 \%$, $n=13$) a una concentración de 30 ng/mL, observándose una cinética de liberación de histamina similar a la de la sustancia P, obteniéndose 94 y 100 % de liberación máxima de histamina a los 10 segundos. La secreción de histamina por los antígenos TSL-1 se inhibió con la toxina de *Bordetella pertussis* y con neuraminidasa V; siendo estas características similares a las presentes en la secreción de histamina inducida por la sustancia P. Sin embargo, a diferencia del ionóforo de calcio A23187, los antígenos TSL-1 no indujeron la liberación de β -hexosaminidasa, ni actividad de la NADPH oxidasa por las CC. Además, en la secreción de histamina inducida por los antígenos TSL-1 no se indujeron cambios intracelulares detectables en Ca^{2+} , a diferencia de lo observado con el compuesto 48/80. En general, se puede concluir que la secreción de histamina comparte ciertas características con el secretagogo, sustancia P (rápida secreción de histamina, participación de proteínas G y de residuos de ácido siálico). Sin embargo, esta secreción no requiere de estallido respiratorio ni flujo de calcio intracelular, sugiriendo un nuevo mecanismo de activación de las CC por los antígenos TSL-1. Por otro lado, los resultados obtenidos sugieren la secreción diferencial de histamina y β -hexosaminidasa.

RESUMEN EN INGLES

Mast cells hyperplasia and activation are prominent features in *Trichinella spiralis* infection. Recently, it was shown that TSL-1 antigens from *T. spiralis* muscle larvae induce IL-4 and TNF release by unsensitized, normal mast cells (MC) involving an Ig-independent mechanism. In this study, we characterized histamine secretion induced by TSL-1 antigens from normal, unsensitized rat peritoneal MC. Maximum histamine secretion (30 ± 5.3 % SEM, n=13) was achieved with 30 ng/mL TSL-1 antigens. However, TSL-1 did not induce an increase in β -hexosaminidase release or NADPH oxidase activity by MC. Interestingly, histamine secretion by TSL-1 was completed at 10 sec, and was inhibited by both *Bordetella pertussis* toxin and neuraminidase V, characteristics similar to those involved in substance P-induced histamine secretion. However, in contrast to substance P, TSL-1 induced histamine secretion in the absence of detectable changes in intracellular Ca^{2+} . Our data indicate differential secretion of histamine and β -hexosaminidase of MC induced TSL-1 antigens.

ANTECEDENTES

PARASITOS EN SALUD PUBLICA

Las enfermedades parasitarias causadas por helmintos se consideran problemas importantes a nivel sanitario, social y económico. Esto último es debido a que pueden causar mala absorción intestinal, reducción tanto en la capacidad laboral como en la tasa de crecimiento, además de gastos elevados en la prevención y la curación de la enfermedad. Se estima que en el mundo 1.3 millones de individuos se encuentran infectados con los nemátodos *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura*, *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale* (Crompton, 1999). En general, la morbilidad de las helmintosis está asociada a la carga parasitaria.

Entre las características de los parásitos helmintos que infectan humanos se encuentran: la persistencia por largos períodos 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 del huésped induciendo tolerancia o anergia en una infección repetida; amplia distribución en comunidades humanas y la ocurrencia en individuos predispuestos a la infección (Behnke, 1991). La persistencia de la infección con la acumulación progresiva de parásitos puede inducir complicaciones crónicas a lo largo de la vida de los pacientes, a este respecto se tiene conocimiento de un caso en donde la infección con *N. americanus* persistió por más de 18 años (Chow y cols., 2000).

En el control de las parasitosis se ha aplicado la quimioterapia, sin embargo, la larga duración de los tratamientos, las dificultades de distribución de los fármacos, así como la emergencia de parásitos resistentes ha dificultado el control efectivo de estas parasitosis.

Una alternativa que se propone es la inmunización de los individuos que viven en zonas de riesgo. Sin embargo, para lograr obtener vacunas efectivas, se requiere en primera instancia estudiar los mecanismos de defensa del huésped, la biología del parásito y la caracterización de los diferentes componentes del parásito con la finalidad de dilucidar y entender las respuestas protectoras que se generan en los individuos afectados. Sin embargo, una

limitante para llevar a cabo estos estudios es que no se cuenta con modelos animales para la mayoría de los parásitos helmintos.

En el caso del nemátodo *Trichinella spiralis*, la respuesta inmune en contra del parásito ha sido ampliamente estudiada en modelos murinos, debido a que su ciclo de vida, 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 mantenerse 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 entérico.

TRIQUINELOSIS

Entre las helmintiasis se encuentra la triquinelosis, que es una zoonosis ampliamente distribuida en México y en todo el mundo. La triquinelosis es producida por nemátodos del género *Trichinella*, los cuales afectan además del hombre a una gran variedad de animales domésticos y silvestres. La triquinelosis, se inicia por el consumo de carne infectada con la LM de este parásito y 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, para establecerse 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 en 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).

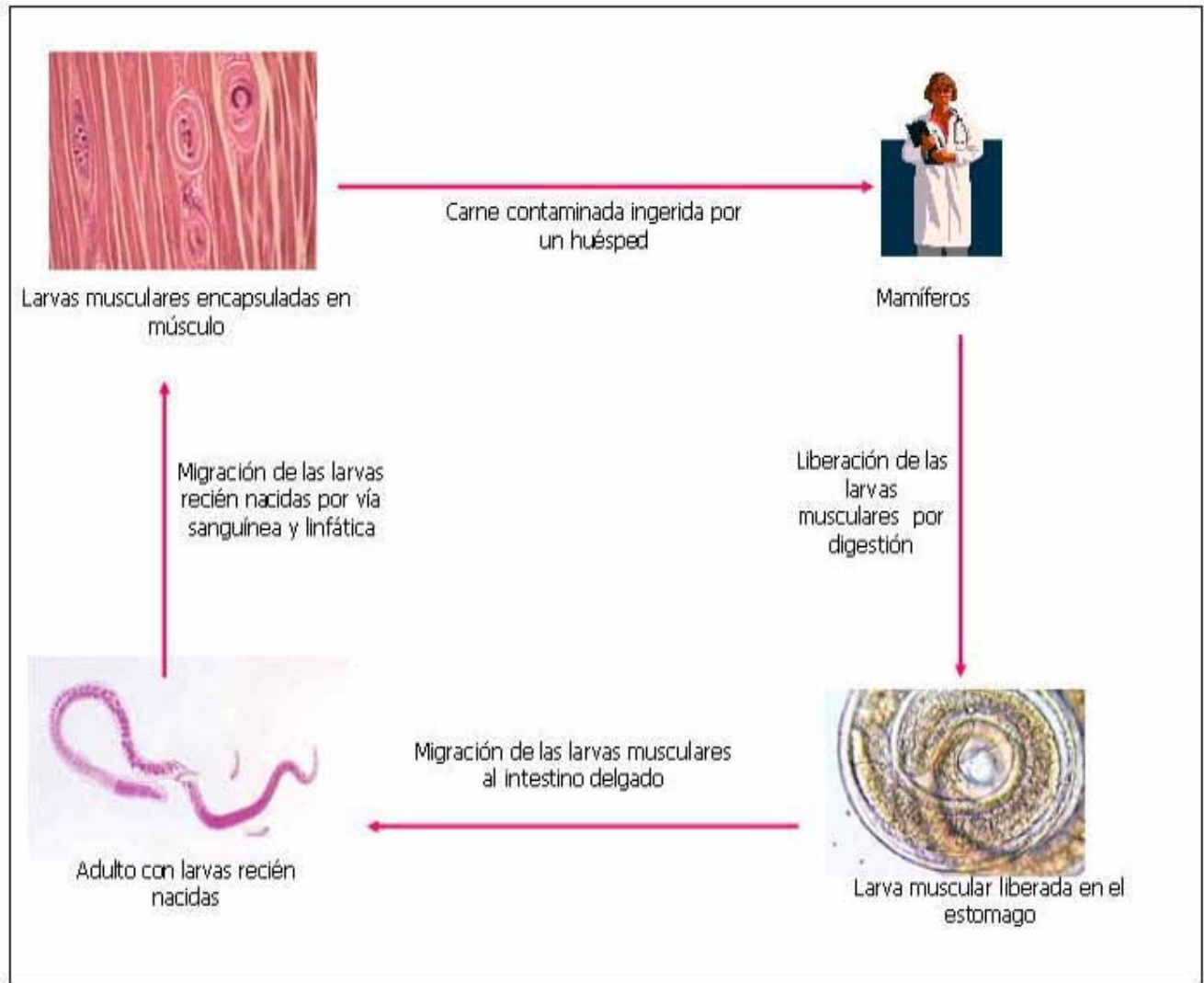


Figura. 1. Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*.

Es importante mencionar que en años recientes, la triquinelosis ha cobrado gran importancia en varios países, debido al hecho de que las fuentes de transmisión no han sido controladas adecuadamente, observándose brotes de triquinelosis en diversas zonas del mundo. Entre las fuentes de transmisión más importantes se encuentra al cerdo, aunque se ha observado un incremento en los casos de triquinelosis humana por consumo de carne de otros animales como caballo, oso, jabalí, marmota y zorra, entre otros (Dupouy-Camet, 2000).

Los modelos animales han sido de gran utilidad para analizar a nivel intestinal los cambios fisiológicos que son inducidos por el parásito *T. spiralis*. En este contexto, diversos estudios morfológicos y funcionales han demostrado la estrecha interacción de las células cebadas con el sistema nervioso del tracto gastrointestinal, de ratas normales y/o infectadas con *T. spiralis*, mostrando que las células cebadas tienen un papel muy importante en la infección por parásitos intestinales.

Se ha demostrado en el yeyuno de ratas y cobayos infectados con *T. spiralis*, que las células del epitelio y los nervios intestinales se comunican con las células cebadas de la mucosa, y en respuesta a los mediadores producidos por las células cebadas existe un incremento en el contenido de AMP cíclico, lo que aumenta la secreción de cloro por las células epiteliales, contribuyendo así en el transporte de iones y agua y en el aumento de histamina, serotonina, hidroxitriptamina (5-HT) y prostaglandinas (PGE₂) en el tejido infectado (Russell y Castro, 1979; Perdue y Gall 1986; Russell, 1986; Castro y cols., 1987; Harari y cols., 1987; Perdue y cols., 1991; Broaddus y Castro, 1994).

Asimismo, la secreción del neuropéptido llamado sustancia P se incrementa en el yeyuno de ratas infectadas con *T. spiralis* (Swain y cols., 1992) y en otros modelos animales de inflamación intestinal (Castagliuolo y cols., 1997; Sturiale y cols., 1999). La sustancia P es producida por las fibras nerviosas de varios tejidos como el tracto gastrointestinal y se une específicamente a las células cebadas, induciendo la liberación de histamina y otros mediadores inflamatorios (Harari y cols., 1987), que inducen el infiltrado celular que se observa en el intestino de animales infectados con *T. spiralis* (Russell y Castro 1979; Ahmad y cols., 1991).

Diversos estudios han demostrado la íntima relación entre las células cebadas de mucosa y la sustancia P producida por los nervios que innervan la mucosa en ratas normales e infectadas con *N. brasiliensis*. Asimismo, en el modelo de ratones deficientes en células cebadas y recostituídos con células de la médula ósea de ratones normales se mostró que todas las alteraciones en la permeabilidad vascular, depósitos de fibrina e infiltración de granulocitos asociados con la inyección intradérmica de sustancia P dependen de la activación de las células

cebadas (Shanahan y cols., 1985; Stead y cols. 1987; 1988; Kowalski y cols., 1988; Bienenstock y cols., 1989; Yano y cols., 1989; Arizono y cols., 1990; Perdue y cols., 1991).

A este respecto, Hwang y cols. (1993) reportaron que la desregulación de la neuropeptidasa neural (NEP 3.4.24.11) que degrada a la sustancia P en la mucosa intestinal y el músculo de ratas infectadas con *T. spiralis*, tiene como consecuencia que la sustancia P se degrada 6 veces menos. Lo anterior implica la posibilidad de que la desregulación de la NEP en el intestino inflamado amplifique la inflamación neurogénica (liberación descontrolada de sustancia P), la sustancia P interactúa con el receptor NK1 iniciando la expresión de ICAM-1 y la infiltración de leucocitos (Quinlan y cols., 1998). En este contexto, Barbara y cols. (2003) mostraron que la desregulación de la expresión de NEP exacerba la enteritis inducida por *T. spiralis*, iniciando la inflamación intestinal e incrementando la biodisponibilidad de la sustancia P y la sobreexpresión de ICAM-1 en ratones NEP^{-/-}, por lo que la sustancia P tiene un papel importante al inicio de la inflamación intestinal.

RESPUESTA INMUNE CONTRA *Trichinella spiralis*

Estudios acerca de la caracterización de antígenos de *T. spiralis* relevantes en la relación huésped-parásito 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 (Phillipp y cols., 1980; Silberstein, 1983; Ortega-Pierres y cols., 1984).

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 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- Mulia y cols., 1996).

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 antígenos de *T. spiralis* originados en el esticosoma de la LM, abundantes en productos de E/S y superficie se clasificaron como antígenos TSL-1 (Appleton y cols., 1991; Ortega-Pierres y cols., 1996). El anticuerpo monoclonal NIM-M1 reconoce cuatro moléculas de superficie de la LM (47, 52, 67, 72 kDa), así como tres presentes en los productos de E/S (52, 67 y 72 kDa) (Arriaga y cols., 1989). Estas moléculas son una nueva familia de glicoproteínas que presentan estructuras con unión-N con tres y cuatro antenas y con residuos de N-acetilgalactosamina (GalNAc) unido en β a N-acetilglucosamina (GlcNAc) (Reason y cols., 1994). Todos los residuos de las antenas están cubiertas con grandes cantidades del azúcar 3,6-dideoxiarabinohexosa (Tivelosa) (Wisnewski y cols., 1993; Morelle y cols., 2000), el cual le confiere inmunodominancia a los antígenos TSL-1. 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 huevos de *Ascaris*, su enlace glucosídico es diferente, siendo β en los antígenos TSL-1 y α en los otros antígenos mencionados, además, el azúcar de los antígenos TSL-1 es D-(tivelosa) y el de los huevos de *Ascaris* es L-(ascarilosa). El enlace glucosídico β hace que anticuerpos dirigidos contra los antígenos TSL-1 no reconozcan a la α 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 y manosa (36 y 22 % respectivamente).

En modelos murinos se ha demostrado que los antígenos TSL-1 son capaces de inducir una inmunidad protectora contra la infección (Bell y cols., 1979; Gamble y Graham, 1984; Ortega-Pierres y cols., 1989). Estudios *in vitro*, empleando anticuerpos anti-tivelosa (18H, 9E y 9D4), han mostrado que éstos inhiben la invasión de la LM a monocapas de células epiteliales (McVay y cols., 2000); además se sabe que estos anticuerpos inducen la expulsión del parásito en ratas recién nacidas (Ellis y cols., 1994). Goyal y cols. (2002) sintetizaron químicamente a la tivelosa, inmunizaron a ratones con esta molécula y evaluaron la respuesta de anticuerpos en ratones

infectados y desafiados con el parásito, observando que la inmunización con la tivelosa no aumenta la resistencia a la infección hacia la LM de *T. spiralis*, pero incrementa los niveles de IgG₁.

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. 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).

La respuesta inmune protectora en contra de *T. spiralis* es del tipo Th₂. Lo anterior se ha determinado midiendo los niveles de citocinas producidas por células aisladas de diferentes tejidos de animales inmunes (Grencis y cols., 1991; Pond y cols., 1992; Urban y cols., 1992) y por la transferencia adoptiva de protección con células inmunes capaces de secretar *in vitro* citocinas del tipo Th₂ (Bell y cols., 1987; Korenaga y cols., 1989; Ramaswamy y cols., 1994). Esto también ha sido documentado en modelos animales en los que se usan anticuerpos neutralizantes para estas citocinas (Coffman y cols., 1989; Else y cols., 1992).

La 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, como IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 (Grencis, 1997; Else y Finkelman, 1998), siendo la IL-5 particularmente 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 (Galli, 1990).

PROCESO DE EXPULSIÓN 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 principal mecanismo de defensa del huésped contra la infección. Este mecanismo de

expulsión presenta características moduladas por un proceso 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). Jarret y cols. (1968) establecieron que en ratas durante 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, la mayoría de las larvas de *T. spiralis*, ingeridas por ratas previamente infectadas son expulsadas en menos de 1 hora, mucho antes de que puedan establecerse en la mucosa intestinal. El pequeño porcentaje de larvas que resiste la expulsión eventualmente se establece en mucosa y permanece en el huésped por varios días (Russell y Castro, 1979). Es así que el término de “expulsión rápida” (ER) fue acuñado por Bell y cols. (1979) y 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).

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. 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 adulto se puede explicar entonces como una consecuencia de la exposición de la LM, en este contexto, ratas recién nacidas pasivamente inmunizadas con anticuerpos anti-tivelosa presentan la ER después del desafío con la LM de *T. spiralis* (Appleton y cols., 1988).

En ensayos *in vivo* se ha observado que otras sustancias como el moco intestinal pueden ayudar también 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).

Evidencias a favor de la participación de IgE en la expulsión del organismo adulto de *T. spiralis* provienen de estudios realizados por Negro-Corréa y cols. (1996), quienes 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 en el fluido intestinal que en el suero y en la linfa. También observaron la producción y el consumo de IgE presente en el lumen del intestino de ratas 10 días después de la infección. Además, la IgE obtenida de lavados intestinales al día 11 después de la infección 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. Wang y cols. (1998) describieron la presencia de linfocitos B en tejidos como las placas de Péyer, los ganglios linfáticos mesentéricos y el bazo de ratas infectadas con *T. spiralis*, estos linfocitos expresaron los isotipos IgM, IgA, IgE, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_{2c}. Se demostró la presencia de células productoras de IgE en el intestino de animales infectados, con reconocimiento específico hacia el antígeno 9D4 (presente en la LM de *T. spiralis*).

Los estudios de Santamarina y cols. (1988) demostraron que antígenos provenientes de las fases entéricas 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. 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 las células cebadas son las responsables de los cambios fisiológicos durante la anafilaxis local.

El papel que juegan las células cebadas en el proceso de expulsión de parásitos intestinales ha sido bien documentado. Lee y Wakelin (1982) observaron que cambios en el número de células cebadas 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 expulsión. Así también, la expulsión de parásitos en ratones deficientes en células cebadas (W/W^v : deficientes en el receptor c-Kit y $S1/S1^d$: deficientes en Stem Cell Factor) es prolongada, la fecundidad del parásito aumenta y se recuperan más LM de estos ratones con respecto a los animales normales (Alizadeh y Murrell 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 células cebadas, acelerando la expulsión de los organismos adultos (Oku y cols. 1984), quizá debido a la producción de factores de diferenciación y maduración de células cebadas 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 células cebadas, la activación de estas células en la mucosa intestinal de ratas infectadas, ha sido evaluada midiendo la liberación de serinproteasas tipo II (RMCP II, rat mast cell protease II, por sus siglas en inglés) asociadas a los gránulos, ya sea en líquido intestinal o en suero (Jarrett y Miller 1982; Miller y cols. 1983; Woodbury y cols. 1984). 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 células cebadas de mucosa intestinal de ratón (mMCP1; mouse Mast Cell Protease 1, por sus siglas en inglés). La correlación más estrecha se observó en ratones NIH (respuesta rápida) infectados con *T. spiralis*, en los que la liberación de grandes cantidades de la proteasa mMCP1 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 B1O (respuesta moderada y baja respectivamente) la liberación de mMCP1 fue menor y más sostenida observándose un retraso en la expulsión del parásito.

En otros estudios se ha observado que los niveles de mMCP1 se encuentran muy aumentados en el tiempo de expulsión del parásito (Huntley y cols. 1990) y los ratones deficientes en esta molécula no tienen la capacidad de expulsar al parásito y se asocia con un cambio en la respuesta inmune del tipo Th₂ al tipo Th₁ (Knight y cols., 2000; DeSchoolmeester y cols., 2003). Asimismo, Knight y cols. (2004) demostraron mediante análisis de microarreglos en ratones BALB/c infectados con *T. spiralis* que en el yeyuno existía un aumento en los transcritos para la mMCP1 y mMCP2 en aproximadamente 60 a 70 veces. Por otro lado, en otros estudios se ha demostrado la asociación de las citocinas derivadas de las células T con la aparición de células cebadas de mucosa intestinal y la expulsión de varios helmintos (Lantz y cols., 1998; Lawrence y cols., 1998).

La expulsión de *T. spiralis* por ratones deficientes en la mMCP1 es tardía y se ha sugerido la incapacidad de las células cebadas para migrar dentro de la mucosa de estos ratones, lo cual previene la liberación de mediadores dentro del epitelio (Knight y cols., 2004). Además, se ha demostrado que la mMCP1 induce proteólisis de las uniones estrechas del tipo de las ocludinas alterando así la permeabilidad del epitelio intestinal (Scudamore, 1998). Gurish y cols. (2004) demostraron que ratones BALB/c desarrollaron una respuesta importante de IgE llegando a su máximo nivel en el día 14 después de la infección, así como eosinofilia y mastocitosis. Sin embargo, el número de células cebadas y los niveles de la proteasa mMCP1 disminuyó considerablemente en los ratones BALB/c deficientes en IgE, sugiriendo así que la IgE tiene un papel importante en la regulación de las células cebadas.

Otros factores producidos y liberados por células cebadas activadas se han encontrado en niveles elevados en animales infectados por *T. spiralis*. Este es el caso de las prostaglandinas (PG), la histamina y los leucotrienos (LT) liberados por las células cebadas durante la expulsión de *T. spiralis* y de otros parásitos helmintos. En estos estudios se demostró que cuando la PGE₂ se administraba a ratas 3 días después de la infección con *T. spiralis*, a una dosis de 500 µg/rata, el número de parásitos se reducía en el intestino delgado a los 7 días de la infección (Dutoit y cols. 1979) y que la histamina estaba implicada en el rechazo de *T. spiralis* en ratones (Campbell y cols. 1963). El incremento de LT, produce 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 de la luz intestinal de ratas inmunes desafiadas con *T. spiralis* (Miller 1984; Moqbel 1986).

Las células cebadas contribuyen a la inflamación intestinal mediante la liberación excesiva de mediadores inflamatorios como es $\text{TNF}\alpha$, el cual amplifica y perpetúa la respuesta mediante el reclutamiento de otras células inflamatorias (Stenton y cols., 1998; Wedemeyer y cols., 2000; Yu y Perdue, 2001; Marshall y cols., 2003). Así, Bischoff y cols. (1999) mostraron mediante estudios inmunohistoquímicos que aproximadamente el 60 % de las células de lámina propia con inmunoreactividad para $\text{TNF}\alpha$ fueron células cebadas. Es así que las células cebadas representan una fuente importante de $\text{TNF}\alpha$ ya que esta molécula se encuentra preformada y almacenada en los gránulos lista para liberarse inmediatamente durante la activación. La liberación de esos productos resulta en incremento en la motilidad gastrointestinal, hipersecreción de moco, incremento en la permeabilidad vascular y el reclutamiento y activación de leucocitos.

Estudios de Lawrence y cols. (1998; 2000) mostraron que la inflamación intestinal que acompaña a la expulsión del adulto de *T. spiralis* está mediada por la actividad de IL-4, llevando a la producción de $\text{TNF}\alpha$ y a la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), que en última instancia tiene como resultado la enteropatía caracterizada por atrofia de vellocidades e hiperplasia de criptas. Sin embargo, los autores demostraron que no se requiere la enteropatía para la expulsión de los parásitos.

Si bien la fuente de citocinas reguladoras observadas en los experimentos antes mencionados pueden ser producidas por células T, es importante señalar que las células cebadas 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 Th_2 . A este respecto, estudios realizados por Arizmendi y cols., (2001) y Niborski y cols., (2004), han demostrado que las células cebadas pueden ser activadas por los antígenos TSL-1 de la LM de *T. spiralis* induciendo cambios a nivel del RNAm para IL-4 y $\text{TNF}\alpha$, así como su liberación. Lo anterior sugiere que las células cebadas pueden ser la fuente de estas citocinas.

Lawrence y cols. (2004) mostraron que las células cebadas tienen un papel importante en la inducción de la respuesta Th₂ y en la inflamación intestinal asociada con helmintos, en donde se libera a la mMCP1. En estos estudios en ratones deficientes en células cebadas (W/W^v), se mostró que la respuesta Th₂ se redujo y la respuesta Th₁ se incrementó sugiriendo un papel importante de las células cebadas promoviendo o amplificando la respuesta Th₂ responsable de la protección contra los helmintos intestinales.

ORIGEN Y DISTRIBUCION DE LAS CELULAS CEBADAS

Las células cebadas derivan de las células progenitoras hematopoyéticas que migran a todos los tejidos vascularizados en donde completan su maduración. Normalmente residen cerca del epitelio, vasos sanguíneos, nervios y en el tracto respiratorio y gastrointestinal, cercanas a las células del músculo liso y a las glándulas productoras de moco; algunas veces se localizan en el epitelio intestinal. En algunas especies de roedores se localizan en grandes cantidades en las cavidades dentro del mesoderma como por ejemplo, la cavidad peritoneal (Kitamura 1989; Galli y cols., 1994; Metcalfe y cols., 1997; Galli y Lantz, 1999; Galli 2000; Galli y cols., 2005).

Las células cebadas 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 inmunitaria contra parásitos (Befus y cols., 1986). Las células cebadas se encuentran en diferentes sitios anatómicos así como en diferentes especies animales, lo que ha originado la heterogeneidad poblacional de células cebadas (Enerback y Lowhagen, 1979; Bienenstock y cols., 1985; Kitamura 1989; Galli 1990; Galli y cols., 1994; Metcalfe y cols., 1997). Existe una subpoblación asociada al tejido conectivo y otra subpoblación directamente ligada a mucosa intestinal. Si bien estas subpoblaciones difieren en sus propiedades morfológicas, bioquímicas y funcionales, en cuanto al contenido de mediadores y en cuanto a su activación con diferentes moléculas, las células cebadas responden de manera distinta a factores de crecimiento y de diferenciación liberados por células del sistema inmunitario. Las células cebadas se originan de la médula ósea a partir de células precursoras que presentan el marcador de superficie CD34⁺; su desarrollo implica la

participación de ciertos factores de crecimiento, particularmente del factor estimulador de la diferenciación de células cebadas (SCF, Steem Cell Factor, por sus siglas en inglés), IL-3, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-11, pero su desarrollo puede ser inhibido o regulado por $IFN\gamma$ y por el factor de crecimiento transformante β , el factor de crecimiento de granulocitos macrófagos y por el factor de crecimiento nervioso. Las prostaglandinas y la IgE participan en la regulación del número y fenotipo de las células cebadas, especialmente durante procesos de enfermedad (Befus y cols., 1987; Rottem y Metcalfe, 1995).

BIOLOGIA DE LAS CELULAS CEBADAS

Las células cebadas se caracterizan 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 ($Fc\epsilon RI$). Estas células se localizan en el tejido adyacente a la microvasculatura y en la superficie de la mucosa y del epitelio.

En 1966, Enerback diferenció en ratas a las células cebadas del tejido conectivo (piel y de la cavidad peritoneal) de las células cebadas de mucosa intestinal por sus propiedades de tinción y por su sensibilidad a fijadores. Asimismo, se ha estimado que la vida media de una célula cebada del tejido conectivo es de aproximadamente 180 días en humano, mientras que la vida media de las células cebadas de la mucosa intestinal es de cerca de 40 días (Enerback, 1986). En estudios más recientes se ha calculado que las células cebadas pueden sobrevivir por periodos de tiempo más prolongados. Otra diferencia importante entre las 2 subpoblaciones de células cebadas es en la cantidad y composición de los constituyentes preformados de los gránulos secretores (Cuadro 1) y con base a su respuesta a secretagogos e inhibidores. Además, las células cebadas del tejido conectivo metabolizan primordialmente ácido araquidónico vía cicloxigenasa para posteriormente generar prostaglandina D_2 , mientras que las células cebadas de la mucosa intestinal sintetizan predominantemente leucotrieno C_4 , vía 5-lipoxigenasa.

Galli y cols. (1982) sugirieron que las diferencias fenotípicas en las poblaciones de las células cebadas *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 células cebadas residentes en tales áreas. Por ejemplo, el sitio de una respuesta inflamatoria dependiente de células T puede tener niveles de citocinas que influyen en la proliferación o maduración de las células cebadas. Por otro lado, cuando el microambiente es rico en IgE y antígenos específicos, se puede alterar el fenotipo de las células cebadas para inducir la desgranulación más activa de las mismas. A través de la producción de citocinas como IL-3 e IL-4, las células cebadas pueden participar en la regulación de su propio número y fenotipo, especialmente durante procesos de enfermedad o en eventos de la respuesta inmunitaria.

Se ha mencionado previamente que la IL-3 es una señal crítica para la proliferación de la población de células cebadas de mucosa intestinal observada en ratas y ratones durante parasitosis. Por otro lado, evidencias *in vitro* sugieren que la proliferación de células cebadas del tejido conectivo 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 células cebadas de mucosa intestinal dependiente de IL-3 generada *in vitro* y favorecer el crecimiento y maduración *in vitro* de células cebadas con propiedades de células cebadas del tejido conectivo.

Es importante resaltar la participación del ligando de c-kit y del SCF en este proceso, ya que estas moléculas se expresan tanto por los progenitores de las células cebadas, como por las células cebadas maduras e inmaduras. Esta última molécula promueve la proliferación y maduración de los progenitores de células cebadas, afectando el fenotipo y la función de las mismas, aumentando 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 células cebadas en ratones *W/W^v* y *S1/S1^d* e *in vitro* con líneas celulares, se ha establecido que el SCF por sí solo no estimula el crecimiento de los progenitores de células cebadas, siendo esencial la presencia de cofactores tales como IL-3, IL-4 e IL-10 en el crecimiento y maduración de los progenitores de células cebadas

(Rennick y cols., 1985). Es importante además hacer notar que los requerimientos del SCF difieren en la maduración de los dos tipos de células cebadas (Arizono y cols., 1993).

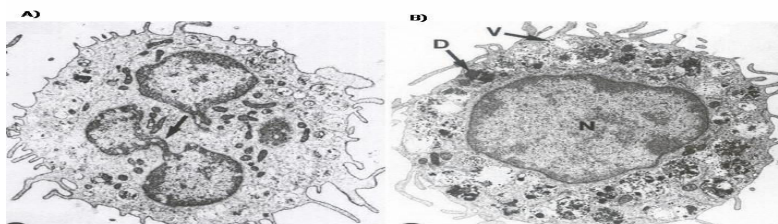
Por otro lado, además de la morfología de los gránulos, las diferencias histoquímicas asociadas con heparina en las células cebadas de tejido conectivo comparadas con sulfato de condroitina en las células cebadas de mucosa intestinal (Stevens y cols., 1986; Tantravahi y cols., 1986) y la dependencia de moléculas moduladoras para su diferenciación, el marcador para la discriminación entre las células cebadas es la expresión de proteasas específicas de gránulos secretores. La RMCP I es insoluble, está asociada a gránulos y se libera bajo la activación de células cebadas del tejido conectivo. Por otro lado, la RMCP II es soluble y puede ser detectada en la circulación después de la activación de células cebadas de mucosa intestinal (Miller y cols., 1983; Miller 1992). Además, las células cebadas del tejido conectivo de ratas producen tres isoformas de la proteasa 5 y expresan triptasa y carboxipeptidasa A; la abundancia de la triptasa es baja comparada con la triptasa en células cebadas de ratón o de humano (Lagunoff y cols., 1991).

En el caso de las células cebadas 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). Algunas características compartidas por las proteasas de diferentes especies. La RMCP I tiene homología con la proteasa 4 de ratón mientras que la RMCP II es homóloga a la proteasa 1 de ratón. Las especificidades por un sustrato y las funciones de esas proteasas no se conocen completamente. En las parasitosis por helmintos, el SCF contribuye a la mastocitosis a nivel de mucosa. Ratas tratadas con SCF presentan altos niveles de la quimasa RMCP II en el yeyuno y en el suero y ratas tratadas con anticuerpos anti SCF tienen una marcada disminución en el número de células cebadas así como en los niveles de RMCP II (Newlands y cols., 1995), lo que sugiere que el el SCF se requiere en el desarrollo de ambas subpoblaciones de células cebadas, aunque existen diferencias en la dependencia que dichas subpoblaciones tienen hacia esta molécula.

Cuadro 1. Características principales de los 2 subtipos de células cebadas

	Células Cebadas de Mucosa Intestinal	Células Cebadas de Tejido Conectivo
Propiedades de teñido con Azul Alcian-Safranina	Azul	Rojo o azul
Características morfológicas	Redondas u ovales con núcleo multilobulado	Redondas u ovales con núcleo redondo
Gránulos	Pequeñas, tamaño variable	Grandes, tamaño uniforme
Vida media	< 40 días	> 6 meses
Características Bioquímicas		
Presencia de proteoglicanos:		
Heparina	-	+
Sulfato de condroitina	+	-
Aminas biogénicas	Histamina	Histamina y serotonina
Proteasas neutras	Proteasa de células cebadas de ratón 1 y 2	Proteasas de células cebadas de ratón 3, 4, 5, 6, 7 y Carboxipeptidasa A
Desgranulación		
IgE	+++	++
Ionoforo de calcio	+	+
Sustancia P, compuesto 48/80	+++	+/-

Tomado de Féger y cols., (2002)



A) célula cebada de mucosa intestinal de ratón B) célula cebada de tejido conectivo de ratón analizadas mediante microscopía electrónica de transmisión; N: núcleo, V: gránulos multivesiculares, D: gránulos densos. Tomado de Gurís y cols. (1997),

PARTICIPACIÓN DE LAS CÉLULAS CEBADAS EN LA RESPUESTA INMUNE INNATA Y ADQUIRIDA

El conocimiento que se ha generado hasta ahora en el estudio de las células cebadas ha permitido colocarlas como un tipo de células centinela en la defensa del huésped, ya que residen por largo tiempo en asociación con los vasos sanguíneos y los nervios en los sitios más expuestos a los patógenos (Bienenstock y cols., 1987; Stead y cols., 1989; Galli y Lantz, 1999).

Las células cebadas expresan una gran variedad de receptores que le permiten responder a diferentes estímulos, como el SCF, IL-3, LPS (Kitamura 1989; Galli y cols., 1994; Metcalfe y cols., 1997; Galli y cols., 2005) y quimiocinas (Ochi y cols., 1999; Lin y cols., 2000); también responden hacia los receptores tipo Toll (TLR 1-10, toll like receptors, por sus siglas en inglés) (Supajatura y cols., 2001; 2002; McCurdy y cols., 2001; 2003; Hou y cols., 2006); productos de la activación del complemento (Fureder y cols., 1995; Andrasfalvy y cols., 2002) antígenos bacterianos (Malaviya y cols., 1994; 1996), parasitarios (Miller y cols., 1983; Arizmendi y cols., 1997; 2001; Niborski y cols. 2004), algunos neuropéptidos (Foreman y Jordan, 1983; McDonald y cols., 1996; Lau y cols., 2001) además participan en una amplia gama de procesos fisiológicos y patológicos (Galli y cols., 2005).

La presencia del Fc ϵ RI en las células cebadas capacita a este tipo celular para activarse a través de la unión de IgE a su receptor, ocurriendo el subsecuente entrecruzamiento durante el encuentro con el antígeno específico. El proceso de activación de las células cebadas dependientes de Fc ϵ RI tiene como resultado eventos que llevan a la secreción de tres clases de mediadores: a) aquellos preformados almacenados en los gránulos citoplásmicos de las células, por ejemplo, aminas vasoactivas, proteasas neutras, proteoglicanos y algunas citocinas y factores de crecimiento, mediante un proceso conocido como desgranulación anafiláctica o exocitosis; que implica la fusión de las membranas de los gránulos citoplásmicos con la membrana plasmática de la célula (Dvorak y col., 1972; Dvorak, 1992; Dvorak y cols., 1994); b) la síntesis *de novo* de los lipídicos proinflamatorios, tales como prostaglandinas y leucotrienos; c) factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas (Metzger, 1992; Mecalfe y cols., 1997; Kinet, 1999; Turner y Kinet, 1999; Ott y Cambier, 2000; Williams y Galli, 2000; Nakajima y cols., 2002;

Sayama y cols., 2002; Okumura cols., 2003). El mecanismo de secreción ubica a las células cebadas como un componente celular efector importante en la respuesta inmune. Las células cebadas liberan una gama de moléculas biológicamente activas en respuesta al desafío con IgE y antígeno específico y se consideran como células efectoras clave en la hipersensibilidad inmediata asociada a IgE y desórdenes alérgicos, así como en la respuesta inmune protectora hacia parásitos (Metzger, 1992; Miller, 1996; Metcalfe y cols., 1997; Galli y Lantz 1999; Turner y Kinet 1999; Kawakami y Galli 2002; Okumura y cols., 2003; Galli y cols., 2005).

El entrecruzamiento del FcεRI transmite una señal que resulta en la activación de cinasas de tirosina y de un aumento en el flujo de calcio (Fig. 2). 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 en donde descargan su contenido al exterior.

La unión de la 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 célula cebada puede unir diferentes antígenos o moléculas estimuladoras de células cebadas y liberar diferentes tipos de mediadores preformados o sintetizados *de novo* (Fig. 3). El tipo y la cantidad del mediador liberado dependerá del tipo de células cebadas y de la intensidad del estímulo (Gilchrist y cols., 2003).

La participación de las células cebadas en la respuesta inmune adquirida contra patógenos, requiere del reconocimiento de antígenos bacterianos o de parásitos helmintos por la IgE, y es precisamente este complejo IgE-bacteria ó IgE-parásito, el cual se une al receptor FcεRI presente en la membrana de las células cebadas. 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 (King y Nutman, 1992).

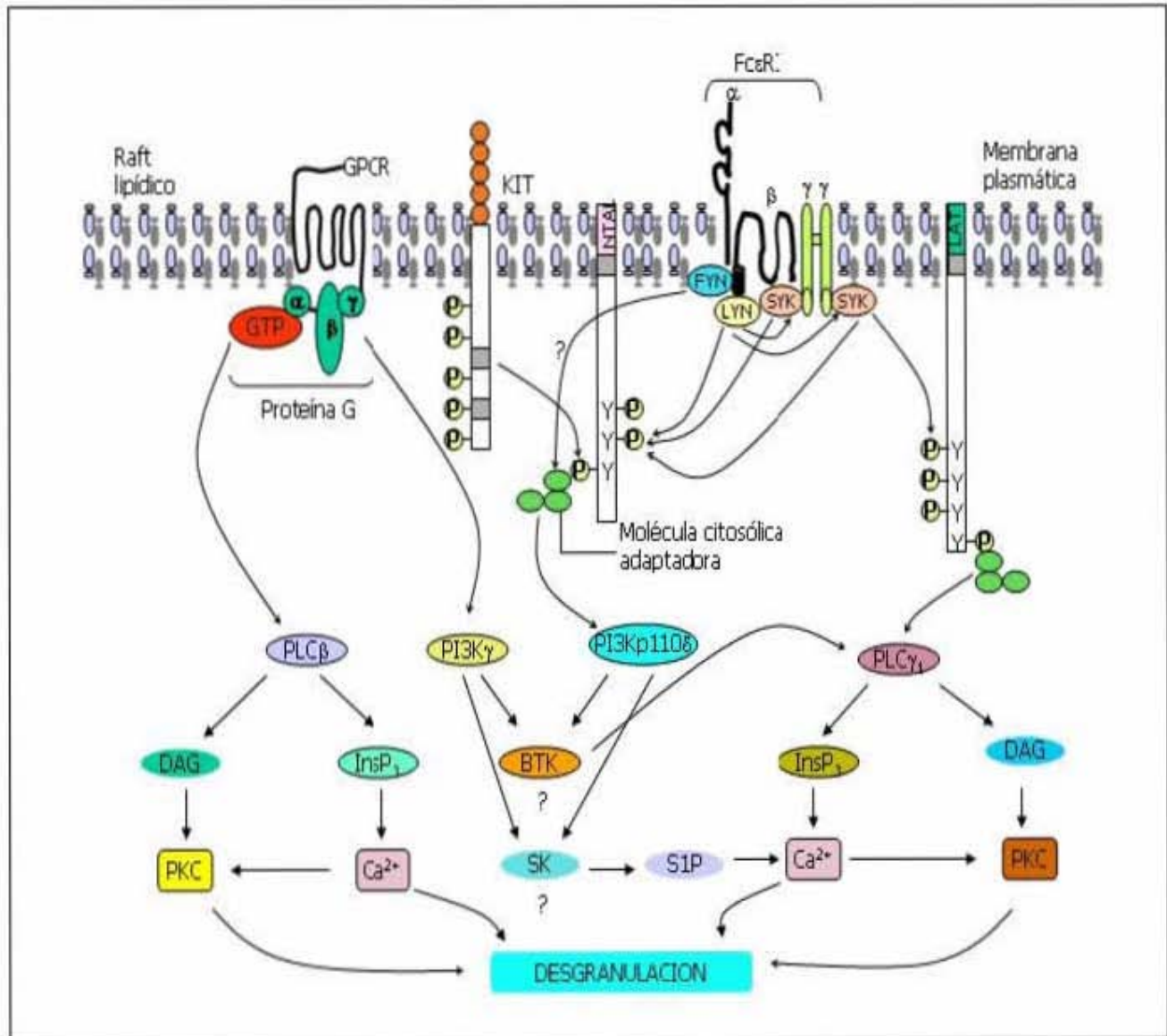


Figura 2. Vías de señalización y desgranulación en células cebadas. (Tomado de Gilfillan y Tkacyk, 2006)

Abreviaturas: GPCR y KIT, receptores acoplados a proteínas G; FcεRI, receptor de alta afinidad para IgE; NTAL, molécula adaptadora activadora de células diferentes al linfocito T; LAT, molécula adaptadora activadora de linfocito T; FYN y LYN, moléculas asociadas a la membrana, involucradas en el inicio de la señalización durante la activación de las células cebadas; SYK, quinasa de tirosina de bazo; PLC, fosfolipasa C; PI3Kγ, fosfatidil inositol 3 quinasa; PI3Kp110δ, fosfatidil inositol 3 quinasa que contiene la subunidad p110δ; DAG, diacilglicerol; InsP₃, inositol-1,4,5 trifosfato; BTK, quinasa de tirosina de Bruton; PKC, proteína quinasa C; Ca²⁺, iones de calcio; SK, esfingosina quinasa; S₁P, esfingosina 1 fosfato.

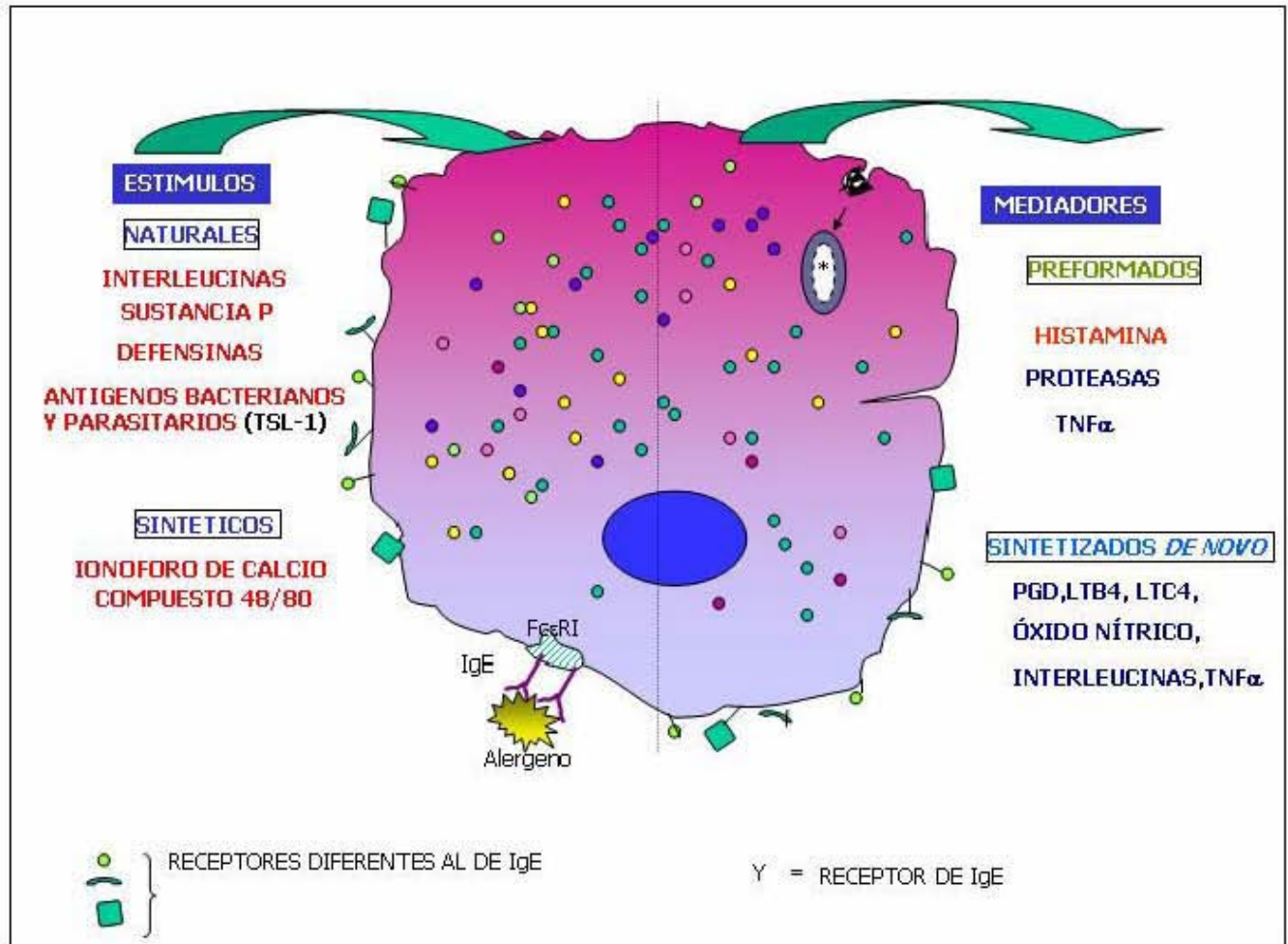


Figura 3. Activación de células cebadas y secreción de mediadores de inflamación.

Aunado a lo anterior, existen diversos estudios en donde se evidencia que las células cebadas actúan como células presentadoras de antígeno *in vitro*, función que aumenta por la IL-4 y disminuye por $IFN\gamma$ (Frاندji y cols., 1995; Bhattacharyya y cols., 1998; Aoki y cols., 1999). Además, las células cebadas activadas migran a los ganglios linfáticos locales y tienen el potencial para influenciar la activación y diferenciación de las células T “vírgenes” *in vivo* (Huels y cols., 1995; Frاندji y cols., 1996; Wang y cols., 1998). La expresión del MHC clase II y las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 por las células cebadas muestran su capacidad para inducir la activación de las células T específicas de antígeno *in vitro* (Frاندji y cols., 1996). Las células cebadas también contribuyen al aumento sinérgico de la respuesta Th₂ después de la estimulación oral y la inmunización subcutánea de los ratones deficientes en células cebadas en los que existe una reducción considerable (de dos

veces) en la respuesta Th₂ comparada con la respuesta de los ratones normales, mientras que la reconstitución con células cebadas derivadas de médula ósea resultó en una respuesta óptima (Aoki y cols., 1999).

La capacidad de las células cebadas para liberar citocinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, factor de crecimiento granulocito-macrófago, TNF α y quimiocinas como MCP1, MIP1 α y RANTES indica que las células cebadas tienen un enorme potencial para dirigir la respuesta inmunológica y regular la acción de células T y células B.

Actualmente se sabe que las células cebadas reconocen antígenos bacterianos de manera independiente de IgE, activándose y liberando histamina y TNF α . Entre las bacterias que se sabe activan a las células cebadas se encuentran: *Escherichia coli*, *Hemophilus influenzae*, *Salmonella typhimurium*, *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi* (Norn y cols., 1983; 1987; 1990; Lutton y cols., 1995; Talkington y Nickell 1999). En el caso de *E. coli* se ha demostrado que el reconocimiento está mediado por una molécula receptora que contiene manosa (CD48) presente en la superficie de las células cebadas hacia las fimbrias del tipo I de las enterobacterias (Malaviya y cols. 1994). Asimismo, se ha demostrado que parásitos y antígenos parasitarios, también pueden inducir *in vitro* la activación directa de las células cebadas con la consecuente liberación de productos proinflamatorios tanto preformados como sintetizados *de novo*. La activación directa de células cebadas por los protozoarios *Leishmania infantum* y *L. major*, sin embargo se requiere la interacción de las células cebadas con el parásito completo (Bidri y cols., 1997). Estudios realizados por Arizmendi y cols. (1997, 2001) aportan evidencias a favor de la participación de las células cebadas en una respuesta inmunitaria innata contra el nemátodo *T. spiralis*. Estos autores demostraron la participación de antígenos específicos de la LM de *T. spiralis* (TSL-1) en la activación de las células cebadas de peritoneo de ratas normales, induciendo la liberación de histamina, proteasas específicas (proteínasa 5, carboxipeptidasa A) y TNF α ; además de la inducción de cambios en los niveles de RNAm para IL-4 (incremento en un 65 %), IL-10 (con una disminución del 55%), IFN γ (con una disminución del 59%) y TNF α (con un incremento del 52%) en la línea celular con fenotipo de mucosa intestinal

(HRMC, Híbrido Rat Mast Cells, por sus siglas en inglés). Más recientemente, Niborski y cols., (2004) demostraron mediante inmunofluorescencia y análisis por citometría de flujo que los antígenos TSL-1 reconocen uniformemente la superficie de las células HRMC, resultando en la aumento y liberación de $\text{TNF}\alpha$ e IL-4 dosis-dependiente. También mostraron que la IL-4 se produce por las células cebadas derivadas de médula ósea activadas por los antígenos TSL-1. Estos estudios aportan evidencias experimentales que apoyan la activación directa de las células cebadas con los antígenos TSL-1 mediante un mecanismo independiente de IgE, que pudiera ser un evento relevante en una respuesta inmunitaria temprana contra el parásito.

MOLÉCULAS ACTIVADORAS DE CC (SECRETAGOGOS)

Entre los estímulos inductores de la liberación de mediadores por las células cebadas mediante mecanismos independientes de IgE, entre los cuales se incluyen: anafilatoxinas (C3a y C5a), neuropéptidos (sustancia P, neurotensina, péptido intestinal vasoactivo, somatostatina, etc.), péptidos de veneno de abeja, compuesto 48/80, polilisina, polimixina, (Shanahan y cols., 1985; Fukuoka y Hugli 1990; Mousli y cols., 1992; Foreman 1993; Janiszewski y cols., 1994), defensinas de neutrófilos (Befus y cols., 1999; Niyonsaba y cols., 2001) y agonistas de los receptores tipo Toll (Marshall, 2004; Vliagoftis y Befus 2005).

La sustancia P es un neuropéptido de 11 aminoácidos producido por las neuronas intrínsecas (entéricas) y extrínsecas (sensoriales) que innervan el tracto gastrointestinal (Otsuka y Yoshioka, 1993), está involucrada en la formación de huecos (“gaps”) entre las células endoteliales de vénulas postcapilares; induce la extravasación de proteínas plasmáticas, el reclutamiento de células inflamatorias y la desgranulación de las células cebadas (Bowden y cols., 1994; Wang y cols., 1995; McDonald y cols., 1996; Quinlan y cols., 1998). La sustancia P activa a las células cebadas e induce la secreción de histamina y prostaglandinas entre otras moléculas inflamatorias (Pearce y cols., 1982; Janiszewski y cols., 1994). Como ya se menciona, la liberación descontrolada de la sustancia P dentro del tejido intestinal promueve una secuencia de eventos conocidos como “inflamación neurogénica” (McDonald y cols., 1996). La inflamación neurogénica se termina por la acción de la endopeptidasa

neutral (NEP 3.4.24.11), que degrada a la sustancia P en el fluido extracelular y cancela sus efectos proinflamatorios (Matsas y cols., 1983; Umeno y cols., 1989; 1990; Okamoto y cols., 1994; Lu y cols., 1997). Foreman y Jordan (1983) concluyen que mientras el tetrapéptido N-terminal de la sustancia P se une a los sitios aniónicos en la membrana de las células cebadas, una región lipofílica del péptido se inserta en la membrana celular a manera de ancla.

La sustancia P y el compuesto 48/80 liberan histamina al interactuar en el mismo sitio en las células cebadas, sin causar citolisis. Estas sustancias interactúan con componentes cargados negativamente en la membrana de las células cebadas y se insertan en ella para activar a las proteínas G sensibles a la toxina de *B. pertussis*, independientemente de receptores de superficie (Fig. 2). La toxina de *B. pertussis* inactiva a las proteínas G_e (Gi3), catalizando la ADP-ribosilación de los residuos de cisteína en la subunidad α del dominio COOH-terminal (Metcalfe y cols., 1997). Se cree que las proteínas G_e controlan las últimas fases del proceso de exocitosis (Koffer, 1997).

La activación de las células cebadas por la sustancia P y el compuesto 48/80 se lleva a cabo por mecanismos independientes de receptor (Lau y cols., 2001). Los autores usaron cloruro de benzalconio, que es un inhibidor específico de la liberación de histamina que se induce por compuestos policatiónicos, y se observó que mientras se inhibió la liberación de histamina en las células cebadas por la sustancia P o el compuesto 48/80, no se afectó la liberación de histamina inducida por anti-IgE. La amplificación sinérgica de la respuesta anti/IgE-sustancia P puede ser consecuencia de la activación simultánea de las proteínas G sensibles a policationes (Gi3) y a las proteínas G_p acopladas a fosfolipasa C (PLC) activadas por el entrecruzamiento de Fc ϵ RI. La activación subóptima de G_e aumenta los eventos intracelulares mediados por las proteínas G_p, como la activación de la PLC, que aumenta los niveles de Ca²⁺ intracelular (Barrowman y cols., 1986; Koffer, 1997).

La activación de las células cebadas de peritoneo de rata por el compuesto 48/80, el ionóforo de calcio A23187, el factor de crecimiento nervioso y la sustancia P incrementan los niveles de las especies de oxígeno reactivo

intracelular (ROS, como superóxido, H_2O_2 y el radical hidróxilo) (Niu y cols., 1996; Wolfreys y Oliveira, 1997; Brooks y cols., 1999). A este respecto, Suzuki y cols. (2003), demostraron que la activación de las células cebadas a través del señalamiento de $Fc\epsilon RI$ activa el ROS vía la NADPH oxidasa y que esta activación está involucrada en la regulación de flujo de calcio y la liberación de mediadores de inflamación; así mismo demostraron que el H_2O_2 liberado regula la fosforilación de la tirosina de fosfolipasa $C\gamma$ ($PLC\gamma$) y de la molécula adaptadora para la activación de células T (LAT) para la inducción de flujo de calcio.

Por otra parte, se ha demostrado ampliamente que existen moléculas liberadoras de histamina, conocidas como proteínas tumorales controladas transduccionalmente (TCTP), las cuales unen calcio e inducen la liberación de histamina e IL-4 por basófilos/células cebadas, por lo que se conocen también como factores liberadores de histamina (HRF) (Bheekha-Escura y cols., 2000). La presencia de moléculas tipo HRF han sido demostradas en *Schistosoma mansoni*, *Brugia malayi*, *Wuchereria bancroft*, *Plasmodium falciparum* (MacDonald y cols., 2001; Kakuturu y cols., 2002; Gnanasekar y cols., 2002); así como en los productos de excreción/secreción de la LM de *T. spiralis* (Mak y cols., 2001).

JUSTIFICACION

Diversos estudios han puesto de manifiesto la existencia de una interacción entre el sistema nervioso y las células cebadas presentes en el tracto gastrointestinal de animales infectados con *T. spiralis*. Así, se ha observado un incremento en la secreción de la sustancia P producida por las fibras nerviosas del intestino, y que puede unirse específicamente a las células cebadas, induciendo la liberación de mediadores inflamatorios del tipo de la histamina. La integridad funcional del intestino se altera por la liberación de estos mediadores, aumenta la excitabilidad intestinal, la permeabilidad y se estimula la secreción de cloro por el epitelio intestinal de los animales infectados con el parásito. Además, se ha demostrado que hay desregulación de la expresión de la endopeptidasa neural (NEP 3.4.24.11) que degrada a la sustancia P en la mucosa intestinal y el músculo de ratas infectadas con *T. spiralis* y exacerba la enteritis inducida por el parásito.

Por otro lado, las células cebadas presentes en el intestino de los animales infectados con *T. spiralis* participan en el proceso de expulsión del parásito adulto. Los mediadores liberados por las células cebadas incrementan la permeabilidad del epitelio intestinal, activan eosinófilos, inducen una hipersecreción de moco e incrementan la peristalsis, impidiendo el establecimiento del parásito y promoviendo su expulsión. Aunque de manera general se ha aceptado que esta activación de las células cebadas es dependiente de IgE, en animales deficientes en la cadena γ del Fc ϵ RI infectados con *T. spiralis* se ha observado la expulsión del parásito, con la presencia de mastocitosis y liberación de proteasas (mMCPI), sugiriendo la activación de las células cebadas independientemente de IgE. Estudios posteriores han demostrado que la unión de antígenos específicos de la LM de *T. spiralis* (TSL-1) a la superficie de células cebadas de ratas no sensibilizadas, genera la activación directa de estas células con la secreción de histamina, proteasas y un aumento a nivel transcripcional y de proteína para IL-4 y TNF α .

Considerando que tanto la sustancia P como los antígenos TSL-1 están presentes durante la infección con *T. spiralis*, además de que ambas moléculas inducen la liberación de histamina independientemente de IgE, resulta

de gran interés analizar, en primera instancia, si la activación de las células cebadas por los antígenos TSL-1 comparte características con la activación directa inducida por la sustancia P u otros secretagogos (secreción rápida de histamina, β -hexosaminidasa, participación de proteínas G y de residuos de ácido siálico) y en segunda instancia, realizar la caracterización de los mecanismos de activación involucrados en este tipo de estimulación de células cebadas, como son el estallido respiratorio y la movilización de calcio.

HIPÓTESIS

La activación directa de células cebadas de peritoneo de ratas normales por los antígenos TSL-1 de *Trichinella spiralis* involucra mecanismos de activación similares a otros secretagogos, en particular la sustancia P

OBJETIVO GENERAL

Analizar los mecanismos de activación inducidos por los antígenos TSL-1 en células cebadas de peritoneo de rata no sensibilizada, mediante un mecanismo independiente de IgE y compararlos con los que se inducen durante la activación por secretagogos conocidos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar y comparar la cinética de liberación de histamina por células cebadas de peritoneo de ratas no sensibilizadas estimuladas con los antígenos TSL-1 y la sustancia P.
2. Determinar el efecto de la toxina de *Bordetella pertusis* y la neuraminidasa V en la liberación de histamina por células cebadas de peritoneo de rata estimuladas con los antígenos TSL-1 ó con la sustancia P.
3. Analizar si existe estallido respiratorio y movilización de Ca^{2+} en la activación directa de células cebadas de peritoneo de rata por los antígenos TSL-1, ionóforo de calcio A23187 y el compuesto 48/80.

MATERIALES Y METODOS

INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *Trichinella spiralis*

Se infectaron experimentalmente por vía oral ratas de la cepa Sprague Dawley de 12 semanas de edad con 3000 LM de *T. spiralis* (MSUS/MEX/91/CM-91) cada una. 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 al 1% (Sigma Co., MO)-HCl (Merck, México) 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 durante 20 min, después se transfirieron a tubos conicos de 15 mL (Corning-Costar, NY) y se centrifugaron a 180 g durante 5 min. El sobrenadante se decantó y las LM se lavaron varias veces con amortiguador salino de fosfatos (PBS, pH 7.4). Las LM así aisladas se emplearon, por un lado, para la obtención del extracto total de *T. spiralis* (Et Ts) 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 se diluyeron 1:100 en Bacto Agar (Difco Laboratories, USA) al 0.2%; de esta suspensión se tomaron alícuotas de 5 μL y se contaron las LM con la ayuda de un microscopio óptico (BHA, Olympus, Japón). Posteriormente se inocularon ratas Sprague Dawley con 3000 LM por vía oral empleando una cánula gástrica.

INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *Nippostrongylus brasiliensis*

La larva 3 (L3) de *N. brasiliensis* se propagó y mantuvo de acuerdo a lo recomendado por Katona y cols. (1988). Se colectaron heces de ratas Sprague Dawley infectadas intradérmicamente con 500 L3 de *N. brasiliensis* a los 6, 7 y 8 días de la infección. Las heces se hidrataron con agua, se maceraron y mezclaron con vermiculita y carbón activado, la mezcla se depositó en papel filtro dentro de una caja de Petri de 15 cm de diámetro, el papel filtro con

las muestras fecales se incubó a temperatura ambiente durante 15 días, hidratando el papel diariamente y manteniéndolo húmedo. Las L3 de *N. brasiliensis* migraron a la periferia del filtro el cual se recortó en porciones pequeñas, se depositaron en un tubo de 15 mL (Corning-Costar, NY) y se centrifugaron a 180 g durante 5 min. El sobrenadante se decantó y las L3 se lavaron varias veces con PBS. Las L3 obtenidas se resuspendieron en PBS; de esta suspensión se tomaron alícuotas de 5 μ L y al microscopio óptico (BHA, Olympus, Japón) se contaron los parásitos. Las L3 así aisladas se emplearon, por un lado, para la obtención del extracto total de *N. brasiliensis* (Et Nb) y por otro lado para mantener el ciclo de vida del parásito. Para el Et Nb, los parásitos se homogenizaron con PBS durante 20 min a 4°C con un homogenizador manual (Potter Wheaton, USA) y se dejaron reposar durante 20 min. Pasado este tiempo se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 600 g durante 30 min a 4°C, y el Et Nb se almacenó a -20°C. La concentración del Et Nb se describió como el equivalente de parásitos/mL (Eq/mL) para todos los experimentos. Para continuar el ciclo de vida del parásito se inocularon intradérmicamente 500 L3 de *N. brasiliensis* por rata.

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

El Et Ts se obtuvo siguiendo el método descrito por Parkhouse y cols. (1981). Un paquete de 1 mL de la LM de *T. spiralis* se resuspendió en un volumen de amortiguador de Trisma-base 10 mM, pH 8.3 (Sigma Co., MO) conteniendo los inhibidores de proteasas: N- α -p tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK) 50 μ g/mL diluido en etanol, fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) 25 μ g/mL diluido en isopropanol y L-1-tosilamida-2-fenil etilclorometil cetona (TPCK) 174 μ g/mL diluido en agua. Los inhibidores empleados fueron de Sigma Co. (MO).

Los parásitos se homogenizaron durante 20 min a 4°C con un homogenizador manual (Potter Wheaton, USA). Posteriormente, se agregó deoxicolato de sodio (DOC, Sigma Co., MO) al 2% homogenizando los parásitos y dejándolos reposar durante 20 min. Pasado este tiempo se homogenizaron nuevamente otros 20 min. El Et Ts se

obtuvo mediante centrifugación a 600 g durante 30 min a 4°C y se almacenó a -20°C. El ET así obtenido se utilizó para la purificación de los antígenos TSL-1.

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., MO) a diferentes concentraciones, añadiéndose DOC a una concentración final de 2 %.

PURIFICACIÓN DE LOS ANTÍGENOS TSL-1 DE LA LARVA MUSCULAR DE *Trichinella spiralis*

La purificación de los antígenos TSL-1 de la LM de *T. spiralis* se realizó mediante una columna de afinidad empleando el anticuerpo monoclonal NIM-M1 (proporcionado por la Dra. Guadalupe Ortega Pierres), acoplado a Sefarosa 4B (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia), de acuerdo al protocolo descrito por Parkhouse (1984). El anticuerpo monoclonal NIM-M1 reconoce principalmente cuatro antígenos de superficie de la larva muscular de 47, 52, 67 y 72 kDa, así como tres antígenos de 52, 67 y 72 kDa, presentes en los productos de E/S del parásito (Arriaga y cols., 1989).

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, CA) 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, 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, 100 mL) hasta que el pH de la resina fuera de 8.3.

Posteriormente, 20 mg del Et Ts se centrifugaron a 600 g durante 10 min para descartar precipitados que pudieran interferir con la cromatografía de afinidad. El sobrenadante se filtró 2 veces, la primera mediante un filtro de 0.45 µm y la segunda con un filtro de 0.22 µm (Micropore, MA) y se pasó por la columna tres veces la resina se lavó con el amortiguador de columna hasta que la densidad óptica (DO) de las fracciones colectadas fuera de 0.0, a 280 nm en un espectrofotómetro (DU-65, Beckman, USA). La elusión del antígeno adherido a la columna

se llevó 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, 100 mL y alkali-strip: 365 μ l de dietilamina 50 mM, deoxicolato de sodio 2%, pH a 11.3, 100 mL). El cambio de amortiguador se realizó cuando la DO de las fracciones colectadas fuera muy cercana a cero. El material eluído se colectó en fracciones de 0.5 mL y la cantidad de proteínas se evaluó en espectrofotómetro 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., MO) 1M. Al término de la elución la columna se reconstituyó 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% a 4°C. De acuerdo al patrón de elución, las fracciones que contenían proteína se juntaron y se dializaron extensivamente contra una solución de Tris-HCl 20 mM pH 8.3. La concentración de proteínas de las fracciones pre-strip y alkali-strip 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, CA). Las muestras se analizaron electroforéticamente.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN LOS ANTÍGENOS TSL-1

Para la determinación de proteínas se utilizó el método de Lowry y cols. modificado (1951). 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 0.1 N (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 cincuenta volúmenes de la solución B con un volumen de la solución D (solución E). Después, se preparó una curva patrón de 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. 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 μ L de Folin-

Ciocalteu (Sigma Co., MO) diluído 1:2 con agua bidestilada y 500 μ L de SDS (Bio-Rad, CA) 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 TSL-1 se obtuvo mediante la interpolación de los valores de DO en la curva patrón de ASB que se elaboro con 10 a 100 μ g de la proteína.

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

El análisis electroforético de las dos fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad se realizó en geles de poliacrilamida-SDS al 10 % de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). A 10 μ g de las proteínas purificadas se les añadió el amortiguador de muestra 5X y se hirvió durante 3 min adicionando 10 nM de β -mercaptoetanol (Bio Rad, CA). Se empleó una cámara de electroforesis vertical miniprotean II (Bio Rad, CA). Para preparar los geles, la mezcla para el gel espaciador al 10 % (H_2O 4.0 mL; acrilamida/bisacrilamida al 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 eliminar el menisco. Después de que el gel polimerizó, 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 % (H_2O 3.4 mL; acrilamida/bisacrilamida al 30%, 0.83 mL; tris 1 M pH 6.8, 0.63 mL; SDS al 10%, 0.05 mL; persulfato de amonio al 10%, 0.05 mL; TEMED 0.005 mL), dejándose polimerizar por 45 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 8.3 y 5.0 mL de SDS al 20%, 1 L) hasta que penetraron las muestras al gel espaciador y después se aumentó el voltaje a 120 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, CA): 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), lisozima (14 kDa), aprotinina (6 kDa). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie al 0.1 % con agitación constante por 15 min a TA y después se destiñeron por 30 min con una solución de metanol (metanol al 30 %, ácido acético al 10 %).

DETECCIÓN DE ENDOTOXINA EN LOS ANTÍGENOS TSL-1

Para la evaluación de la presencia de endotoxina en los antígenos TSL-1 se utilizó el estuche de Lit E-Toxate® (Limulus amoebocyte lysate)(Sigma Co., MO). En este equipo se utilizó un estándar de endotoxina (4000 EU/mL) y se elaboraron diluciones seriadas. 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 los antígenos TSL-1 (200 ng/mL), el tubo C se incluyó como testigo, los tubos D, E, F, G, H e I contenían diferentes concentraciones de endotoxina 0.5, 0.25, 0.125, 0.06, 0.03, 0.015 EU/mL, fueron utilizados para determinar la sensibilidad de la solución de trabajo del Lit E-Toxate® y también sirvieron como positivos. Las soluciones con los antígenos TSI-1 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 Lit E-Toxate®, después de la incubación de 1 h los tubos se sacaron de la incubadora 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. Los geles suaves, la turbidez, el incremento en la viscosidad y el líquido claro se consideraron negativos. La sensibilidad del ensayo de Lit E-Toxate® fue de <0.1 EU/mL.

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CÉLULAS CEBADAS DE PERITONEO DE RATA

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague Dawley de aproximadamente 250g que se mantuvieron en cajas con tapas con filtro en cuartos aislados para minimizar las infecciones oportunistas. Las ratas se alimentaron e hidrataron en condiciones *ad libitum* en ciclos de 12 h luz-12 h oscuridad (0700-1900). Los procedimientos experimentales utilizados fueron aprobados por el Comité para el cuidado y uso de animales de laboratorio, de acuerdo a los lineamientos del Canadian Council on Animal Care y por el Instituto Mexicano del Seguro Social. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y 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, 500 mL), seguido de un masaje suave en el abdomen. En seguida 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 cónico de 50 mL (Corning Costar, NY) en hielo. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 150 g 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 a un gradiente discontinuo 30%-80% de percoll (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia), el cual se centrifugó durante 20 min a 220 g a 4°C según el protocolo descrito por Lee y cols. (1985). Las células cebadas de peritoneo se recuperaron y lavaron con 40 mL de AHT mediante centrifugación durante 5 min a 150 g y se resuspendieron en 2 mL de AHT. Se realizó la cuantificación de la viabilidad y la pureza mediante los colorantes de exclusión azul de tripan (0.4 % en PBS) y azul de toluidina (0.5 % en H₂O), respectivamente. Las células cebadas de peritoneo se dejaron estabilizar con 20 mL de AHT, durante 2 h a 4°C. Una vez estabilizadas, las células cebadas de peritoneo se lavaron con AHT, se contaron y se procedió a estimularlas con las diferentes concentraciones de los antígenos TSL-1, sustancia P (Sigma, Co., MO), ionóforo de calcio A23187 (Sigma, Co., MO), compuesto 48/80 (Sigma, Co., MO) y con el Et Nb. Sólo las células cebadas de peritoneo con viabilidad y pureza de alrededor del 98% se

utilizaron en los experimentos; la población celular contaminante de aproximadamente el 2% fue principalmente de linfocitos pequeños.

ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS CEBADAS DE PERITONEO DE RATA

En tubos Eppendorf de 0.5 mL se depositaron 25×10^3 células cebadas de peritoneo de ratas no sensibilizadas en presencia de diferentes concentraciones de los antígenos TSL-1. Los tubos se incubaron durante 10 min a 37°C en presencia de CO_2 al 5%. Posteriormente, se colocaron los tubos en hielo durante 5 min y se centrifugaron a 150 g durante 5 min a 4°C . El sobrenadante obtenido se transfirió a tubos Eppendorf. En estos ensayos, se incluyeron como controles negativos a las células cebadas de peritoneo sin tratamiento (liberación espontánea) y como controles positivos a las células cebadas de peritoneo en presencia de secretagogos conocidos: sustancia P ($10 \mu\text{M}$) y ionóforo de calcio A23187 ($2.5 \mu\text{M}$). También, se incluyeron células cebadas de peritoneo de ratas no infectadas ó infectadas con *N. brasiliensis* estimuladas con el Et Nb equivalente a 10 parásitos/mL.

ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN DE CCP TRATADAS CON DIFERENTES SECRETAGOGOS EMPLEANDO LA INCORPORACIÓN DE ROJO DE RUTENIO

La incorporación de rojo de rutenio (RR) es un parámetro rápido y específico de la activación y la desgranulación de las células cebadas de peritoneo de rata. Una vez que se las células se activan, se fusionan los gránulos secretores y el RR se pega a la heparina expuesta en la superficie celular, lo que permite la visualización del proceso de exocitosis en tiempo real (Travis y cols., 2000). Sólo las células cebadas activadas incorporan el rojo de rutenio. En estos ensayos se emplearon 25×10^3 CCP en $200 \mu\text{L}$ de AHT en presencia del colorante rojo de rutenio (Sigma Co., MO) a una concentración final de 0.005% en los pozos de una placa de cultivo celular y se dejaron en contacto con el colorante durante 5 min. Se incluyeron células cebadas de peritoneo previamente tratadas con anti-DNP ($1 \mu\text{g/mL}$) durante 2 h a 37°C . Posteriormente, se adicionaron los siguientes secretagogos

en cada uno de los pozos de la placa: antígenos TSL-1 (30 ng/mL), ionóforo de calcio A23187 (2.5 μ M), compuesto 48/80 (1 μ g/mL) y a las células cebadas de peritoneo tratadas con IgE anti-DNP se les añadió DNP-HAS (50 ng/mL). La incubación con los diferentes secretagogos fue de 30 min a 37°C. Como controles negativos de activación se incluyeron células cebadas de peritoneo en presencia solo del rojo de rutenio en AHT. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se evaluó al microscopio óptico la activación de las células cebadas de peritoneo por los diferentes secretagogos al incorporar el colorante rojo de rutenio. Los resultados se presentan como el porcentaje de células teñidas determinadas en 3 experimentos independientes.

CUANTIFICACIÓN DE HISTAMINA LIBERADA POR CÉLULAS CEBADAS DE PERITONEO

La liberación de histamina, se midió con el ensayo fluorométrico descrito por Shore y cols. (1959) con algunas modificaciones. En este ensayo se utilizaron los sobrenadantes y los precipitados celulares obtenidos de las células cebadas de peritoneo estimuladas con diferentes concentraciones de los antígenos TSL-1. Para esto, los precipitados de las células cebadas se resuspendieron en 200 μ l de AHT y los tubos se hirvieron durante 10 min, colocándose posteriormente en hielo. A todos los tubos que contenían sobrenadantes y los precipitados celulares se les agregó 20 μ L de ácido tricloracético (Boehinger Mannheim, Alemania) al 25%, se agitaron, se incubaron 10 min y se centrifugaron a 600 g 10 min. Se transfirieron 190 μ L del sobrenadante de cada tubo en una placa Fluoro Nunc MaxiSorb (Nunc, Inc. Dinamarca). Se agregaron 20 μ L de NaOH 4N (J. T. Baker, México), se agito lentamente 5 min, se agregó a cada pozo 50 μ L del o-ftaldialdehído (Sigma, Co., MO, 1.3 mg/mL de metanol grado espectrofluorométrico; Sigma Co., MO) y se agitaron lentamente durante 4 min. Para completar la reacción se agregaron 26 μ L de HCl 3N (Merck, México) a cada pozo y se continuó agitando durante 20 min adicionales. El volumen final por pozo fue de 286 μ L. Con esto se formó un producto fluorescente estable a pH ácido cuya intensidad se determinó en un espectrofluorómetro Fluoroskan II (Lab. System, Finlandia), usando un juego de

filtros de emisión a 430 nm y de excitación a 360 nm. Los porcentajes de histamina liberada se calcularon utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de histamina liberada} = \text{DO sobrenadante} / \text{Total (DO sobrenadante} + \text{DO precipitados celulares)} \times 100$$

La liberación espontánea de histamina se obtuvo a partir de las células cebadas de peritoneo en presencia del AHT.

CUANTIFICACIÓN DE β -HEXOSAMINIDASA LIBERADA POR CÉLULAS CEBADAS DE PERITONEO

La actividad de la enzima β -hexosaminidasa se midió de acuerdo a lo descrito por Cromwell y cols. (1991). En este ensayo, al igual que con el de la determinación de histamina liberada, se utilizaron los sobrenadantes y los precipitados obtenidos de las células cebadas de peritoneo estimuladas con cada una de las diferentes concentraciones de los antígenos TSL-1 y de los controles positivos y negativos (liberación espontánea). Los precipitados de las células cebadas de peritoneo se resuspendieron en 200 μ L de AHT y se llevaron a cabo 3 ciclos de congelación/descongelación, centrifugándose posteriormente 10 min a 220 g a 4°C. Posteriormente, se tomaron 50 μ L del sustrato fluorescente 4-metilumbeliferil N-acetil-B-D-glucosamida (Sigma, Co. USA) (sustrato 4-metilumbeliferil N-acetil-B-D-glucosamida 37.94 mg/mL de DMSO el cual se agregó posteriormente a 99 mL de amortiguador de citratos 0.2 M, pH 4.5) y se agregaron a los pozos de las placas Fluoro Nunc MaxiSorb (Nunc, Inc. Dinamarca). Así mismo, se adicionaron 50 μ L de las muestras de los sobrenadantes y los precipitados celulares y se incubó durante 2 h a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se detuvo la reacción mediante la adición de 100 μ L de Tris base 0.2 M, la intensidad de fluorescencia se determinó en un espectrofluorómetro Fluoroskan II (Lab. System, Finlandia), a una emisión de 450 nm y excitación de 356 nm. Los resultados se expresaron como porcentajes de actividad de la enzima mediante la fórmula descrita previamente para la determinación de histamina liberada.

CINÉTICA DE SECRECIÓN DE HISTAMINA INDUCIDA POR LOS ANTÍGENOS TSL-1 Y LOS DIFERENTES SECRETAGOGOS

Se incubaron células cebadas de peritoneo de ratas no infectadas (25×10^3) a diferentes tiempos en presencia de los antígenos TSL-1 (30 ng/mL) y de la sustancia P (10 μ M). La activación se interrumpió depositando los tubos en hielo, y posteriormente separando las fracciones solubles y particuladas a 150 g durante 5 min a 4°C. La determinación de histamina se realizó como se mencionó antes. En estos ensayos se incluyó un sistema dependiente de IgE, para lo cual las células cebadas de peritoneo de ratas infectadas con *N. brasiliensis* se incubaron con 10 Eq/mL del Et Nb. Los valores máximos de histamina se determinaron de acuerdo a cada secretagogo, tomando el valor porcentual más alto de la liberación de histamina como el 100% y los valores obtenidos en la cinética ajustados a este 100 %.

EFFECTO DE LA TOXINA DE *Bordetella pertussis* EN LA LIBERACIÓN DE HISTAMINA POR CÉLULAS CEBADAS DE PERITONEO ESTIMULADAS CON LOS ANTÍGENOS TSL-1

Con el objeto de evaluar si en la activación de las células cebadas de peritoneo por los antígenos TSL-1 está involucrado un sistema de proteínas G sensible a la toxina de *B. pertussis*, se analizó el efecto del tratamiento de 25×10^3 células cebadas con diferentes concentraciones de la toxina (1-100 ng/mL, Sigma, Co., USA) durante 2 h a 37°C, siguiendo el protocolo recomendado por Bueb y cols. (1990). Después de incubar con la toxina, las células cebadas se centrifugaron a 150 g por 5 min y se lavaron 3 veces con 1 mL de AHT. Posteriormente se incubaron con los antígenos TSL-1 (30 ng/mL) durante 10 min a 37°C. Las reacciones se terminaron por centrifugación a 220 g 5 min y se separaron los precipitados celulares de los sobrenadantes. Como controles se incluyeron células cebadas incubadas con la toxina pero sin estímulo (liberación espontánea) y células cebadas incubadas con la toxina en presencia de la sustancia P (10 μ M). Con objeto de obtener información del efecto de la toxina en un sistema dependiente de IgE se incluyeron células cebadas de peritoneo obtenidas de ratas

sensibilizadas con *N. brasiliensis* y tratadas con 10 Eq/mL del Et Nb. La determinación de histamina se realizó como se mencionó con anterioridad.

EFFECTO DE LA NEURAMINIDASA V EN LA LIBERACIÓN DE HISTAMINA POR CÉLULAS CEBADAS DE PERITONEO ESTIMULADAS CON LOS ANTÍGENOS TSL-1.

Para evaluar si los antígenos TSL-1 reconocen residuos de ácido siálico (ácido n-acetilneuramínico) en la superficie de las células cebadas de peritoneo, se analizó el efecto del tratamiento previo con diferentes concentraciones de neuraminidasa V. Para lo anterior se incubaron 25×10^3 células cebadas de peritoneo con neuraminidasa V (0.01-0.1 U/mL, Sigma, Co., MO) durante 1 h a 37°C, siguiendo el protocolo recomendado por Coleman y cols. (1986). Después de que las células cebadas de peritoneo se incubaron con la neuraminidasa V, se lavaron 3 veces con 1 mL de AHT y se incubaron con los antígenos TSL-1 (30 ng/mL), durante 10 min a 37°C. Las reacciones se terminaron por centrifugación a 220 g durante 5 min y se separaron las fracciones solubles y particuladas. Como controles se incluyeron células cebadas de peritoneo incubadas con la neuraminidasa V pero sin estímulo (liberación espontánea) y células cebadas de peritoneo tratadas con neuraminidasa V e incubadas con la sustancia P (10 μ M). Además, con objeto de obtener información en un sistema dependiente de IgE, se incluyeron células cebadas de peritoneo obtenidas de ratas sensibilizadas con *N. brasiliensis* incubadas con la enzima en presencia de 10 Eq/mL del Et Nb. La determinación de histamina se realizó como se mencionó con anterioridad.

ANÁLISIS DEL ESTALLIDO RESPIRATORIO EN CÉLULAS CEBADAS ACTIVADAS CON LOS ANTÍGENOS TSL-1

Un proceso importante en la activación de las células cebadas es el estallido respiratorio, por lo cual se evaluó la actividad de la NADPH oxidasa siguiendo el protocolo descrito por Vowells y cols. (1995), basado en la oxidación

de dihidroxirodamina (DHR) 123, originalmente descrito para granulocitos. Para lo cual, $0.5-1 \times 10^6$ células cebadas de peritoneo se incubaron con $50 \mu\text{M}$ DHR 123 (Molecular Probes Inc., OR) a TA durante 10 min. Posteriormente, las células cebadas de peritoneo se incubaron con $1 \mu\text{g/mL}$ del ionoforo de calcio A23187, ó con 30 ng/mL de los antígenos TSL-1, o una combinación de ambos, durante 10 min a TA. Después de la estimulación, las especies de oxígeno reactivo (ROS) producidas por las células cebadas de peritoneo provocaron la oxidación del colorante no fluorescente DHR 123 a rodamina 123 fluorescente. La señal fluorescente de rodamina 123 emitida por las células estimuladas se midió en 1×10^4 células mediante el FACScan (Becton Dickinson, CA). En algunos experimentos, las células cebadas de peritoneo se preincubaron durante 15 min a TA con L-NAME (N-nitro-L-arginina metil ester; Sigma Co., MO) un inhibidor de la oxido nítrico sintasa a una concentración de $10 \mu\text{M}$ y se estimularon posteriormente con $1 \mu\text{g/mL}$ de A23187 o con 30 ng/mL de los antígenos TSL-1 ó la combinación de los dos. Las células incubadas con DHR y L-NAME se utilizaron como control de fluorescencia de fondo en la ausencia de estímulo.

MOVILIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR MEDIANTE LA ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS CEBADAS DE PERITONEO POR LOS ANTÍGENOS TSL-1

Como parte del análisis de la activación de las células cebadas de peritoneo por los antígenos TSL-1, se determinó si existe flujo de calcio durante la activación de las células, siguiendo el protocolo descrito por Niyonsaba y cols. (2001). Para lo cual, se incubaron $0.5-1 \times 10^6$ células cebadas de peritoneo con $4 \mu\text{M}$ del fluorocromo FURA 2AM (Molecular Probes Inc., OR) durante 30 min a 37°C . Las células se lavaron tres veces con 1 mL de AHT y se dejaron reposar durante otros 30 min. Después del periodo de incubación, las células cebadas de peritoneo se depositaron en la celda del fluorómetro que contenía un imán pequeño y que permitía el mezclado lento y constante de las células cebadas de peritoneo mediante el sistema de fluorescencia PTI (Photon Technology International, NJ) versión 1.4 empleando el análisis con el programa FELIX. Las células

cebadas de peritoneo se mantuvieron en la cubeta del fluorómetro durante 20 min a 37°, se agregaron 30 ng/mL de los antígenos TSL-1 y se incubó 10 min con agitación y temperatura constante. Posteriormente, se agregó 1 µg/mL del compuesto 48/80 y se incubó durante 10 min adicionales (control positivo). Paralelamente se realizaron experimentos en los cuales se utilizaron células cebadas de peritoneo obtenidas de ratas infectadas con *T. spiralis*, las cuales también se estimularon con 30 ng/mL de los antígenos TSL-1. Además se realizaron experimentos utilizando el modelo de *N. brasiliensis* dependiente e independiente de IgE. Los resultados obtenidos se determinaron a partir de la proporción de fluorescencia máxima y mínima mediante la adición de Tritón X-100 (0.4 %) y 0.9 M EGTA /10 mM Tris pH 8.8, respectivamente. Los valores de fluorescencia se obtuvieron a una excitación de 340 nm y 380 nm y la emisión a 510 nm, colectándose cada segundo. Los resultados se expresaron como concentración de calcio intracelular calculada por la fórmula de Grynkiewicz y cols, (1985), que es $[Ca^{2+}]_i = K_d(R - R_{min}) / (R_{max} - R)(F_{f2}/F_b2)$ donde K_d es la constante de unión para FURA 2AM, R es la proporción de fluorescencia para el tratamiento, R_{min} es la proporción mínima de la fluorescencia a 340 y 380 nm, R_{max} es la proporción máxima de la fluorescencia a 340 y 380 nm, F_{f2} es la fluorescencia a 340 nm del FURA 2AM libre, F_b2 es la fluorescencia a 340 nm del FURA 2AM unido a calcio intracelular.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se presentan como la media ± error estándar. Las diferencias se evaluaron por ANOVA de dos vías y por la prueba de comparaciones múltiples de Dunnet (Zar, 1994).

RESULTADOS

ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LOS ANTÍGENOS TSL-1

A partir de 20 mg del Et Ts de las larvas musculares de *T. spiralis* se purificaron los antígenos TSL-1 mediante cromatografía de afinidad, empleando al anticuerpo monoclonal NIM-M1. Las fracciones obtenidas con los dos amortiguadores empleados se concentraron y se analizaron por electroforesis. Se obtuvieron 5 proteínas con pesos moleculares de 47, 52, 67, 72 y 105 kDa (Fig. 4) que corresponden a los antígenos (TSL-1) previamente mostrados por Ortega-Pierres y cols. (1989). Las 5 proteínas obtenidas en la fracción alkali strip se utilizaron en los ensayos de estimulación de células cebadas de peritoneo de rata.

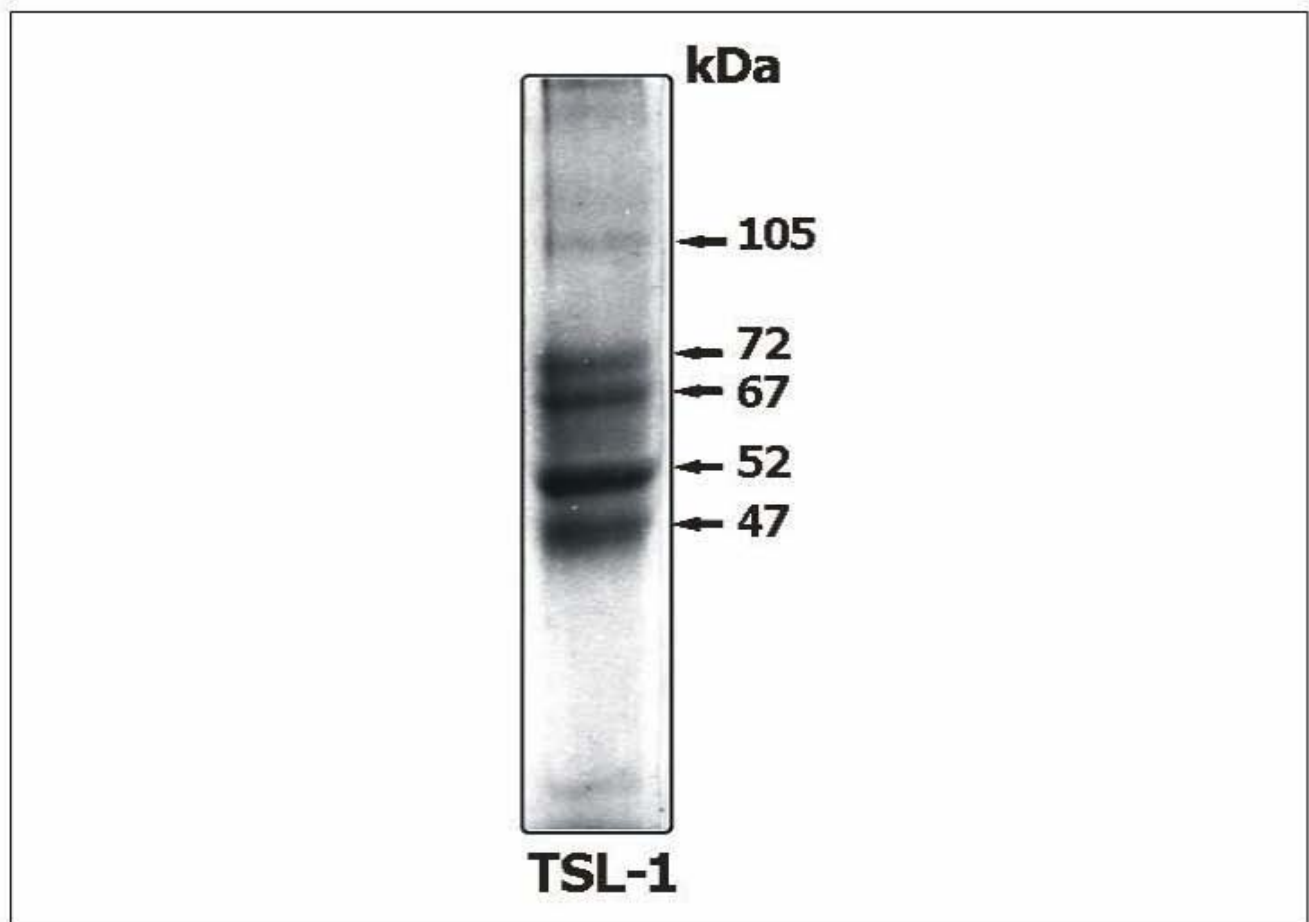


Figura 4. Análisis electroforético de los antígenos TSL-1 en geles de poliacrilamida-SDS al 10 % bajo condiciones desnaturalizantes. Los antígenos TSL-1 se purificaron mediante cromatografía de afinidad empleando al anticuerpo monoclonal NIM-M1 acoplado a Sefarosa 4B. Se muestran los antígenos TSL-1 purificados de la fracción alkali-strip.

CUANTIFICACIÓN DE ENDOTOXINA PRESENTE EN LOS ANTÍGENOS TSL-1

La presencia de endotoxina en los antígenos TSL-1 se evaluó mediante el estuche de Lit E-Toxate®. Los resultados indicaron la presencia de menos de 0.015 UE/mL, que se considera como valor negativo de acuerdo a las instrucciones del mismo. Este resultado fue reproducible en tres experimentos realizados por duplicado cada uno.

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CÉLULAS CEBADAS DE PERITONEO DE RATA

El uso de gradientes discontinuos de Percoll (30% -80%) para el aislamiento de células cebadas de peritoneo de ratas infectadas y células cebadas de peritoneo de ratas no infectadas dio un valor promedio de aproximadamente 1×10^6 células cebadas de peritoneo/rata no infectada y de aproximadamente 2×10^6 células cebadas de peritoneo/rata infectada. La pureza con la que se obtuvieron las células fue del 99 % y la viabilidad promedio fue del 98 % en ambos casos. Las células cebadas de peritoneo que se obtenían con valores menores del 95 % de viabilidad o de pureza se desecharon y las preparaciones celulares que mostraron al microscopio presencia de desgranulación no fueron utilizadas en los ensayos de activación.

ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS CEBADAS DE PERITONEO POR ANTÍGENOS TSL-1 E INCORPORACIÓN DE ROJO DE RUTENIO

La utilización del rojo de rutenio (RR) permitió determinar la activación de las células cebadas de peritoneo por los antígenos TSL-1. El porcentaje promedio de las células cebadas de peritoneo que se activaron con los antígenos TSL-1 (30 ng/mL) fue 30 ± 7 % (Fig. 5A). Los valores obtenidos para los controles positivos fueron de 85 ± 8 % para el ionóforo de calcio A23187 (Fig. 5B), 95 ± 2 % para el compuesto 48/80 (Fig. 5C) y 92 ± 11 % para el IgE/anti IgE (Fig. 5D). En el control negativo de células cebadas de peritoneo sin tratamiento sólo se activó el 6 ± 6 % de células cebadas (Fig. 5E). El porcentaje de las células cebadas de peritoneo teñidas con el rojo de rutenio posterior al tratamiento con los antígenos TSL-1 fue significativamente diferente del control negativo ($p < 0.01$).

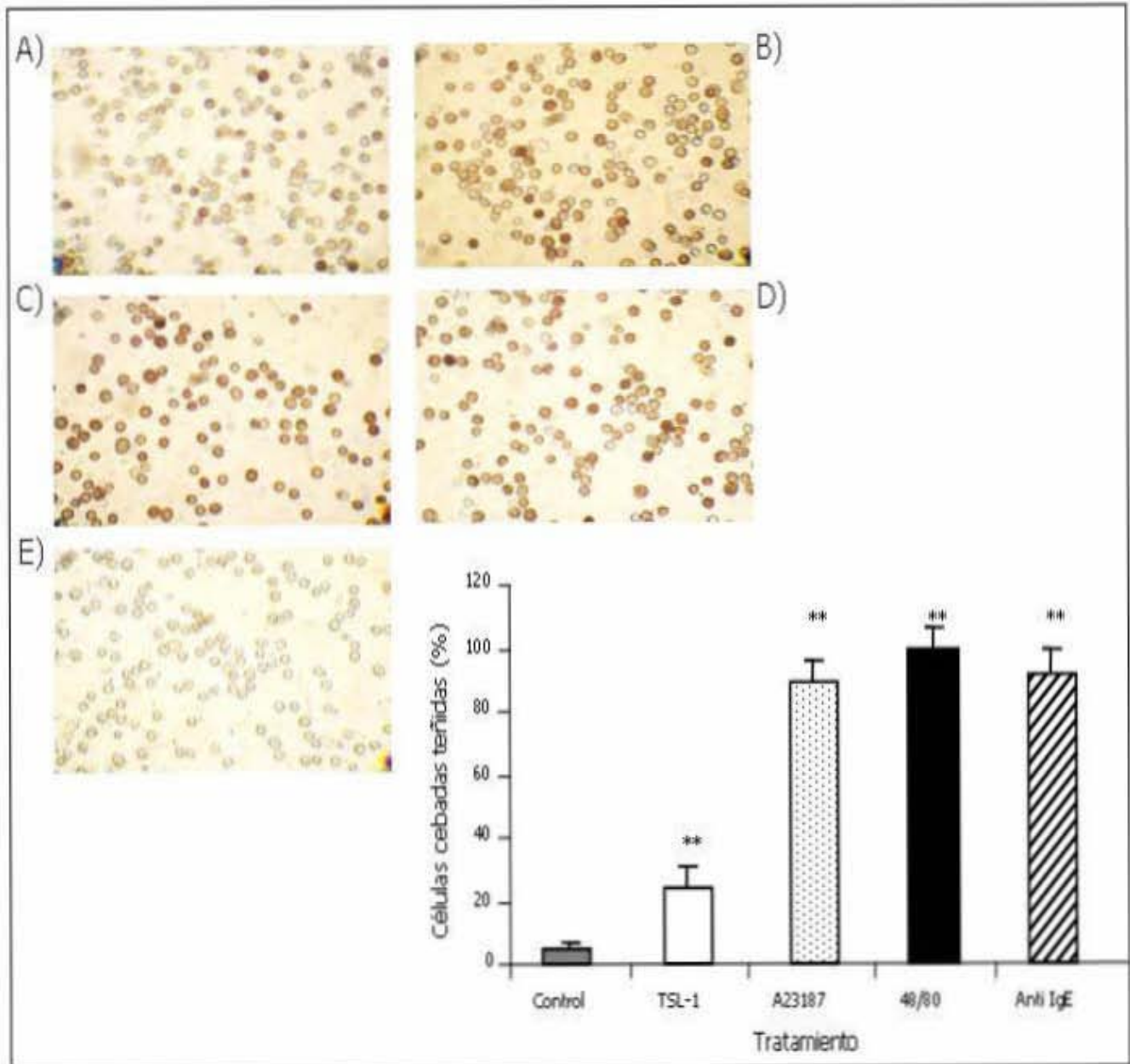


Figura 5. Células cebadas de peritoneo de ratas no sensibilizadas estimuladas con diferentes secretagogos. Se preincubaron las CCP con 0.005% de rojo de rutenio durante 5 min y posteriormente se adicionaron 30 ng/mL de los antígenos TSL-1 (A, barra blanca), 2.5 μ M de ionofóro de calcio A23187 (B, barra punteada), 1 μ g/mL del compuesto 48/80 (C, barra negra) ó 1 μ g/mL de anti-IgE (D, barra con líneas diagonales) a 37°C por 30 min. Las células cebadas de peritoneo incubadas con el colorante rojo de rutenio sin tratamiento se usaron como controles negativos (E). Esta figura es representativa de tres experimentos independientes realizados por duplicado (* p =0.01).

CUANTIFICACIÓN DE HISTAMINA Y β -HEXOSAMINIDASA LIBERADA POR CÉLULAS CEBADAS DE PERITONEO ESTIMULADAS CON LOS ANTÍGENOS TSL-1

Con la finalidad de examinar la capacidad de los antígenos TSL-1 para estimular a las células cebadas de peritoneo no sensibilizadas, las células se trataron con diferentes concentraciones de los antígenos TSL-1 y se determinó la liberación de histamina y β -hexosaminidasa mediante ensayos de fluorometría. En la figura 6A se muestran los valores promedio de histamina liberada por células cebadas de peritoneo de ratas normales, no infectadas con el parásito, estimuladas con diferentes concentraciones (1-100 ng/mL) de los antígenos TSL-1 de *T. spiralis*. Los máximos niveles de histamina liberados se observaron a 30 ng/mL (30 ± 5.3 %, n=13). En estos ensayos se incluyó como control positivo al ionóforo de calcio A23187 (2.5 μ M), observándose una liberación de histamina del 70 ± 2.8 % y como control negativo células cebadas de peritoneo no estimuladas, obteniéndose la liberación espontánea de aproximadamente 6 ± 0.4 %. Así mismo, se incluyeron células cebadas de peritoneo de rata no sensibilizadas tratadas con el Et Nb, mostrándose que la respuesta de histamina liberada por estos antígenos no es diferente a la histamina liberada espontáneamente (6 ± 2 %), sin embargo, si se indujo la liberación de histamina por las células cebadas sensibilizadas con el parásito, incubadas con el Et Nb (32 ± 8 %). La prueba estadística de comparación múltiple de Dunnet mostró que la histamina liberada obtenida a 5, 10 y 30 ng/mL de los antígenos TSL-1 fue estadísticamente significativa con respecto a la liberación espontánea. Por lo tanto en los experimentos subsecuentes se usaron 30 ng/mL de los antígenos TSL-1 para analizar los mecanismos de activación de células cebadas de peritoneo. Al determinar la liberación de β -hexosaminidasa por células cebadas de peritoneo estimuladas con los antígenos TSL-1 se observó que a diferencia de la secreción de histamina, los antígenos TSL-1 no indujeron la liberación de esta molécula (Fig. 6B) pues los valores obtenidos fueron similares a los obtenidos con las células cebadas de peritoneo controles (3 ± 0.3 %, n=8). Sin embargo, se observó la liberación de β -hexosaminidasa por las células cebadas de peritoneo tratadas con el ionóforo de calcio

A23187 (2.5 μ M) y por células cebadas de peritoneo sensibilizadas con *N. brasiliensis* estimuladas con el Et Nb (10 Eq/mL) con 64 ± 6 % y 68 ± 8 % respectivamente (n=8).

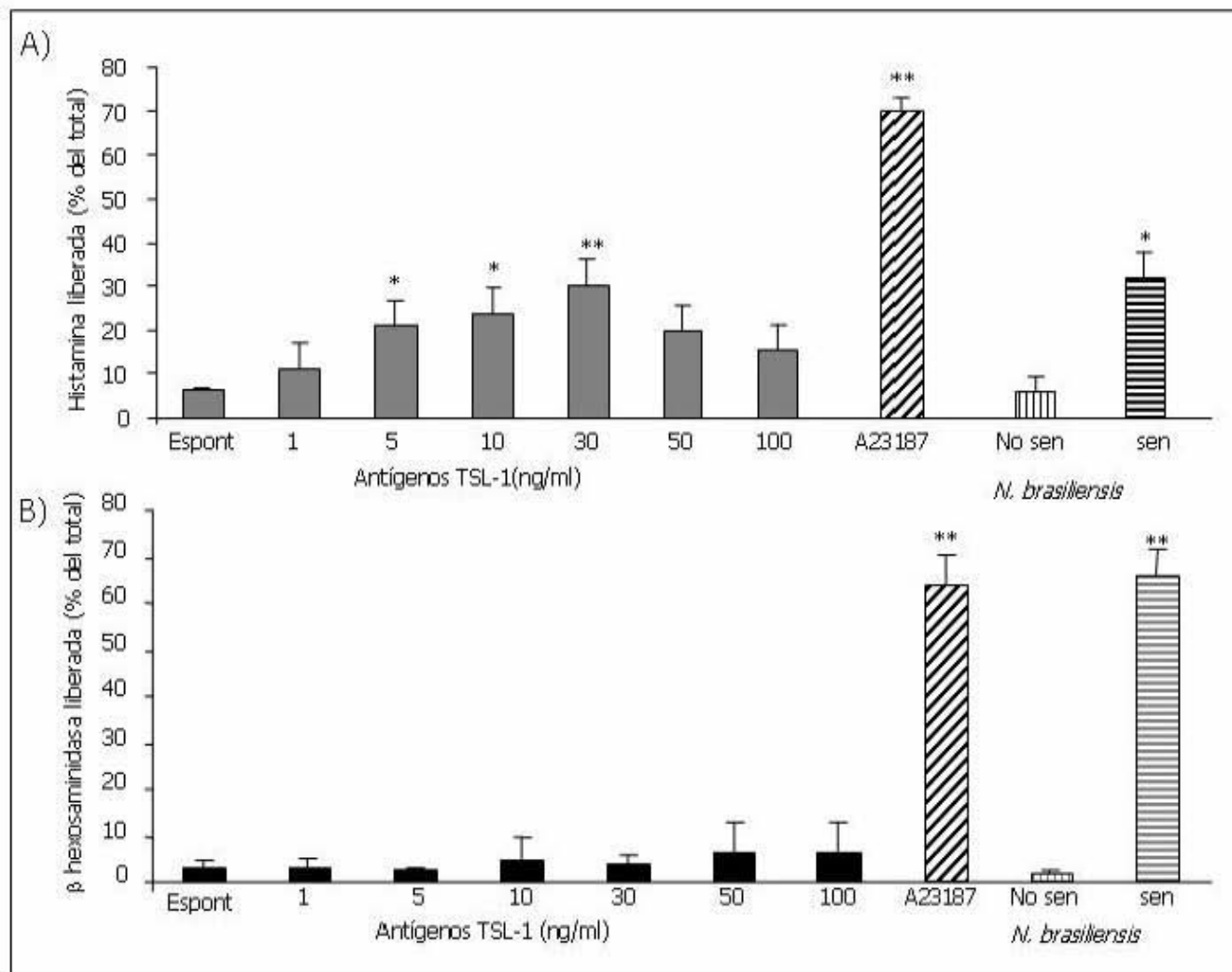


Figura 6. Media \pm error estándar de la secreción de histamina (A, barras grises) y β -hexosaminidasa (B, barras negras) por células cebadas de peritoneo de ratas no sensibilizadas activadas con los antígenos TSL-1. Las células cebadas de peritoneo se incubaron con diferentes concentraciones (1-100 ng/mL) de los antígenos TSL-1 a 37°C durante 10 min. Se muestran los resultados obtenidos en la liberación espontánea (esport) de histamina (n=13; *p<0.05, ** p<0.01) y β -hexosaminidasa (n=8) por las células cebadas de peritoneo no sensibilizadas, así como de las expuestas a los antígenos de *N. brasiliensis* (no sen, 10 Eq/mL, barras con líneas verticales). También se muestran los resultados obtenidos por los controles positivos, células cebadas de peritoneo expuestas al ionóforo de calcio A23187 (2.5 μ M, barras con líneas diagonales) y células cebadas de peritoneo sensibilizadas con *N. brasiliensis* (sen, barras con líneas horizontales) y estimuladas con el antígeno homólogo.

Para descartar la posibilidad de la existencia de algún tipo de inhibidor en los antígenos TSL-1, que afectara la liberación de β -hexosaminidasa, se realizaron ensayos de activación de células cebadas de peritoneo estimuladas con diferentes concentraciones del ionóforo de calcio A23187 (0.02, 0.25 y 2.5 μ M) en ausencia (Fig. 7A) y en presencia de los antígenos TSL-1 (Fig. 7B). Los resultados mostraron que los porcentajes de β -hexosaminidasa liberados con 0.02, 0.25 y 2.5 μ M del ionóforo de calcio A23187, fueron del $13 \pm 3 \%$, $74 \pm 4 \%$ y $79 \pm 4 \%$ respectivamente y que en presencia de los antígenos TSL-1 los valores obtenidos fueron de $19 \pm 16 \%$, $75 \pm 5 \%$ y $72 \pm 7 \%$ respectivamente (n=3). Lo anterior sugiere que en efecto, los antígenos TSL-1 no inducen liberación de β -hexosaminidasa y que esto no es debido a la presencia de inhibidores. De manera paralela se evaluó la liberación de histamina y los resultados mostraron liberación de histamina en $24 \pm 21 \%$, $86 \pm 4 \%$ y $84 \pm 4 \%$, para las concentraciones de 0.02, 0.25 y 2.5 μ M del ionóforo de calcio A23187 y $11 \pm 3 \%$, $86 \pm 2 \%$ y $85 \pm 3 \%$ para 0.02, 0.25 y 2.5 μ M del ionóforo de calcio A23187 y en presencia de 30 ng/mL de los antígenos TSL-1 en ambos casos.

Como control interno se evaluó la liberación de histamina y de β -hexosaminidasa en un modelo de activación dependiente de IgE con células cebadas de peritoneo sensibilizadas con *N. brasiliensis* y estimuladas con diferentes concentraciones (5, 10 y 20 Eq/mL) del Et Nb (Fig. 7C). La liberación de histamina fue del $23 \pm 7 \%$, al $32 \pm 6 \%$ (n=3) con las diferentes concentraciones. Los valores de liberación espontánea para histamina fueron del $6 \pm 0.5 \%$ y los valores del control positivo A23187 fueron del $85 \pm 0.5 \%$. Con respecto a la liberación de β -hexosaminidasa se observaron valores del $54 \pm 7 \%$ al $66 \pm 4 \%$ (n=3) con las concentraciones antigénicas usadas. Los resultados de liberación espontánea para β -hexosaminidasa fueron del $6 \pm 0.3 \%$ y los valores del control positivo A23187 fueron del $82 \pm 2 \%$.

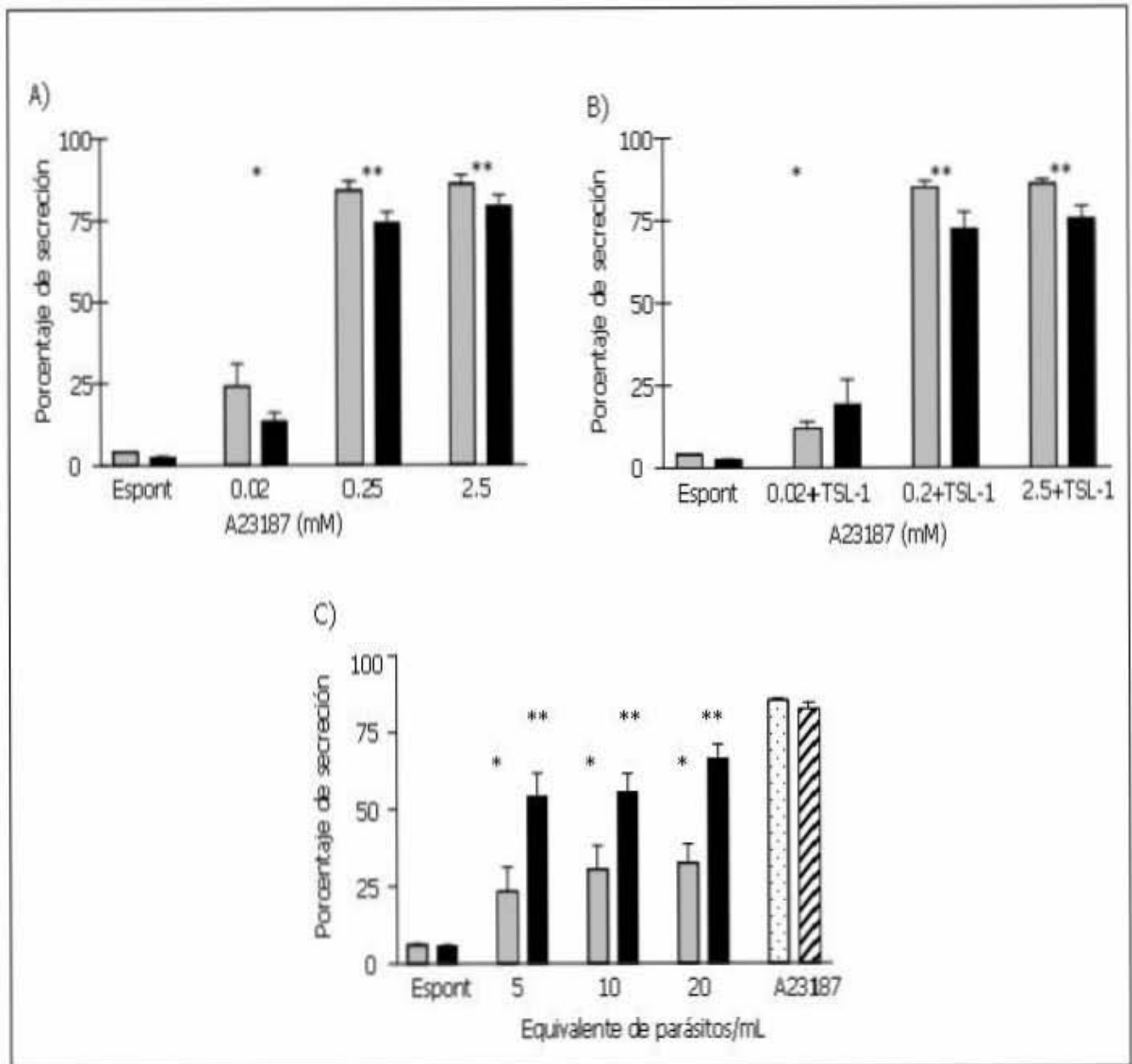


Figura 7. Porcentaje de histamina (barras grises) y β -hexosaminidasa (barras negras) liberadas por células cebadas de peritoneo de ratas no sensibilizadas incubadas con diferentes concentraciones del ionóforo de calcio A23187 (0.02, 0.25, 2.5 μ M) en ausencia (A) y en presencia de 30 ng/mL de los antígenos TSL-1 (B). (C) Secreción de histamina (barras grises) y β -hexosaminidasa (barras negras) liberadas por células cebadas de peritoneo de ratas infectadas con *N. brasiliensis* incubadas con diferentes concentraciones del Et Nb (5, 10 y 20 Eq/mL), se reporta también la liberación de histamina (barra con puntos) y β -hexosaminidasa (barra con líneas diagonales) en presencia del ionóforo de calcio A23187 (2.5 μ M) (**, $p=0.01$; *, $p=0.05$ con respecto al control).

CINÉTICA DE SECRECIÓN DE HISTAMINA POR CCP

Se evaluó la cinética de secreción de histamina por las células cebadas de peritoneo tratadas con los antígenos TSL-1 y con el secretagogo sustancia P (10 μ M) (Fig. 8), realizándose ensayos cinéticos. Los resultados de liberación de histamina por los antígenos TSL-1 fueron similares a los observados con la sustancia P, obteniéndose 94 y 100% respectivamente, con la liberación máxima de histamina los 10 seg. Como control de estimulación dependiente de IgE se incluyeron células cebadas de peritoneo de ratas infectadas con *N. brasiliensis* estimuladas con 10 Eq/mL del Et Nb, alcanzando 45 % y 84 % de liberación máxima de histamina a los 5 y 10 seg respectivamente.

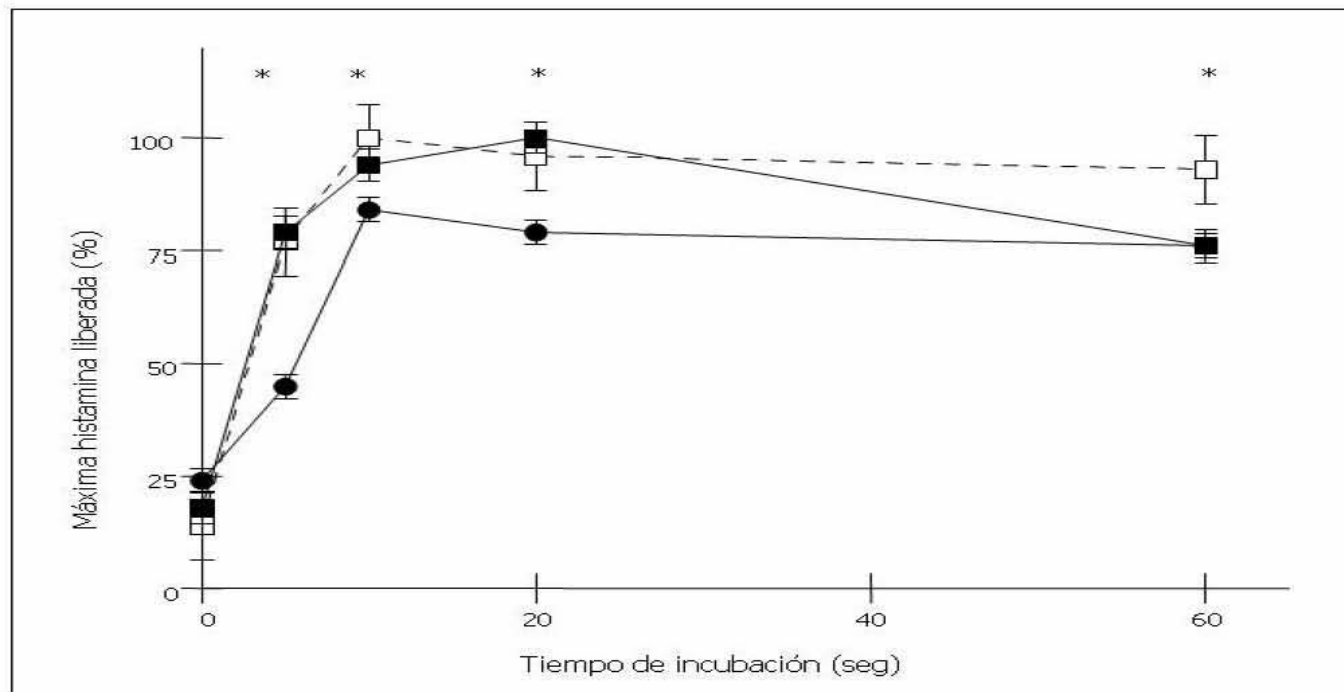


Figura 8. Media \pm error estándar de la secreción de histamina por células cebadas de peritoneo de ratas no sensibilizadas activadas por los antígenos TSL-1 (■, 30 ng/mL) y sustancia P (□, 10 μ M). Se incluyó un sistema de activación dependiente de IgE en el cual las células cebadas de peritoneo sensibilizadas por *N. brasiliensis* se estimularon con el antígeno homólogo (●, 10 Eq/mL). Se realizaron 5 a 7 experimentos para cada secretagogo. Los valores obtenidos para los antígenos TSL-1 y la sustancia P son significativamente diferentes a los obtenidos para el modelo dependiente IgE con el Et Nb a 5 seg (*, $p < 0.05$). Los valores máximos de histamina se determinaron de acuerdo a cada secretagogo, tomando el valor porcentual más alto de la liberación de histamina como el 100% y los valores obtenidos en la cinética ajustados a este 100 % de histamina liberada.

MODULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE HISTAMINA POR EL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS CEBADAS DE PERITONEO CON LA TOXINA DE *Bordetella pertussis* Y NEURAMINIDASA V

Considerando que los antígenos TSL-1 activan a las células cebadas de peritoneo no sensibilizadas con una cinética de activación similar a la de la sustancia P y que en la liberación de histamina inducida por la sustancia P se encuentra involucrado un sistema de proteínas G sensibles a la toxina de *B. pertussis*, se procedió a evaluar el efecto de la toxina en la secreción de histamina inducida por 30 ng/mL de los antígenos TSL-1. Como puede observarse en la figura 9 el tratamiento con diferentes concentraciones (1-100 ng/mL) de la toxina de *B. pertussis* inhibe la liberación de histamina por los antígenos TSL-1 de manera similar a sus efectos en la secreción de histamina inducida por la sustancia P. La máxima inhibición de histamina para los antígenos TSL-1 y la sustancia P ocurrió a los 100 ng/mL de la toxina de *B. pertussis* (con valores de 8 y 18 % de histamina liberada; inhibición del 73 ± 8.1 %, n=7 y 72 ± 5.7 %, n=10, respectivamente). Con las células cebadas de peritoneo de ratas sensibilizadas con *N. brasiliensis* la respuesta al Et Nb sólo alcanzó una inhibición máxima del 50 ± 5.1 % (14 % de histamina liberada; n=6). La magnitud de la inhibición en la secreción de histamina por la toxina de *B. pertussis* fue significativamente mayor para los antígenos TSL-1 y sustancia P que para la secreción inducida por *N. brasiliensis* ($p < 0.05$).

En vista de que la secreción de histamina inducida por la sustancia P es sensible a inhibición mediante la eliminación de los residuos de ácido siálico de la superficie celular mediante el tratamiento con neuraminidasa V, se evaluó el efecto de estos residuos en la activación de células cebadas de peritoneo por los antígenos TSL-1. Para esto se incubaron a las células cebadas de peritoneo no sensibilizadas con diferentes concentraciones de neuraminidasa V (0.01 a 0.1 U/mL), posteriormente se lavaron y se expusieron a los antígenos TSL-1 (30 ng/mL) y ó a la sustancia P (10 μ M). Los resultados (Fig. 10) muestran una inhibición de la liberación de histamina del 32 ± 2.2 % (13 % de histamina liberada; n=10) y 57 ± 6.3 % (44 % de histamina liberada; n=12) a 0.1 U/mL de neuraminidasa V, para la sustancia P y los antígenos TSL-1 respectivamente.

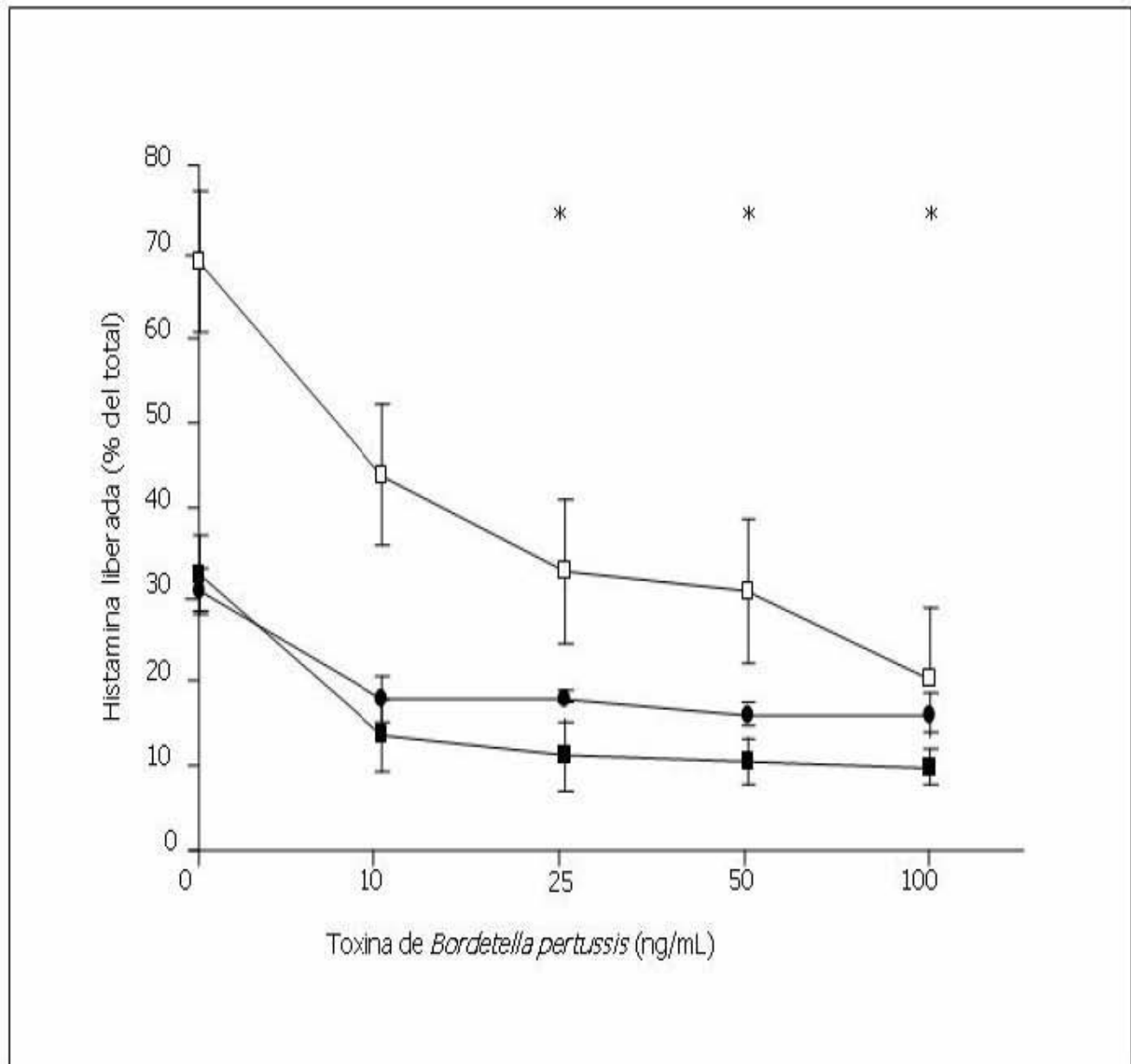


Figura 9. Efecto del pretratamiento de las células cebadas de peritoneo con la toxina de *Bordetella pertussis* en la secreción de histamina inducida por los antígenos TSL-1 (■, 30 ng/mL), sustancia P (□, 10 μ M) y un sistema de activación dependiente de IgE. Después del tratamiento de las células cebadas no sensibilizadas con la toxina de *B. pertussis* durante 2 h a 37°C, se incubaron con cada secretagogo durante 10 min a 37°C. Las células cebadas de peritoneo sensibilizadas con *N. brasiliensis* se pretrataron también con la toxina de *B. pertussis* y se estimularon con el antígeno homólogo (●, 10 Eq/mL). Los valores graficados son la media \pm error estándar; n=6 a 10 experimentos para cada secretagogo. Los valores obtenidos para los antígenos TSL-1 y la sustancia P son significativamente diferentes a los obtenidos para el modelo dependiente IgE con los antígenos de *N. brasiliensis* (*, p<0.05).

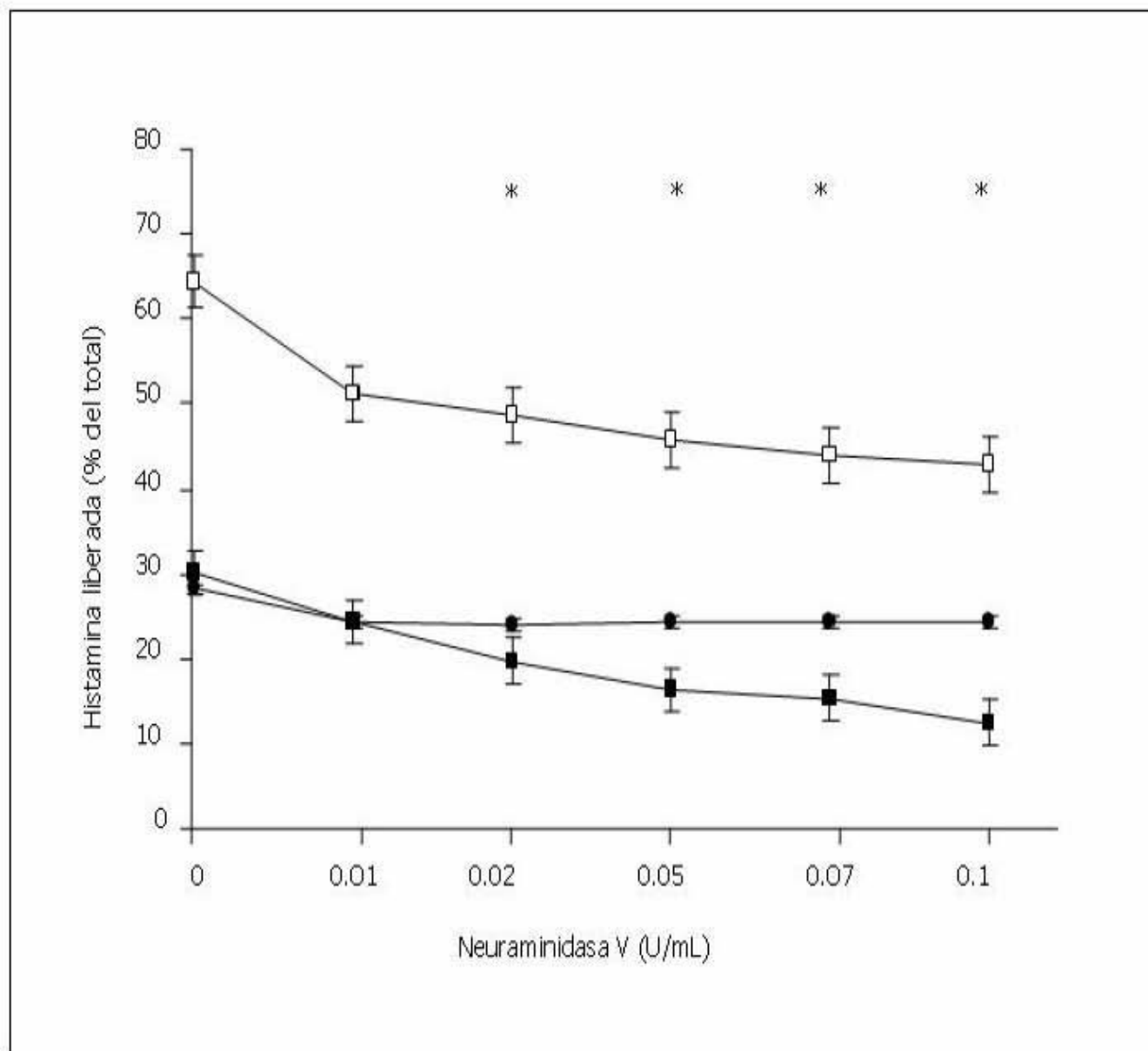


Figura 10. Efecto del pretratamiento de las células cebadas de peritoneo con la enzima neuraminidasa V en la secreción de histamina por los antígenos TSL-1 (■, 30 ng/mL) y sustancia P (□, 10 μ M). Después del tratamiento de las células cebadas no sensibilizadas con neuraminidasa V durante 1 h a 37°C, las células cebadas se lavaron y se incubaron con los secretagogos a 37°C por 10 min. Como control dependiente de IgE se incluyeron células cebadas de peritoneo de ratas sensibilizadas con *N. brasiliensis* que se pretrataron con neuraminidasa V y se estimularon con el antígeno homólogo (●, 10 Eq/mL). Los valores graficados son la media \pm error estándar; n=10 a 12 experimentos para cada secretagogo. Los valores obtenidos para los antígenos TSL-1 y la sustancia P son significativamente diferentes a los obtenidos para el modelo dependiente IgE con los antígenos de *N. brasiliensis* (*, $p < 0.05$).

EVALUACIÓN DEL ESTALLIDO RESPIRATORIO POR LAS CÉLULAS CEBADAS DE PERITONEO EXPUESTAS A LOS ANTÍGENOS TSL-1

Estudios previos han mostrado que las células cebadas de peritoneo generan especies de oxígeno reactivo intracelular una vez que las células cebadas se activan con ionóforo de calcio A23187 y que las ROS aumentan la liberación de histamina de las células cebadas de peritoneo (Niu y cols., 1996; Wolfreys y Oliveira, 1997). Para definir el espectro de efectos de los antígenos TSL-1 en las células cebadas de peritoneo, analizamos si los antígenos TSL-1 inducen la producción de ROS. En estos estudios, las células cebadas de peritoneo expuestas al ionóforo de calcio A23187 mostraron actividad oxidativa (IFM 148; Fig. 11B) mayor que las células cebadas de peritoneo no estimuladas (IFM 50, Fig. 11A). Sin embargo, no se observó estallido respiratorio en las células cebadas de peritoneo en presencia de los antígenos TSL-1 (Fig. 11C). En vista de que el óxido nítrico tiene un efecto inhibitorio en la producción de ROS en las células cebadas (Brooks y cols., 1999), se evaluó si los antígenos TSL-1 podrían inducir la producción de óxido nítrico que pudiera inhibir el estallido respiratorio. Para lo anterior, las células cebadas de peritoneo se preincubaron con el inhibidor de la óxido nítrico sintasa, L-NAME, y se determinó su actividad oxidativa en presencia de los antígenos TSL-1. Sin embargo, incluso en presencia del inhibidor, no fue posible medir estallido respiratorio en las células cebadas de peritoneo no sensibilizadas expuestas a los antígenos TSL-1 (Fig. 11D). Tanto los antígenos TSL-1 como el ionóforo de calcio A23187 se aplicaron simultáneamente en algunos experimentos y los antígenos TSL-1 no inhibieron la respuesta del ionóforo de calcio A23187.

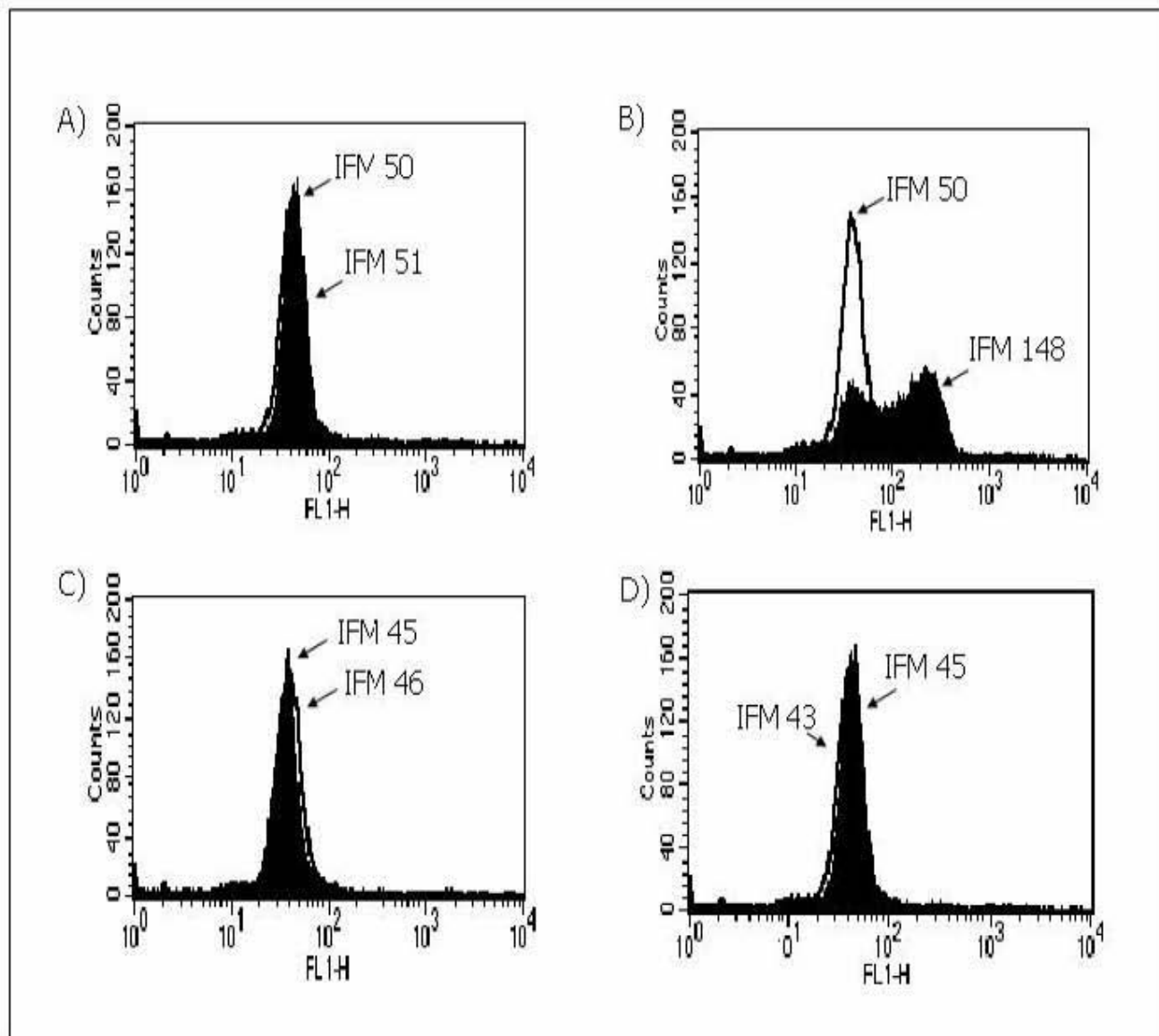


Figura 11. Análisis *in vitro* del estallido respiratorio mediante la evaluación de la actividad de la NADPH oxidasa por las células cebadas de peritoneo tratadas con dihidroirrodamina 123 (DHR 123). Se trataron $0.5 \cdot 10^6$ células cebadas de peritoneo con $50 \mu\text{M}$ de DHR 123 durante 10 min a TA y posteriormente se estimularon con 30 ng/mL de los antígenos TSL-1 o con $1 \mu\text{g/mL}$ del ionóforo de calcio A23187 durante 10 min a TA. Los histogramas oscuros representan a las células activadas por el estímulo, mientras que los histogramas blancos representan a las células cebadas tratadas con DHR 123 sin estímulo. Células cebadas de peritoneo sin estímulo (A); células cebadas en presencia del ionoforo de calcio A23187, mostrando estallido oxidativo (B); células cebadas tratadas con los antígenos TSL-1 no mostrando actividad de ROS (C); células cebadas tratadas con L-NAME ($10 \mu\text{M}$) y con los antígenos TSL-1 (D). Intensidad de fluorescencia media (IFM).

MOVILIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR

En la secreción de histamina por las células cebadas mediante mecanismos dependientes de IgE se observa flujo de calcio intracelular (Kim y cols., 1997). Considerando lo anterior, se investigó si la liberación de histamina inducida por los antígenos TSL-1 estaba asociada con cambios en calcio intracelular. Para esto se incubaron a las células cebadas de peritoneo con el fluorocromo FURA-2AM, se expusieron a los antígenos TSL-1 (30 ng/mL) y se cuantificaron los cambios en los niveles de calcio. Los resultados mostraron que a pesar de que los TSL-1 inducen la secreción de histamina, éstos no indujeron cambios en los niveles de calcio intracelular, aún cuando se usaron varias concentraciones de los antígenos TSL-1 (30 a 450 ng/mL, n=12) (Fig. 12A). En contraste, cuando las células cebadas de peritoneo de ratas sensibilizadas con *T. spiralis* se expusieron a 30 ng/mL de los antígenos TSL-1, se mostró un incremento inmediato en los niveles de calcio (Fig. 12B). Con el compuesto 48/80 se indujo la movilización de calcio intracelular tanto en células cebadas de peritoneo sensibilizadas como no sensibilizadas (Fig. 12 A y B). Por otro lado, en el modelo de *N. brasiliensis* se mostró una respuesta similar sin movilización de calcio por las células cebadas de peritoneo no sensibilizadas tratadas el Et Nb (Fig. 13A) y una respuesta inmediata en la movilización de calcio en el modelo dependiente de IgE (Fig. 13B). En este caso el compuesto 48/80 también indujo la movilización de calcio intracelular (Fig. 13 A y B).

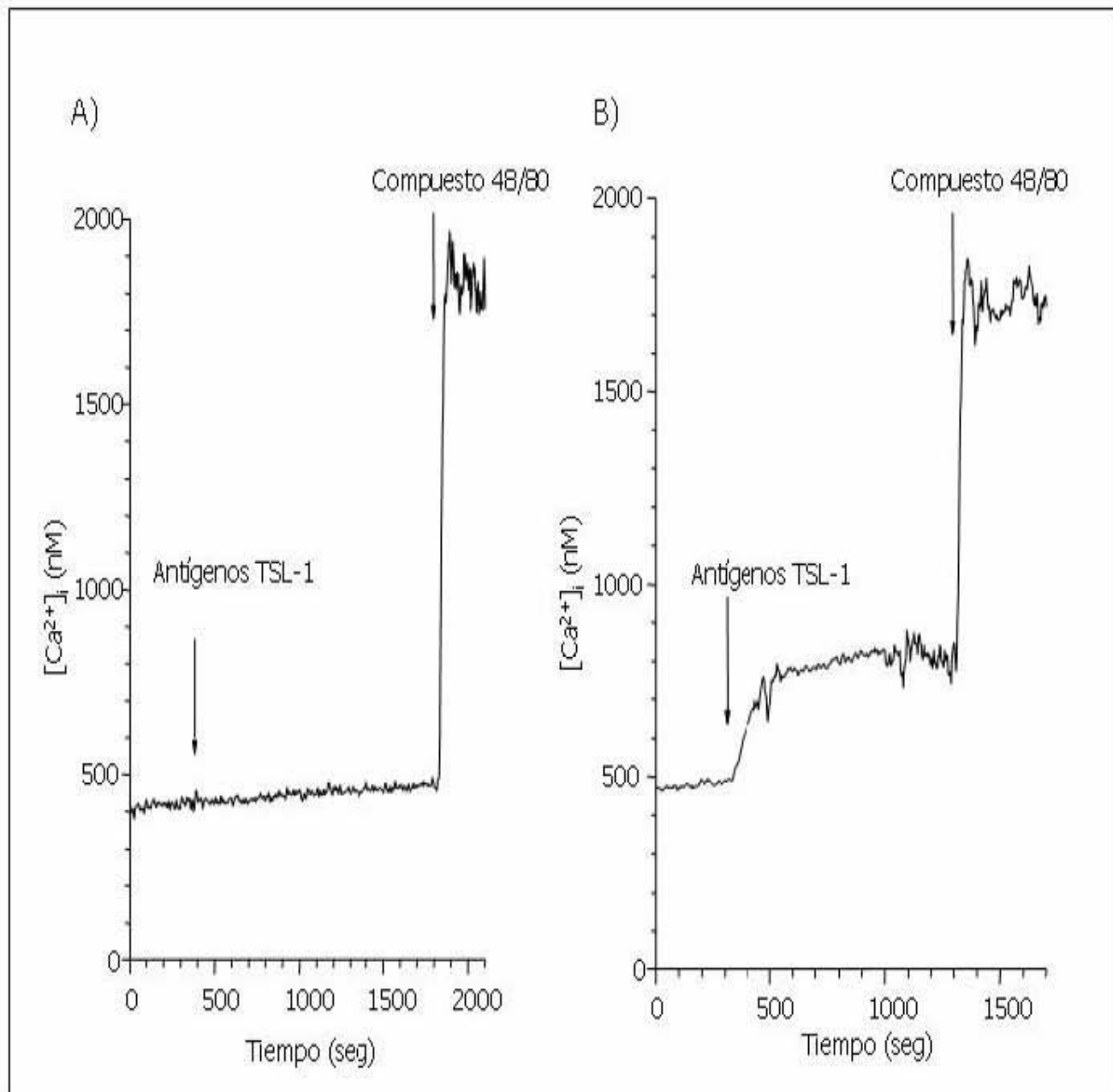


Figura 12. Movilización de calcio intracelular inducida por los antígenos TSL-1. Las células cebadas de peritoneo no sensibilizadas (A) y sensibilizadas con *Trichinella spiralis* (B) se trataron con 4 μ M del fluorocromo FURA-2AM durante 30 min a 37°C, se expusieron a los antígenos TSL-1 (30 ng/mL) y se evaluaron los cambios en los niveles de calcio intracelular. Posteriormente las células cebadas se estimularon con el compuesto 48/80 (1 μ g/mL) como control positivo. Las gráficas muestran los datos obtenidos en un experimento representativo de un total de 12 experimentos independientes. Los antígenos TSL-1 inducen la movilización de calcio en las células cebadas de peritoneo sensibilizadas pero no en las no sensibilizadas. Las flechas indican la adición de los agonistas.

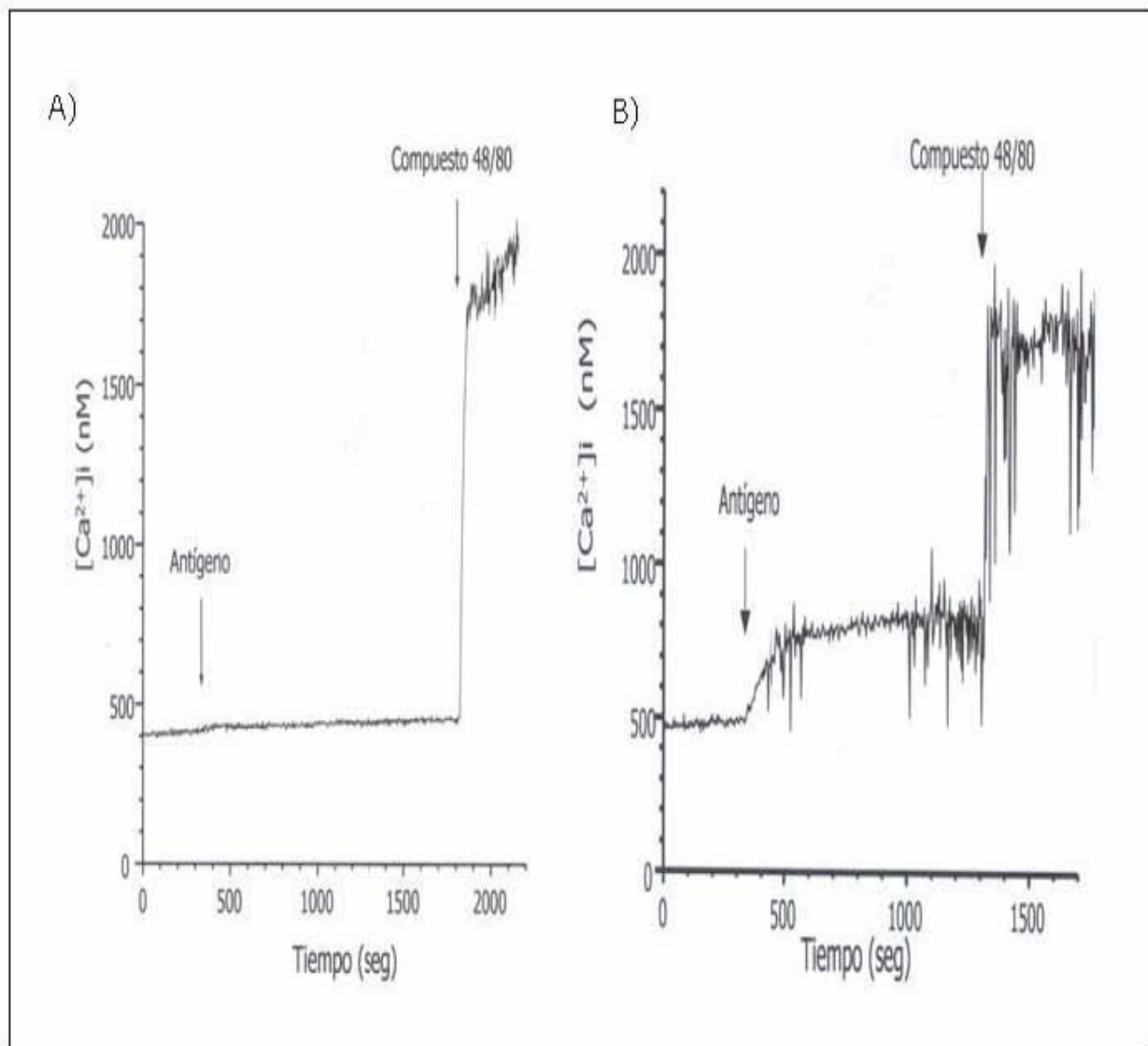


Figura 13. Movilización de calcio intracelular inducida en el modelo de activación dependiente de IgE con *Nippostrongylus brasiliensis* y los antígenos homólogos. Las células cebadas de peritoneo no sensibilizadas (A) y sensibilizadas con *N. brasiliensis* (B) se trataron con 4 μ M del fluorocromo FURA-2AM durante 30 min a 37°C, se expusieron al Et Nb (10 Eq/mL) y se evaluaron los cambios en los niveles de calcio intracelular. Posteriormente las células cebadas de peritoneo se estimularon con el compuesto 48/80 (1 μ g/mL) como control positivo. Las gráficas muestran los datos obtenidos en un experimento representativo de un total de 5 experimentos independientes. El Et Nb induce la movilización de calcio en las células cebadas de peritoneo sensibilizadas pero no en las no sensibilizadas. Las flechas indican la adición de los agonistas.

DISCUSION

Las células cebadas participan de manera muy importante tanto en la inducción de cambios fisiológicos en el intestino de animales infectados con *T. spiralis* como en el proceso de expulsión del parásito adulto. La activación de las células cebadas durante la infección por *T. spiralis* puede llevarse a cabo mediante la sustancia P ó a través de un mecanismo dependiente de IgE, con la subsiguiente liberación de mediadores inflamatorios que inducen un proceso inflamatorio, incrementan la peristalsis del intestino, la permeabilidad y secreción de cloro por el epitelio intestinal (Perdue y Gall 1986; Russell, 1986; Castro y cols., 1987; Harari y cols., 1987; Russell y Castro, 1979; Perdue y cols., 1991; Broaddus y Castro, 1994). Sin embargo, también existen evidencias de la participación de las células cebadas en la expulsión del parásito mediante un mecanismo independiente de IgE (Grencis 1997). Con la finalidad de identificar antígenos del parásito que pudieran estar involucrados en la activación directa de las células cebadas, nuestro grupo de investigación analizó previamente la activación *in vitro* de las células cebadas (de peritoneo de rata no sensibilizada y de la línea celular HRMC, por antígenos específicos de la LM de *T. spiralis* (TSL-1) (Arizmendi y cols., 1997). Los antígenos TSL-1 involucran moléculas de 47, 52, 67 y 72 kDa presentes en la superficie, así como tres moléculas de 52, 67 y 72 kDa presentes en los productos de E/S del parásito (Arriaga y cols., 1989). En estos y estudios posteriores se observó la liberación de histamina, proteasas específicas, TNF α e IL-4 y sugieren la participación de las células cebadas en una respuesta inmune innata contra *T. spiralis* y en la regulación de la respuesta Th₂ a través de la producción y liberación de IL-4 (Arizmendi y cols., 2001; Niborski y cols., 2004).

Se ha estudiado la activación de las células cebadas por la sustancia P y el compuesto 48/80, determinándose que la secreción de histamina se realiza de manera rápida (alrededor de 5-10 seg), es sensible a ser inhibida por la toxina de *B. pertussis*, involucrando la participación de proteínas G y, en el caso de sustancia P, es necesaria la presencia de residuos de ácido siálico en la superficie de las células cebadas. Por lo anterior, en esta tesis se investigó si la activación de las células cebadas por los antígenos TSL-1 compartía características con la activación por sustancia P y otros secretagogos.

Inicialmente se evaluó la activación de las células cebadas de peritoneo de rata no sensibilizada en presencia del colorante rojo de rutenio y los antígenos TSL-1, además de incluir varios controles positivos (ionóforo de calcio A23187, compuesto 48/80 y un mecanismo dependiente de IgE). Se observó la activación de las células cebadas de peritoneo por los antígenos TSL-1 (30 ng/mL), mediante la incorporación del colorante, determinándose un porcentaje de activación del 30 %. La razón por la cuál sólo el 30 % de las células cebadas de peritoneo se activaron con los antígenos TSL-1 se desconoce, sin embargo, se sabe que la población de células cebadas que responde a diferentes estímulos puede variar, depende directamente de las condiciones ambientales y esta regulada diferencialmente, lo que afecta la secreción (Travis y cols., 2000; Gilchrist y cols., 2003).

En vista de que los antígenos de superficie de la LM de *T. spiralis* fueron capaces de estimular directamente a las células cebadas, es posible imaginar que moléculas liberadas por las células cebadas 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 intersticiales. 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 células cebadas estimuladas con 30 ng/ml de los antígenos TSL-1 utilizados en este trabajo, son significativos con respecto a las células control, sugiriéndose un papel importante de las células cebadas activadas directamente en el proceso inflamatorio que se observa durante el proceso de expulsión. La desgranulación de las células cebadas forma parte importante en la alteración integral del intestino, que incluye hiperexcitabilidad intestinal (Marzio y cols., 1992; Weinreich cols., 1992; 1995; Frieling y cols., 1994; Jiang y cols., 2000). Entre los mediadores secretados por las células cebadas se encuentran proteasas específicas, y algunas de éstas envían señales a las células a través de los receptores

activados por proteasas (PAR) (Dery y cols., 1998; 1999; Cocks y Moffatt, 2000; Vergnolle y cols., 2001). En particular los receptores PAR2, están altamente expresadas en el tracto gastrointestinal, donde se localizan las células epiteliales, miocitos y neuronas entéricas (Corvera y cols., 1997; 1999; Kong cols., 1997). Recientemente, Reed y cols. (2003) evaluaron la hiperexcitabilidad en neuronas de la submucosa del intestino de cobayos mediante la activación del PAR2, por moléculas (histamina, 5-HT, prostaglandinas y triptasa) liberadas por células cebadas activadas con antagonistas. Los autores demostraron en el sobrenadante de estas células cebadas una gran actividad de triptasa, sugiriendo que esta molécula, a través de la activación de PAR2, induce la hiperexcitabilidad de las neuronas de la submucosa, y que las señales entre las células inmunes y las neuronas contribuyen considerablemente a las alteraciones crónicas en la fisiología intestinal.

El significado biológico de estas observaciones en la relación huésped parásito en el modelo de *T. spiralis*, es desconocido, sin embargo, vale la pena mencionar que los antígenos TSL-1 y la sustancia P están presentes en los animales infectados con *T. spiralis* (Swain y cols., 1992; Barbara y cols., 2003) y tal cual se demuestra en este estudio, la secreción de histamina inducida por estas moléculas en las células cebadas comparten algunas características. De esta forma, es posible que los antígenos TSL-1 y la sustancia P a través de la activación de las células cebadas en el intestino u otros tejido liberen moléculas pro-inflamatorias que contribuyan al proceso inflamatorio e influyeran en la sobrevivencia de los parásitos adultos o las LM. La activación de las células cebadas 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 células cebadas para secretar histamina y otras moléculas.

Una forma específica de determinar la activación de las células cebadas de peritoneo es mediante la cuantificación de la secreción de histamina, es importante mencionar que el contenido de histamina de las células cebadas de mucosa intestinal de rata es de 1-3 picogramos/célula, en comparación con 10 a 30 picogramos de histamina/célula en las células cebadas de peritoneo de rata (Bissonnette y cols., 1996). Por esta razón en este

trabajo se utilizaron las células cebadas de peritoneo y se determinó que la máxima liberación de histamina por las células cebadas de peritoneo no sensibilizadas estimuladas con los antígenos TSL-1 fue de 30 %. Estos resultados correlacionan con los obtenidos previamente por Arizmendi y cols. (1997). Un aspecto de gran interés es el que las células cebadas de peritoneo no sensibilizadas no fueron estimuladas con el Et Nb; en estos ensayos la cantidad de histamina liberada fue similar a la histamina liberada espontáneamente (6 ± 2 %) a diferencia de lo observado con los antígenos TSL-1. Sin embargo, en el modelo de activación de células cebadas dependiente de IgE, (células cebadas de peritoneo obtenidas de ratas infectadas por *N. brasiliensis* y estimuladas con el Et Nb) la secreción de histamina fue de aproximadamente un 30 %. Estos resultados son similares a los reportados por Befus y cols., (1999).

Un aspecto relevante en este estudio fue la ausencia de secreción de β -hexosaminidasa por células cebadas de peritoneo no sensibilizadas estimuladas con los antígenos TSL-1. Sin embargo, los controles positivos de estimulación; ionóforo de calcio y el modelo dependiente de IgE con células cebadas de peritoneo sensibilizadas con *N. brasiliensis* y tratadas con el Et Nb, indujeron la liberación de esta molécula. En los ensayos realizados con células cebadas de peritoneo tratadas con diferentes concentraciones del ionóforo de calcio A23187 y 30 ng/mL de los antígenos TSL-1, se obtuvo una liberación de β -hexosaminidasa del 70 %, indicando la ausencia de inhibidores en estos antígenos. Es muy interesante el hecho de que los antígenos TSL-1 indujeran la liberación de histamina pero no de β -hexosaminidasa, ya que se consideraba que esas dos moléculas se encontraban almacenadas en el mismo gránulo. A este respecto, el único estudio respecto a la presencia de histamina y la β -hexosaminidasa almacenadas en el mismo gránulo en células cebadas derivadas de medula ósea de ratón ha sido el de Razin y cols., (1983) y a partir de ese trabajo se considero un hecho que estas moléculas eran secretadas de la misma manera. Sin embargo, existen evidencias que muestran en células cebadas activadas, la liberación diferencial de histamina y serotonina, además de que la cantidad secretada puede variar dependiendo del tipo de estímulo (Pihel y cols., 1995). Asimismo, se sabe que la secreción de histamina puede estar

selectivamente modulada por toxinas bacterianas (Supajatura y cols., 2001; Feger y cols., 2002; McCurdy y cols., 2003). Los resultados de Calderón y cols. (1998) apoyan lo anterior, al demostrar la liberación de $\text{TNF}\alpha$, pero no de histamina por células cebadas de peritoneo activadas con la toxina A de *Clostridium difficile*. Por otro lado, existe evidencia de que las células cebadas y otros granulocitos como los eosinófilos, pueden liberar sus diversos mediadores de manera selectiva y diferencial, proceso conocido como “desgranulación diferencial”, evento regulado por el tipo de la señal estimuladora de las células cebadas (Dvorak 1992; 1994; 2000; Malaviya y cols., 1994; Erjefalt y cols., 2001; Lacy y cols., 2001). Considerando nuestros resultados, es probable que los antígenos TSL-1 estimulen en las células cebadas una desgranulación en diferente intensidad de histamina y β -hexosaminidasa.

La cinética de liberación de histamina por células cebadas de peritoneo no sensibilizadas estimuladas con los antígenos TSL-1, hizo evidente que la secreción de esta molécula comparte características con la inducida por la sustancia P y es diferente a la observada en el modelo de activación dependiente de IgE. Otras características de la secreción de histamina por las células cebadas de peritoneo estimuladas con los antígenos TSL-1, que se comparten con la sustancia P, fueron la inhibición de la liberación de histamina por la toxina de *B. pertussis*, sugiriendo la participación de las proteínas G y el requerimiento de la presencia de residuos de ácido siálico en la superficie de las células cebadas de peritoneo. En estos ensayos también se demostró que la secreción de histamina dependiente de la participación de IgE es menos sensible al tratamiento con la toxina y con neuraminidasa V. Estos resultados son similares a los informados previamente por Coleman y cols., (1986) y Befus y cols., (1999).

Considerando los resultados obtenidos en este estudio, es posible sugerir que moléculas liberadas por las células cebadas activadas directamente por los antígenos TSL-1, en conjunto con la sustancia P, pueden estar participando en la inducción de los cambios fisiológicos observados en el intestino de animales infectados con *T. spiralis*, que además están relacionados con la expulsión del organismo adulto del parásito. De esta forma, las

células cebadas juegan un papel importante en la respuesta inmune innata temprana hacia el parásito, incluyendo el desarrollo de la vía de las células Th₂. Subsecuentemente conforme avanza la infección, se generará la producción de IgE y otras respuestas inducidas por diversos antígenos del parásito y es probable que la activación de las células cebadas involucre otros mecanismos, que induzcan la secreción de un grupo diferente de mediadores derivados de células cebadas que funcionen en forma específica. Alternativamente, es posible que los antígenos unan IgE inespecífica o IgG a través de algún mecanismo desconocido. En cuanto a este aspecto, es interesante mencionar que los extractos de *Echinococcus multilocularis* y *Schistosoma mansoni* promueven la liberación de IL-4 por basófilos de donadores aparentemente no sensibilizados, mediante mecanismos independientes de IgE (Aumuller y cols., 2004).

Cabe mencionar que en estudios realizados por Lawrence y cols. (1998; 2000) se puso de manifiesto la importancia de la IL-4 en la expulsión del parásito y del TNF α en la enteropatía observada en los animales infectados con *T. spiralis*, aunque la fuente de estas citocinas no se determinó. Los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación han mostrado la liberación de IL-4 y TNF α por células cebadas no sensibilizadas, estimuladas con los antígenos TSL-1, lo que hace posible sugerir que en los animales infectados, las células cebadas puedan ser las células productoras de estas citocinas. Sin embargo, para definir en detalle la participación de los antígenos TSL-1 en la activación de las células cebadas mediante un mecanismo independiente de IgE, es necesario realizar estudios empleando modelos animales, posiblemente ratones “knock out” para la cadena γ del Fc ϵ R que permitan analizar la activación de las células cebadas, por los antígenos TSL-1 y su participación en la inducción de la enteropatía, así como en la eliminación del organismo adulto.

Las células cebadas de peritoneo de ratas activadas con el ionóforo de calcio A23187, generan especies de oxígeno reactivo intracelular (ROS) y éste aumenta la liberación de histamina de las células cebadas de peritoneo (Niu y cols., 1996; Wolfreys y Oliveira, 1997), por lo que resultó interesante evaluar si en el modelo de activación de las células cebadas con los antígenos TSL-1 también se generaba ROS. Sin embargo, resultados obtenidos

en este estudio muestran que no se presentó estallido respiratorio en estas células. Con la finalidad de determinar si las células cebadas de peritoneo expuestas a los antígenos TSL-1 presentaban algún tipo de inhibición por la producción de óxido nítrico, se empleó al inhibidor de la óxido nítrico sintasa L-NAME (Brooks y cols., 1999); sin embargo, aún en su presencia, no se observó la generación de ROS. La ausencia del estallido respiratorio en este modelo de activación de células cebadas fue sorprendente, sin embargo no se descarta la posibilidad de que mediante otra estrategia metodológica sea posible evaluar el estallido respiratorio en células cebadas estimuladas con los antígenos TSL-1. A este respecto, Suzuki y cols., (2003) observaron mediante algunos inhibidores que la activación de cinasas de tirosina y la fosfatidil inositol 3 cinasa son requeridas para inducir el estallido respiratorio. Lo anterior marca la pauta para realizar experimentos posteriores con la finalidad de evaluar por un lado, el estallido respiratorio mediante otras metodologías y por otra parte analizar algunas de las moléculas involucradas en la señalización generada una vez que se realiza la activación de las células cebadas con los antígenos TSL-1. En el trabajo de Suzuki y cols., (2003) también se menciona que el boqueo del estallido respiratorio en las células cebadas activadas afecta la movilización de calcio y la liberación de histamina y β -hexosaminidasa. Anteriormente se creía que ROS era un producto biológico derivado de la respiración en la mitocondria y que era deletéreo para los sistemas biológicos, sin embargo, existe en la literatura información acerca de que la producción de ROS es necesaria para algunas respuestas fisiológicas (Jones y cols., 2000) y además de que modula la liberación de mediadores de inflamación como histamina, β -hexosaminidasa y LTC₄ (Suzuki y cols., 2003); incluso se ha sugerido que ROS actúa como una señal importante en el señalamiento intracelular para la activación de genes para algunas citocinas y factores de crecimiento necesarios para la modulación de los factores de transcripción como NF κ B y la proteína de activación 1 (AP-1). Asimismo, en la literatura Swindle y cols. (2002) señalan que la producción de ROS en las células cebadas de peritoneo de rata se debe a la presencia de macrófagos contaminantes. En este contexto sería muy interesante evaluar mediante el uso de inhibidores de algunas cascadas de señalización como piceatanol que es un inhibidor selectivo de la cinasa Syk,

el PP1 inhibidor específico de las cinasas parecidas a Src, la wormanina inhibidor selectivo de la fosfatidil inositol 3 cinasa, la U73122 inhibidor selectivo de la fosfolipasa C para de esta forma tratar describir los posibles mecanismos de señalización de las células cebadas de peritoneo activadas por los antígenos TSL-1 y la subsecuente secreción de histamina.

Por otro lado, se sabe que en la secreción de histamina por las células cebadas depende la participación de la IgE así como del flujo de calcio (Kim y cols., 1997). Por tal motivo se tuvo el interés de analizar si en la liberación de histamina por células cebadas de peritoneo activadas por los antígenos TSL-1 había cambios en el calcio intracelular. Los resultados obtenidos fueron sorprendidos, ya que en los ensayos realizados, no se detectó movilización de calcio. Estas observaciones sugieren que los antígenos TSL-1 activan a las células cebadas de peritoneo no sensibilizadas mediante un mecanismo independiente del flujo de calcio, siendo posible que la secreción de histamina involucre un nuevo mecanismo. Hay evidencias recientes que sugieren la participación de la fosfatidil inositol (PI) 3 cinasa clase IA p110 α como mediadora de la señal independiente de calcio durante la desgranulación de las CC (Windmiller y cols., 2003; Gilfillan y Tkaczyk, 2006). Dado que los antígenos TSL-1 inducen la secreción de histamina por procesos que involucran vías independientes de calcio, sería interesante continuar este trabajo enfocándose en esta importante observación.

Asimismo, requiere ser estudiado el receptor específico por el cual los antígenos TSL-1 se unen de manera directa a las células cebadas de peritoneo y entre los aspectos de interés está el determinar si en las células cebadas existe un receptor específico para la tivelosa, la cual es una molécula que se encuentra presente en grandes cantidades en los antígenos TSL-1, usados en este estudio. Por otro lado, dado que los antígenos TSL-1 son glicanos, es posible que en su reconocimiento por las células cebadas, estén involucrados receptores del tipo Toll u otros receptores asociados a patrones de reconocimiento de la respuesta de inmunidad innata (Marshall, 2004).

En la actualidad se reconoce que las células cebadas pueden participar en una respuesta inmunitaria innata y adquirida. Estas células pueden participar en la respuesta inmunitaria adquirida mediante la unión de IgE,

además de tener capacidad para presentar antígeno en el contexto de MHC clase I y clase II. Su participación en la respuesta inmunitaria innata es en base al reconocimiento de antígenos bacterianos y parasitarios por medio de receptores presentes en su membrana (Malaviya y cols., 1996; Mécheri y David, 1997; Bidri y cols., 1997). Con respecto al reconocimiento de antígenos bacterianos, Malaviya y cols., (1999) identificaron y caracterizaron al receptor que permite la adhesión directa de las bacterias de tipo FimH⁺ a la membrana de las células cebadas. Este receptor es la molécula CD48, la cual se encuentra anclada en la membrana por una molécula de glicosil fosfaidil inositol (GPI). A este respecto, nuestro grupo de investigación ha aportado evidencias experimentales que demuestran que las células cebadas de la línea celular HRMC, al ser estimuladas por las glicoproteínas TSL-1 se induce un incremento en los niveles de IL-4 y TNF α tanto a nivel de RNAm como de proteína (Arizmendi y cols., 2001; Niborski y cols., 2004). Estos resultados apoyan la hipótesis planteada por Romagnani (1992) en el sentido de que estas células pueden participar en la regulación de la respuesta inmunitaria contra parásitos helmintos intestinales mediante la liberación de IL-4 o que propiciaría el microambiente para que se desarrolle una respuesta inmunitaria del tipo Th₂.

Es importante el caracterizar en ratas infectadas con *T. spiralis* la participación de las células cebadas en la modulación de la respuesta inmunitaria innata contra el parásito, pero se requiere de la identificación de el (los) receptor (es) presentes en su superficie que reconocen a estos antígenos parasitarios y determinar los probables mecanismos y mediadores químicos por los cuales se lleva a cabo la modulación de la respuesta inmunitaria innata. Las células cebadas cuentan con receptores propios de la respuesta inmunitaria innata, tales como MAC-1 y los receptores tipo Toll (TLRs), a través de los cuales pudiera explicarse su activación por los antígenos TSL-1, independientemente de la participación de IgE. Los TLRs son receptores transmembrales tipo I que se caracterizan por tener un dominio extracelular con regiones repetitivas ricas en leucina (LRR), cada una de 24 a 29 aminoácidos y una con dos regiones ricas en cisteína, además de un dominio intracelular de aproximadamente 200 aminoácidos, similar al que tiene la familia de receptores de la interleucina I (IL-1R), denominado Toll/IL-1R (TIR) por medio del cual se lleva a cabo la transducción de señales (Aderem y Ulevitch, 2000; Akira, 2003).

El primer componente conocido de la vía de señalización de los TLRs fue una proteína adaptadora denominada MyD88 (Marshall, 2004), la cual está conformada por un dominio de muerte en el extremo amino y un dominio TIR en el extremo carboxilo. El dominio TIR de MyD88 interactúa con el dominio TIR del TLR, mientras que el otro dominio de muerte interactúa con la proteína cinasa asociada al receptor de IL-1 (IRAK). Otra proteína adaptadora, llamada Tollip, también se encuentra involucrada en el reclutamiento de IRAK. La formación de este complejo da como resultado la activación, por autofosforilación, de IRAK, lo cual permite el reclutamiento del factor 6 asociado al receptor de TNF α (TRAF6). Posteriormente, el TRAF6 activa a la cinasa TAK1, la cual fosforila y activa al complejo IKK, para finalmente liberar al NF κ B de su inhibidor I κ B. El NF κ B es translocado al núcleo donde estimula la expresión de genes que codifican para la producción de moléculas que participan en la respuesta inmunitaria, como citocinas inflamatorias, quimiocinas, moléculas de adhesión y de coestimulación (Mushegian y Medzhitov, 2001). Para la evaluación de las posibles moléculas involucradas en la activación de las células cebadas por los antígenos TSL-1, existen estudios en los que se utiliza como modelo experimental a las células HEK-293 (células embrionarias de riñón humano) transfectadas para sobreexpresar diferentes TLRs, estos estudios han mostrado que distintos TLRs pueden activar las mismas vías de señalización, por ejemplo, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR9 son capaces de activar al NF κ B. Además, los TLR2, TLR4, TLR6 y TLR9 son capaces de activar otra vía de señalización mediada por la proteína de activación 1 (AP-1) (Vasselon y Detmers, 2002). Los TLRs son receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que reconocen productos o componentes invariantes en microorganismos y parásitos de una determinada clase, que son esenciales para la sobrevivencia del patógeno y son denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Algunos ejemplos son: el lipopolisacárido (LPS) de la pared de bacterias Gram-negativas, las lipoproteínas, los peptidoglicanos y el ácido lipoteicoico (LTA) de las bacterias Gram-positivas, los lipopeptidos y el DNA bacteriano entre otros. La estrategia de activación de la respuesta inmunitaria innata se basa en la detección de estos PAMPs por los PRRs. Hasta el momento existe poca información relacionada con la participación de los PAMPs de parásitos, en la relación

hospedero-parásito, a través del reconocimiento de PRRs de células del sistema inmunitario innato. En *Leishmania* se ha descrito la lipofosfoglicana (LPG) de promastigotes y amastigotes. La LPG de promastigotes es un polímero constituido por unidades de repetición de un disacárido de galactosa-manosa-fosfato anclado a la superficie externa del parásito por un 1-o-alkil-2-liso-fosfatidil inositol. Esta molécula parece ser estructural y funcionalmente análoga al LPS de las bacterias Gram-negativas. La LPG de *Leishmania* es resistente al complemento y es reconocida como PAMP por el PRR, CR3 (receptor 3 del complemento) de los macrófagos en forma directa o a través del fragmento C3bi del complemento. Este reconocimiento conlleva a la fagocitosis del parásito y éste a través de su LPG, modula señales de transducción que se traducen en resistencia al ataque de radicales libres del oxígeno (Beverley y Turco, 1998). Recientemente, se estudió la respuesta inducida por la lisofosfatidilserina de *Schistosoma mansoni* (van Der y cols., 2002), por el glicosilfosfatidilinositol (GPI) anclado (Campos y cols., 2001) y el Tc-52 de *T. cruzi* (Ouaissi cols., 2002) por la lipofosfoglicana de *L. major* (Becker y cols., 2003) y por la lipofosfopeptidoglicana y la Gal-lectina de *E. histolytica* (Maldonado y cols., 2000; Kammandiminti y cols., 2003) y todos ellos han mostrado que inducen una señalización a través de TLR2. La respuesta iniciada por el TLR2 inducida por esos diversos PAMPs, conduce a diferentes respuestas inmunes, como maduración de las células dendríticas (Ouaissi y cols., 2002), iniciación de la producción *in vivo* de óxido nítrico, TNF α , IL-8 e IL-12 (Maldonado y cols., 2000; Campos y cols., 2001) y activación de células NK humanas (Becker y cols., 2003). También se ha implicado al TLR4 en el reconocimiento de algunas estructuras de parásitos, como la lipopeptidofosfoglicana de *E. histolytica* (Maldonado-Bernal y cols., 2005) y la lipofosfoglicana de *L. major* (Kropf y cols., 2004). A la fecha no se ha estudiado la participación del grupo de glicoproteínas TSL-1 de *T. spiralis* en el reconocimiento por los TLRs y en la activación de éstos, en particular en células cebadas, que como se mencionó anteriormente juegan un papel crítico en la defensa del hospedero en contra del parásito y son activadas por los antígenos TSL-1 mediante un mecanismo independiente de IgE. Existe poca información acerca de la caracterización de los TLRs en células cebadas de diferentes hospederos. Las células cebadas murinas producen citocinas en respuesta a la peptidoglicana bacteriana y LPS vía los receptores tipo Toll (TLR) por un

mecanismo dependiente de TLR2 y TLR4. Considerando que en estudios previos se ha demostrado la activación directa de células cebadas de peritoneo de rata como de la línea celular HRMC, sería interesante determinar el repertorio de expresión de los TLRs en estas células, así como determinar su participación en el reconocimiento de las glicoproteínas de los antígenos TSL-1 de *T. spiralis* y la respuesta inmunitaria innata inducida por estas glicoproteínas. Las células cebadas cuentan con receptores propios de la respuesta inmune innata, como los TLRs a través de los cuales pudiera explicarse su activación directa por las glicoproteínas TSL-1. Considerando la naturaleza de N-glicanos de los TSL-1, su reconocimiento por las células cebadas podría ser que este reconocimiento fuera a través de TLR2 o TLR4. Para lo cual se podría determinar si los antígenos TSL-1 modifican la expresión de los TLRs de las células cebadas e inducen su activación a través de TLR2 y TLR4, promoviendo una respuesta inmunitaria innata caracterizada por la producción de $TNF\alpha$ e IL-1, lo anterior podría realizarse mediante ensayos de RT-PCR para evaluar la expresión de los TLRs.

En resumen, éste es el primer reporte que muestra algunos de los mecanismos involucrados en la liberación de histamina secretada por las células cebadas de peritoneo normales, no sensibilizadas, activadas por los antígenos TSL-1. Esta secreción presenta similitudes y diferencias con la secreción de histamina inducida por los secretagogos sustancia P y ionóforo de calcio A23187 y es posible que estén involucrados mecanismos diferentes a los presentes en una activación dependiente de IgE.

Por otro lado, se sabe que en la secreción de histamina por las células cebadas depende la participación de la IgE así como del flujo de calcio (Kim y cols., 1997). Por tal motivo se tuvo el interés de analizar si en la liberación de histamina por células cebadas de peritoneo activadas por los antígenos TSL-1 había cambios en el calcio intracelular. Los resultados obtenidos fueron sorprendentes, ya que en los ensayos realizados, no se detectó movilización de calcio. Estas observaciones sugieren que los antígenos TSL-1 activan a las células cebadas de peritoneo no sensibilizadas mediante un mecanismo independiente del flujo de calcio, siendo posible que la secreción de histamina involucre un nuevo mecanismo. Hay evidencias recientes que sugieren la participación de

la fosfatidil inositol (PI) 3 cinasa clase IA p110 α como mediadora de la señal independiente de calcio durante la desgranulación de las CC (Windmiller y cols., 2003; Gilfillan y Tkaczyk, 2006). Dado que los antígenos TSL-1 inducen la secreción de histamina por procesos que involucran vías independientes de calcio, sería interesante continuar este trabajo enfocándose en esta importante observación.

Asimismo, requiere ser estudiado el receptor específico por el cual los antígenos TSL-1 se unen de manera directa a las células cebadas de peritoneo y entre los aspectos de interés está el determinar si en las células cebadas existe un receptor específico para la tivelosa, la cual es una molécula que se encuentra presente en cantidades elevadas en los antígenos TSL-1, usados en este estudio. Por otro lado, dado que los antígenos TSL-1 son glicanos, es posible que en su reconocimiento por las células cebadas, estén involucrados receptores del tipo Toll u otros receptores asociados a patrones de reconocimiento de la respuesta de inmunidad innata (Marshall, 2004).

En la actualidad se reconoce que las células cebadas pueden participar en una respuesta inmunitaria innata y adquirida. Estas células pueden participar en la respuesta inmunitaria adquirida mediante la unión de IgE, además de tener capacidad para presentar antígeno en el contexto de MHC clase I y clase II. Su participación en la respuesta inmunitaria innata es en base al reconocimiento de antígenos bacterianos y parásitarios por medio de receptores presentes en su membrana (Malaviya y cols., 1996; Mécheri y David, 1997; Bidri y cols., 1997). Con respecto al reconocimiento de antígenos bacterianos, Malaviya y cols., (1999) identificaron y caracterizaron al receptor que permite la adhesión directa de las bacterias de tipo FimH⁺ a la membrana de las células cebadas. Este receptor es la molécula CD48, la cual se encuentra anclada en la membrana por una molécula de glicosil fosfatidil inositol (GPI). A este respecto, nuestro grupo de investigación ha aportado evidencias experimentales que demuestran que las células cebadas de la línea celular HRMC, al ser estimuladas por las glicoproteínas TSL-1 se induce un incremento en los niveles de IL-4 y TNF α tanto a nivel de RNAm como de proteína (Arizmendi y cols., 2001; Niborski y cols., 2004). Estos resultados apoyan la hipótesis planteada por Romagnani (1992) en el

sentido de que estas células pueden participar en la regulación de la respuesta inmunitaria contra parásitos helmintos intestinales mediante la liberación de IL-4 o que propiciaría el microambiente para que se desarrolle una respuesta inmunitaria del tipo Th₂.

Es importante el caracterizar en ratas infectadas con *T. spiralis* la participación de las células cebadas en la modulación de la respuesta inmunitaria innata contra el parásito, pero se requiere de la identificación de el (los) receptor (es) presentes en su superficie que reconocen a estos antígenos parasitarios y determinar los probables mecanismos y mediadores químicos por los cuales se lleva a cabo la modulación de la respuesta inmunitaria innata. Las células cebadas cuentan con receptores propios de la respuesta inmunitaria innata, tales como MAC-1 y los receptores tipo Toll (TLRs), a través de los cuales pudiera explicarse su activación por los antígenos TSL-1, independientemente de la participación de IgE. Los TLRs son receptores transmembrales tipo I que se caracterizan por tener un dominio extracelular con regiones repetitivas ricas en leucina (LRR), cada una de 24 a 29 aminoácidos y una con dos regiones ricas en cisteína, además de un dominio intracelular de aproximadamente 200 aminoácidos, similar al que tiene la familia de receptores de la interleucina I (IL-1R), denominado Toll/IL-1R (TIR) por medio del cual se lleva a cabo la transducción de señales (Aderem y Ulevitch, 2000; Akira, 2003).

El primer componente conocido de la vía de señalización de los TLRs fue una proteína adaptadora denominada MyD88 (Marshall, 2004), la cual esta conformada por un dominio de muerte en el extremo amino y un dominio TIR en el extremo carboxilo. El dominio TIR de MyD88 interacciona con el dominio TIR del TLR, mientras que el otro dominio de muerte interacciona con la proteína cinasa asociada al receptor de IL-1 (IRAK). Otra proteína adaptadora, llamada Tollip, también se encuentra involucrada en el reclutamiento de IRAK. La formación de este complejo da como resultado la activación, por autofosforilación, de IRAK, lo cual permite el reclutamiento del factor 6 asociado al receptor de TNF α (TRAF6). Posteriormente, el TRAF6 activa a la cinasa TAK1, la cual fosforila y activa al complejo IKK, para finalmente liberar al NF κ B de su inhibidor I κ B. El NF κ B es translocado al núcleo donde estimula la expresión de genes que codifican para la producción de moléculas que participan en la

respuesta inmunitaria, como citocinas inflamatorias, quimiocinas, moléculas de adhesión y de coestimulación (Mushegian y Medzhitov, 2001). Para la evaluación de las posibles moléculas involucradas en la activación de las células cebadas por los antígenos TSL-1, existen estudios en los que se utiliza como modelo experimental a las células HEK-293 (células embrionarias de riñón humano) transfectadas para sobreexpresar diferentes TLRs, estos estudios han mostrado que distintos TLRs pueden activar las mismas vías de señalización, por ejemplo, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR9 son capaces de activar al NF κ B. Además, los TLR2, TLR4, TLR6 y TLR9 son capaces de activar otra vía de señalización mediada por la proteína de activación 1 (AP-1) (Vasselon y Detmers, 2002). Los TLRs son receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que reconocen productos o componentes invariantes en microorganismos y parásitos de una determinada clase, que son esenciales para la sobrevivencia del patógeno y son denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Algunos ejemplos son: el lipopolisacárido (LPS) de la pared de bacterias Gram-negativas, las lipoproteínas, los peptidoglicanos y el ácido lipoteicoico (LTA) de las bacterias Gram-positivas, los lipopéptidos y el DNA bacteriano entre otros. La estrategia de activación de la respuesta inmunitaria innata se basa en la detección de estos PAMPs por los PRRs. Hasta el momento existe poca información relacionada con la participación de los PAMPs de parásitos, en la relación hospedero-parásito, a través del reconocimiento de PRRs de células del sistema inmunitario innato. En *Leishmania* se ha descrito la lipofosfoglicana (LPG) de promastigotes y amastigotes. La LPG de promastigotes es un polímero constituido por unidades de repetición de un disacárido de galactosa-manosa-fosfato anclado a la superficie externa del parásito por un 1-o-alkil-2-liso-fosfatidil inositol. Esta molécula parece ser estructural y funcionalmente análoga al LPS de las bacterias Gram-negativas. La LPG de *Leishmania* es resistente al complemento y es reconocida como PAMP por el PRR, CR3 (receptor 3 del complemento) de los macrófagos en forma directa o a través del fragmento C3bi del complemento. Este reconocimiento conlleva a la fagocitosis del parásito y éste a través de su LPG, modula señales de transducción que se traducen en resistencia al ataque de radicales libres del oxígeno (Beverley y Turco, 1998). Recientemente, se estudió la respuesta inducida por la lisofosfatidilserina de *Schistosoma mansoni* (van Der y cols., 2002), por el glicosilfosfatidilinositol (GPI) anclado

(Campos y cols., 2001) y el Tc-52 de *T. cruzi* (Ouaisi cols., 2002) por la lipofosfoglicana de *L. major* (Becker y cols., 2003) y por la lipofosfopeptidoglicana y la Gal-lectina de *E. histolytica* (Maldonado y cols., 2000; Kammandiminti y cols., 2003) y todos ellos han mostrado que inducen una señalización a través de TLR2. La respuesta iniciada por el TLR2 inducida por esos diversos PAMPs, conduce a diferentes respuestas inmunes, como maduración de las células dendríticas (Ouaisi y cols., 2002), iniciación de la producción *in vivo* de óxido nítrico, TNF α , IL-8 e IL-12 (Maldonado y cols., 2000; Campos y cols., 2001) y activación de células NK humanas (Becker y cols., 2003). También se ha implicado al TLR4 en el reconocimiento de algunas estructuras de parásitos, como la lipopeptidofosfoglicana de *E. histolytica* (Maldonado-Bernal y cols., 2005) y la lipofosfoglicana de *L. major* (Kropf y cols., 2004). A la fecha no se ha estudiado la participación del grupo de glicoproteínas TSL-1 de *T. spiralis* en el reconocimiento por los TLRs y en la activación de éstos, en particular en células cebadas, que como se mencionó anteriormente juegan un papel crítico en la defensa del hospedero en contra del parásito y son activadas por los antígenos TSL-1 mediante un mecanismo independiente de IgE. Existe poca información acerca de la caracterización de los TLRs en células cebadas de diferentes hospederos. Las células cebadas murinas producen citocinas en respuesta a la peptidoglicana bacteriana y LPS vía los receptores tipo Toll (TLR) por un mecanismo dependiente de TLR2 y TLR4. Considerando que en estudios previos se ha demostrado la activación directa de células cebadas de peritoneo de rata como de la línea celular HRMC (con fenotipo de mucosa), sería interesante determinar el repertorio de expresión de los TLRs en estas células, así como determinar su participación en el reconocimiento de las glicoproteínas de los antígenos TSL-1 de *T. spiralis* y la respuesta inmunitaria innata inducida por estas glicoproteínas. Las células cebadas cuentan con receptores propios de la respuesta inmune innata, como los TLRs a través de los cuales pudiera explicarse su activación directa por las glicoproteínas TSL-1. Considerando la naturaleza de N-glicanos de los TSL-1, su reconocimiento por las células cebadas podría ser que este reconocimiento fuera a través de TLR2 o TLR4. Para lo cual se podría determinar si los antígenos TSL-1 modifican la expresión de los TLRs de las células cebadas e inducen su activación a través

de TLR2 y TLR4, promoviendo una respuesta inmunitaria innata caracterizada por la producción de $\text{TNF}\alpha$ e IL-1, lo anterior podría realizarse mediante ensayos de RT-PCR para evaluar la expresión de los TLRs.

En resumen, éste es el primer reporte que muestra algunos de los mecanismos involucrados en la liberación de histamina secretada por las células cebadas de peritoneo normales, no sensibilizadas, activadas por los antígenos TSL-1. Esta secreción presenta similitudes y diferencias con la secreción de histamina inducida por los secretagogos sustancia P y ionoforo de calcio A23187 y es posible que estén involucrados mecanismos diferentes a los presentes en una activación dependiente de IgE.

CONCLUSIONES

- 1) La secreción de histamina por células cebadas de peritoneo de rata no sensibilizada estimulada con los antígenos TSL-1 de *T. spiralis* comparte algunas características con la inducida por la sustancia P como liberación rápida de histamina y la participación de proteínas G y de residuos de ácido siálico en la superficie de las CC.
- 2) La secreción de histamina pero no de β -hexosaminidasa, sugiere un mecanismo diferencial de desgranulación.
- 3) La activación directa de células cebadas de peritoneo por los antígenos TSL-1 implica un nuevo mecanismo que no involucra la inducción del estallido respiratorio ni la movilización de calcio intracelular.
- 4) Los mediadores de inflamación liberados por las células cebadas de peritoneo activadas directamente por los antígenos TSL-1 pueden tener un papel muy importante en la respuesta contra *T. spiralis* a nivel intestinal.

REFERENCIAS

- Aderem A. and Ulevitch R. (2000) Toll like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406:782
- Ahmad A., Bell R. G., Wang C. H. and Sacuto F. R. (1991) Characterization of the thoracic duct T-helper cells that co-mediate, with antibody, the rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in adult rats. *Parasite Immunol.* 13:147
- Akira S. (2003) Toll like receptor signalling. *J. Biol. Chem.* 278:38105
- 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
- Andrasfalvy M., Prechl J., Hardy T., Erdei A and Bajtay Z. (2002) Mucosal mast cells express complement receptor type 2 (CD21). *Immunol. Lett* 82:29
- Aoki I., Itoh S., Yokota S., Tanaka S. I., Ishii N., Okuda K., Minami M. and Klinman D. M. (1999) Contribution of mast cells to the T-helper 2 response induced by simultaneous subcutaneous and oral immunization. *Immunology* 98:519
- 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* 7:190
- Arriaga C., Muñiz 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
- Arizmendi-Puga N., Casas O., Yépez-Mulia L., Cedillo R., Ortega-Pierres G., Muñoz O., Befus D. and Enciso-Moreno J.A. (1997) Activation of mast cells by surface antigens of *Trichinella spiralis* through an IgE independent mechanism. En: Ortega-Pierres M.G., Gamble R., van Knapen F., Wakelin D. (Eds.). *Proceedings of the Ninth International Conference on Trichinellosis, CINVESTAV, Mexico City*, pp. 397-441.
- Arizmendi N., Yépez-Mulia L., Cedillo-Rivera R., Ortega-Pierres M. G., Muñoz O., Befus D. and Enciso-Moreno J. A. (2001) Interleukin mRNA changes in mast cells stimulated by TSL-1 antigens. *Parasite* 8, S114
- Arizono N., Matsuda S., Hattori T., Kojima Y., Maeda T. and Galli S. J. (1990) Anatomical variation in mast cell nerve associations in the rat small intestine, heart, lung and skin. Similarities of distances between neural processes and mast cells, eosinophils or plasma cells in the jejunal lamina propria. *Lab. Invest.* 62:626
- 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
- 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

- Barbara G., De Giorgio R., Stanghellini V., Corinaldesi R., Cremon C., Gerard N., Gerard C., Grady E. F., Bunnett N. W., Blennerhassett P. A. and Collins S. M. (2003) Neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) downregulates the onset of intestinal inflammation in the nematode infected mouse. *Gut* 52:1457
- Barrowman M. M., Cockcroft S. and Gomperts B. D. (1986) Two roles for guanine nucleotides in the stimulus-secretion sequence of neutrophils. *Nature* 319:504
- Becker I., Salaiza N., Aguirre M., Delgado J., Carrillo-Carrasco N., Kobeh L. G., Ruiz A., Cervantes R., Torres A. P., Cabrera N., Gonzalez A, Maldonado C., and Isibasi A. (2003) Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor 2. *Mol. Biochem. Parasitol.* 130:65
- 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., Mowat C., Gilchrist M., Hu J., Solomon S. and Bateman A. (1999) Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: Mechanisms of action. *J. Immunol* 163:947
- Behnke J. M. (1991) Immunology. En: Gilles and P. A. J. Ball (Eds.). Human parasitic diseases : hookworm infections. Vol. 4. H. M. Elsevier, Amsterdam. The Netherlands.
- 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., 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
- Beverly S. M. and Turco S. J. (1998) Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite Leishmania. *Trends Microbiol.* 6:35
- Bhattacharyya S. P., Drucker I., Reshef T., Kirshenbaum A. S., Metcalfe D. D. and Mekori Y. A. (1998) Activated T lymphocytes induce degranulation and cytokine production by human mast cells following cell-to-cell contact. *J. Leukoc Biol.* 63:337
- Bheekha-Escura R., MacGlashan D. W., Langdon J. M., and MacDonald S. M. (2000) Human recombinant histamine-releasing factor activates human eosinophils and the eosinophilic cell line, AML14-3D10. *Blood* 96:2191.
- Bidri M., Vouldoukis I., Mossalayi M. S., Debré P., Guillosson J. J., Mazier D. and Arock M. (1997) Evidence for direct interaction between mast cells and *Leishmania parasites*. *Parasite Immunol.* 19:475
- Bienenstock J., Befus D., Denburg J., Goto T., Lee T., Otsuka H. and Shanahan F. (1985) Comparative aspects of mast cell heterogeneity in different species and sites. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 77:126

- Bienenstock J., Tomioka M., Matsuda H., Stead R. H., Quinonez G., Simon G., Coughlin M. D. and Denburg J. A. (1987) The role of mast cells in inflammatory processes: evidence for nerve/mast cell interactions. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 82:238
- Bienenstock J., Croitoru K., Ernst P. B., Stead R. H. and Stanisiz A. (1989) Neuroendocrine regulation of mucosal immunity. *Immunol Invest.* 18:69
- Bischoff S. C., Lorentz A., Schwengberg S., Weler G., Raab R. and Manns M. P. (1999) Mast cells are an important cellular source of tumor necrosis factor α in human intestinal tissue. *Gut* 44:643
- 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
- Bowden J. J., Garland A. M., Baluk P., Lefevre P., Grady E. F., Vigna S. R., Bunnet N. W., and McDonald D. M. (1994) Direct observation of substance P-induced internalization of neurokinin 1 (NK1) receptors at sites of inflammation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91:8964
- Broaddus R. R. and Castro G. A. (1994) Mast cell-mediated colonic immune function and its inhibition by dietary aspirin in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 105:135
- Brooks A. C., Whelan C. J. and Purcell W. M. (1999) Reactive oxygen species generation and histamine release by activated mast cells: modulation by nitric oxide synthase inhibition. *Brit J. of Pharmacol* 128:585
- Bueb J. L., Mousli M., Landry Y. and Bronner C. (1990) A pertussis toxin sensitive G protein is required to induce histamine release from rat peritoneal mast cells by bradykinin. *Agents Actions* 30:98
- Calderón G. M., Torres-López J., Lin T.-J., Chavéz B., Hernández M., Muñoz O., Befus A. D. and Enciso, J.A. (1998) Effects of toxin A from *Clostridium difficile* on mast cell activation and survival. *Infect. Immun.* 66:2755
- 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
- Campos A., Almeida I. C., Takeuchi O., Akira S., Valente E. P., Procopio D. O., Travassos L. R., Smith J. A., Golenbock D. T. and Gazzinelli R. T. (2001) Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J. Immunol.* 167:416
- Carlisle M. S., McGregor D. D. and Appleton J. A. (1990) The role of mucus in antibody-mediated rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in 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
- Castagliuolo I., Keates A. C., Qiu B., Kelly C. P., Nikulasson S., Leeman S. E. and Pothoulakis C. (1997) Increased substance P responses in dorsal root ganglia and intestinal macrophages *Clostridium difficile* toxin enteritis in rats. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 94:4788
- Castro G. A., Harari Y. and Russell D. (1987) Mediators of anaphylaxis-induced ion transport changes in small intestine. *Am. J. Physiol.* 253:G540.
- Chow S. C., Brown A. and Pritchard D. I. (2000) The human hookworm pathogen *Necator americanus* induces apoptosis in T lymphocytes. *Parasite Immunol.* 22:21

- 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
- Cocks T. M. and Moffatt J. D. (2000) Protease-activated receptors: sentries for inflammation? *Trends Pharmacol Sci.* 21:103
- 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
- Coleman J. W., Huang Q. and Stanworth R. (1986) The mast cell response to substance P: Effects of neuraminidase, limulin and some novel synthetic peptide antagonists. *Peptides* 7:171
- Corvera C. U., Dery O., McConalogue K., Bohm S. K., Khitin L. M., Caughey G. H., Payan D. G. and Bunnett N. W. (1997) Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor 2. *J. Clin. Invest.* 100:1383
- Corvera C. U., Dery O., McConalogue K., Gamp P., Thoma M., Al-Ani B., Caughey G. H., Hollenberg M. D. and Bunnett N. W. (1999) Thrombin and mast cell tryptase regulate guinea-pig myenteric neurons through proteinase-activated receptors-1 and -2. *J. Physiol* 517:741.
- Crompton D. W. (1999) How much human helminthiasis there in the world? *J. Parasitol.* 85:397
- Cromwell O., Bennett J. P., Hide I., Kay A. B. and Gomperts B. D. (1991) Mechanisms of granule enzyme secretion from permeabilized guinea pig eosinophils. Dependence on Ca²⁺ and guanine nucleotides. *J. Immunol.* 147:1905
- Dennis D. T., Despommier D. D. and Davis N. (1970) Infectivity of the newborn larvae of *Trichinella spiralis* in the rat. *J. Parasitol.* 56:974
- Despommier D. D. (1998) How does *Trichinella spiralis* make itself at home? *Parasitol. Today* 14:318
- Dery O., Corvera C U., Steinhoff M. and Bunnett . N. W. (1998) Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am. J. Physiol.* 274:C1429
- Dery O. Thoma M. S., Wong H., Grady E. F. and Bunnett N. W. (1999) Trafficking of proteinase-activated receptor-2 and β -arrestin-1 tagged with green fluorescent protein. β -Arrestin-dependent endocytosis of a proteinase receptor. *J. Biol. Chem.* 274:18524
- DeSchoolmeester M. L., Little M. C., Rollins B. J. and Else K. J. (2003) Absence of CC chemokine ligand 2 results in an altered Th1/Th2 cytokine balance and failure to expel *Trichuris muris* infection. *J. Immunol.* 170:4693
- Dvorak A. M., Dvorak H. F and Karnovsky M. J. (1972) Uptake of horseradish peroxidase by guinea pig basophilic leukocytes. *Lab. Invest.* 26:27
- Dvorak A. M. (1992) Basophils and mast cells: piecemeal degranulation *in situ* and *ex vivo*: a possible mechanism for cytokine-induced function in disease. *Immunol. Ser.* 57:169
- Dvorak A. M., Tepper R. I., Weller P. F., Morgan E. S., Estrella P. and Monahan-Earley R. A. (1994) Picemeal degranulation of mast cells in the inflammatory eyelid lesions of interleukin-4 transgenic mice. Evidence of mast cell histamine release *in vivo* by diamine oxidase-gold enzyme-affinity ultrastructural cytochemistry. *Blood* 83:3600
- Dvorak A.M. (2000) Ultrastructural features of human basophil and mast cell secretory function. En. *Mast Cells and Basophils.* Marone, G., Lichtenstein, L.M., Galli, S.J., (Eds.) Academic Press, San Diego, pp. 63-88

- Dupouy-Camet J. (2000) Trichinellosis: a worldwide zoonosis. *Vet. Parasitol.* 93:191
- 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 Compareé* 554:465
- El-Lati S. G., Dahinen C. A. and Church M. K. (1994) Complement peptides C3a- and C5a-induced mediator release from dissociated human skin mast cells. *J. Invest. Dermatol.* 102:803
- Ellis L. A., Iglesias R. and 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 Grecnis 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
- Else K. J. and Finkelman F. D. (1998) Intestinal nematode parasites, cytokines and effector mechanisms. *Int. J. Parasitol* 28:1145
- Enerback L. (1966) Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. I. Effects of fixation. *Acta Pathol. Microbiol Scand.* 66:289
- Enerback L. and Lowhagen G. B. (1979) Long term increase of mucosal mast cell in the rat induced by administration of compound 48/80. *Cell Tissue Res.* 198:209
- Enerback L. (1986) Mast cell heterogeneity: the evolution of the concept of a specific mucosal mast cell. En: A. D. Befus, J. Bienenstock, J. A. Denburg (Eds.). *Mast cell differentiation and heterogeneity*. Raven Press, New York.
- Erjefalt J. S., Greiff L., Andersson M., Adelroth E., Jeffery P. K. and Persson C.G. (2001) Degranulation patterns of eosinophil granulocytes as determinants of eosinophil driven disease. *Thorax* 56:341
- Faulkner H., Humphreys N., Renauld J. C., van Snick J. and Grecnis R. (1997) Interleukin-9 is involved in host protective immunity to intestinal nematode infection. *Eur. J. Immunol.* 27:2536
- Frandi P., Tkaczyk C., Oskeritzian C., Lapeyre J., Peronet R., David B., Guillet J. G. and Mecheri S. (1995) Presentation of soluble antigens by mast cells: up-regulation by interleukin-4 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and down regulation by interferon. *Cell Immunol.* 163:37
- Frandji P., Tkaczyk C., Oskeritzian C., David B., Desaymad C. and Mecheri S. (1996) Exogenous and endogenous antigens are differentially presented by mast cells to CD4+ T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 26:2517
- Feger F., Varadaradjalou S., Gao Z., Abraham S.N. and Arock, M. (2002) The role of mast cells in host defense and their subversion by bacterial pathogens. *Trends Immunol.* 3:151
- Foreman J. C. (1993) Non-immunological stimuli of mast cells and basophil leukocytes. En: Foreman, J.C., (Ed.) *Immunopharmacology of Mast Cells and Basophils*. Academic Press, London, pp. 57-70
- Foreman J. and Jordan C. (1983) Histamine release and vascular changes induced by neuropeptides. *Agents Actions* 13:105
- Frieling T., Palmer J. M., Cooke H. J. and Wood J. D. (1994) Neuroimmune communication in the sumucous plexus of guinea pig colon after infection with *Trichinella spiralis*. *Gastroenterology.* 107:1602

- Fukuoka Y., and Hugli, T.E. (1990) Anaphylatoxin binding and degradation by rat peritoneal mast cells: Mechanisms of degranulation and control. *J. Immunol.* 145:1851
- Fureder W., Agis H., Willheim M., Bankl H. C., Maier U., Kishi K., Muler M. R., Czerwenka K., Radzikiewicz T, Butterfield J. H., Klappacher G. W., Sperr W. R., Oppermann M., Lechner K. and Valent P. (1995) Differential expression of complement receptors on human basophils and mast cells. Evidence for mast cell heterogeneity and CD88/C5aR expression on skin mast cells. *J. Immunol.* 155:3152
- 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": Microenvironmental 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
- Galli S. J. and Lantz C. S. (1999) Allergy. In *fundamental Immunology*. WE Paul (Ed.), PA:Lippincott-Raven, Philadelphia pp 1137-1184
- Galli S. J. (2000) Mast cells and basophils. *Curr. Opin. Hematol.* 7:32
- Galli S. J., Kalesnikof J., Grimaldeston M. A., Piliponsky A. M., Williams C. M. M. and Tsa M. (2005) Mast cells as "turnable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu. Rev. Immunol.* 23:749
- Gamble H. R. and Graham C. E. (1984) Monoclonal antibody-purified antigen for the immunodiagnosis of trichinosis. *Am. J. Vet. Res.* 45:67
- Gilchrist M., Hesslinger C. and Befus A.D. (2003) Tetrahydrobiopterin, a critical factor in the production and role of nitric oxide in mast cells. *J. Biol. Chem.* 278:50607
- Gilfillan A. M. and Tkaczyk C. (2006) Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nature Rev.* 6:218
- Gnanasekar M., Rao K. ., Chen L., Narayanan R. B., Geetha M., Scott A. L., Ramaswamy K. and Kaliraj P. (2002) Molecular characterization of a calcium binding translationally controlled tumor protein homologue from the fialar parasites *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 121:107
- 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
- Goyal P. K., Wheatcroft J. and Wakelin D. (2002) Tyvelose and protective responses to the intestinal stages of *Trichinella spiralis*. *Parasitology International* 51:91
- Grencis 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
- Grencis R. K. (1997) Th₂-mediated host protective immunity to intestinal nematode infections. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Biol.* 352:1377

- Grynkiewicz G., Poenie M. and Tsien R.Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260:3440
- 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., Friend D. S., Webster M., Ghildyal N., Nicodemus C. F. and Stevens R. L. (1997) Mouse mast cells that possess segmented/multilobular nuclei. *Blood* 90:382
- 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., Humbles A., Tao H., Finkelstein S., Boyce J. A., Gerard C., Friend D. S. and Austen K. F. (2002) CCR3 is required for tissue eosinophilia and larval cytotoxicity after infection with *Trichinella spiralis*. *J. Immunol.* 168:5730
- Gurish M. F., Bryce P. J., Tao H., Kisselgof A. B., Thornton E.M., Miller H. R., Friend D. S. and Oettgen H. C. (2004) IgE enhances parasite clearance and regulates mast cell responses in mice infected with *Trichinella spiralis*. *J. Immunol.* 172:1139
- Harari Y., Russell D.A. and Castro G.A. (1987) Anaphylaxis-mediated epithelial Cl⁻ secretion and parasite rejection in rat intestine. *J. Immunol.* 138:1250
- Hartmann K., Henz B. M., Kruger-Krasagakes S., Kohl J., Burger R., Guhl S., Haase I., Lippert U. and Zuberbier T. (1997) C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. *Blood* 89:2863-2870
- Hou Y.F., Zhou Y.C., Zhng X. X., Wang H. Y., Fu Y. L., Fang Z. M. and He S. H. (2006) Modulation of expression and function of Toll-like receptor 3 in 549 and H292 cells by histamine. *Mol. Immunol.*
- 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
- Huels C., Germann T., Goedert ., Hoehn P., Koelsch S., Hultner L., Palm N., Rude E. and Schmitt E. (1995) Co-activation of naïve CD4⁺T cells and bone marrow-derived mast cells results in the development of Th2 cells. *Int Immunol.* 7:525
- Huntley J. F., Gooden C., Newlands G. F., Mackellar A., Lammas D. A., Wakelin D., Tuohy M., Woodbury R. G. and Miller H. R. (1990) Distribution of intestinal mast cell proteinase in blood and tissues of normal and *Trichinella*-infected mice. *Parasite Immunol.* 12:85
- Hwang Z., Leichter R., Okamoto A., Payan D., Collins S. M. and Bunnett N. W. (1993) Downregulation of neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in the inflamed rat intestine. *Am. J. Physiol.* 264:G735
- Ikeda T. and Funaba M. (2003) Altered function of murine mast cells in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Immunol. Lett.* 88:21
- 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
- Janiszewski J., Bienenstock J. and Blennerhassett, M.G. (1994) Picomolar doses of substance P trigger electrical responses in mast cells without degranulation. *Am. J. Physiol.* 267:C138

- 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: Soulsby. E. L. (Ed.). Reaction of Host to Parasitism. 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
- Jones R. D., Hancock J. T. and Morice A. H. (2000) NADPH oxidase: a universal oxygen sensor? Free Radical Biol. Med. 29:416
- Kakuturu V. N. R., Chen L., Gnanasekar M., Ramaswamy K. (2002) Cloning and characterization of a calcium-binding, histamine-releasing protein from *Schistosoma mansoni* J. Biol. Chem. 277:31207
- Kammanadiminti S. J. Mann B. J., Dutil L. and Chadee K. (2003) Regulation of Toll-like receptor-2 expression by the Gallectin of *Entamoeba histolytica*. FASEB J. Published on line, Nov 20
- Kandere-Grzybowska K., Lotoumeau R., Kempuraj D., Donelan J., Poplawski S., Boucher W., Athanassiou A and Theoharides T. C. (2003) IL-1 induces vesicular secretion of IL-6 without degranulation from human mast cells. J. Immunol. 171:4830
- Katona I. M., Urban J. F. Jr. and Finkelman F. D. (1988) The role of L3T4⁺ and Ly2⁺ T cells in the IgE response and immunity to *Nippostrongylus brasiliensis*. J. Immunol. 140:3206
- Kawakami T. and Galli S. J. (2002) Regulation of mast cell and basophil function and survival by IgE. Nat. Rev. Immunol. 2:773
- Kim T. D., Eddlestone G. T., Mahmoud S.F., Kuchtey J. and Fewtrell C. (1997) Correlating Ca²⁺ responses and secretion in individual RBL-2H3 mucosal mast cells. J. Biol. Chem. 272:31225
- Kinnet J. P. (1999) The high-affinity IgE receptor (FcεRI):from physiology to pathology. Annu. Rev. Immunol. 17:931
- King C. L. and Nutman T. B. (1992) Biological role of helper T-cell subsets in helminth infections. Chem. Immunol. 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: Galli S. J., Austen K. F. (Eds). Mast cell and basophil differentiation and function in health and disease. Raven Press, New York
- Knight P. A., Wright S. H., Lawrence C. E., Paterson Y. Y. W. and Miller H. R. P. (2000) Delayed expulsion of the nematode *Trichinella spiralis* in mice lacking the mucosal mast cell-specific granule chymase, mouse mast cell protease-1. J. Exp. Med. 192:1849
- Knight P. A., Pemberton A. D., Robertson K. A., Roy D. J., Wright S. H. and Miller H. R. P. (2004) Expression profiling reveals novel innate and inflammatory responses in the jejunal epithelial compartment during infection with *Trichinella spiralis*. Infect. Immun. 72:6076
- Koffer A. (1997) Role of GTP-binding proteins in FcεRI signaling. En: M. M. Hamawy (Ed). IgE receptor (FcεRI) function in mast cells and basophils. R. G. Landes Company.
- 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

- Kowalski M. L. and Kaliner M. A. (1988) Neurogenic inflammation, vascular permeability and mast cells. *J. Immunol.* 140:3905.
- 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
- Kropf P., Freudenberg M. A., Modollel M., Price H. P. Herath S., Antoniazzi S., Galanos C., Smith D. F., Muller I. (2004) Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect. Immun.* 72:1920
- Lacy P., Logan M.R., Bablitz B. and Moqbel R. (2001) Fusion protein vesicle-associated membrane protein 2 is implicated in IFN-gamma-induced piecemeal degranulation in human eosinophils from atopic individuals. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107:671
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680
- Laflamme N. and Rivest S. (2001) Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating Gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB J.* 15:155
- 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 Grecnis R. K. (1992) Genetic influences upon eosinophilia and resistance in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Parasitol.* 105:117
- Lantz C. S., Boesiger J., Song C. H., Mach., Kobayashi T. Mulligan R. C., Nawa Y., Dranoff G. and Galli S. J. (1998) Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* 392:90
- Larsh J. E., Ottolenghi A. and Weatherly N. F. (1974) *Trichinella spiralis*: Phospholipase in challenged mice and rats. *Exp. Parasitol.* 36:299
- Lau A. H. Y., Chow S. S. M. and Ng Y. S (2001) Immunologically induced histamine release from rat peritoneal mast cells is enhanced by low levels of substance P. *Eur. J. Pharmacol.* 414:295
- Lawrence C.E., Paterson J.C., Higgins L.M., MacDonald T.T., Kennedy M.W. and Garside P. (1998) IL-4-regulated enteropathy in an intestinal nematode infection. *Eur. J. Immunol.* 28:2672
- Lawrence C. E., Paterson J. C., Wei X. Q., Liew F. Y., Garside P. and Kennedy M. W. (2000) Nitric oxide mediates intestinal pathology but not immune expulsion during *Trichinella spiralis* infection in mice. *J. Immunol.* 164:4229
- Lawrence C. E., Paterson Y. Y. W., Wright S.H., Knight P. A. and Miller H. R. P. (2004) Mouse mast cell protease-1 is required for the enteropathy induced by gastrointestinal helminth infection in the mouse. *Gastroenterol.* 127:155
- Lee T. D. G. and Wakelin D. (1982) The use of host strain variation to assess the significance of mucosal mast cells in the spontaneous cure response of mice to the nematode *Trichuris muris*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 67:302
- Lee T.D.G., Shanahan F., Miller H.R.P., Bienenstock J. and Befus A.D. (1985) Intestinal mucosal mast cells: Isolation from rat lamina propria and purification using unit gravity velocity sedimentation. *Immunol.* 55:721
- Lehnardt S., Massillon ., Folett P., Jensen F. E., Ratan R., Rosenberg P. A., Volpe J. J. and Vartanian T. (2003) Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (100):8514

- 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
- Lin T. J., Issekutz T. B. and Marshall J. S. (2000) Human mast cells transmigrate through human umbilical vein endothelial monolayers and selectively produce IL-8 in response to stromal cell-derived factor-1 α . J. Immunol. 165:211
- Lloyd S. and Soulsby E. J. L. (1987) Immunobiology of gastrointestinal nematodes in ruminants. En: E. J. L. Soulsby (Ed.). Immune responses in parasitic infections: Immunology, immunopathology and immunoprophylaxis. Vol. 1. CRC Press. Boca Raton.
- Love K. S., Lakshmanan R. R., Butterfield J. H. and Fox C. C. (1996) IFN- γ -stimulated enhancement of MHC class II antigen expression by the human mast cell line HMC-1. Cell Immunol. 170:85
- 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
- Lu B., Figini M., Emanuelli C., Geppetti P., Grady E., Gerard N. P., Ansell J., Payan D. G., Gerard C. and Bunnett N. (1997) The control of microvascular permeability and blood pressure by neutral endopeptidase. Nat. Med. 3:904
- Lutton D. A., Bamford K. B., O'Loughlin B. and Ennis M. (1995) Modulatory action of *Helicobacter pylori* on histamine release from mast cells and basophils *in vitro*. J. Med. Microbiol. 42:386
- 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
- Mak C. H., Sun K. W. and Ko R. C. (2001) Identification of some heat induced genes of *Trichinella spiralis*. Parasitol. 123:293
- 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. A. and Abraham S. N. (1996) Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF α . Nature 381:77
- Maldonado C., Trejo W., Ramirez A., Carrera M., Sánchez ., López-Macias C. and Isibasi A. (2000) Lipophosphopeptidoglycan of *Entamoeba histolytica* induces an antiinflammatory innate immune response and downregulation of toll-like receptor 2 (TLR-2) gene expression in human monocytes. Arch. Med. Res. 31: S71-S73
- Maldonado-Bernal C., Kirschning C. J., Rosenstein Y., Rocha L. M., Rios-Sarabia N., Espinosa-Castellano M., Becker I., Estrada I., Salazar-Gonzalez R. M., Lopez-Macias C., Wagner H., Sanchez J. and Isibasi A. (2005) The innate immune response to *Entamoeba histolytica* lipopeptidophosphoglycan is mediated by Toll-like receptors 2 and 4. Parasite Immunol. 27:127
- Marshall J. S., McCurdy J. D. and Olynch T. (2003) Toll-like receptor-mediated activation o mast cells: implications for allergic disease? Int. Arch. Allergy Immunol. 132:87
- Marshall, J. S. (2004) Mast-cell responses to pathogens. Nat. Rev. Immunol. 4:787

- Marzio L., Blennerhassett P., Vermillion D., Chiverton S. and Collins S. (1992) Distribution of mast cells in intestinal muscle of nematode-sensitized rats. *Am. J. Physiol.* 262:G477
- Matsas R., Fulcher I. S., Kenny A. J. and Turner A. J. (1983) Substance P and (Leu)enkephalin are hydrolyzed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli. *Proc. Natl Acad Sci. USA* 80:3111
- McCurdy J. D., Lin T.-J. and Marshall S. (2001) Toll-like receptor 4 mediated activation of murine mast cells. *J. Leukoc. Biol.* 70:977
- McCurdy J. D., Olynych T. J., Maher L. H. and Marshall J. S. (2003) Distinct Toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells. *J. Immunol.* 170:1625
- McDonald D. M., Bowden J. J., Baluk, P. and Bunnet, N. W. (1996) Neurogenic inflammation. A model for studying efferent actions of sensory nerves. *Ad. Exp. Med. Biol.* 410:453
- McDonald S. M., Bisutthibhan J., Shapiro T. A., Rogerson S. J., Taylor T. E., Tembo M., Langdon J. M. and Meshnick S. R. (2001) Immune mimicry in malaria: *Plasmodium falciparum* secretes a functional histamine-releasing factor homolog *in vitro* and *in vivo*. *PNAS* 98:10829
- McVay C. S., Bracken P., Galiardo L. F. and Appleton J. (2000) Antibodies to tyvelose exhibit multiple modes of interference with the epithelial niche of *Trichinella spiralis*. *Infect. Immun.* 68:1912
- Mécheri S. and David B. (1997) Unraveling the mast cell dilemma culprit of victim of its generosity? *Immunol. Today* 18:212
- Metcalfe D. D., Baram D. and Mekori Y. A. (1997) Mast cells. *Physiol. Rev.* 77:1033
- Metzger H. (1992) The receptor with high affinity for IgE. *Immunol. Rev.* 125:37
- 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. P. (1984) The protective mucosal response against gastrointestinal nematodes in ruminants and laboratory animals. *Vet. Immunol. Immunopathol* 6:167
- Miller H. R. P. (1992) Mast cells: their function and heterogeneity. En: Allergy and immunity to helminths. Common mechanisms or divergent pathways? Moqbel R. (Ed.) Taylor and Francis, London
- Miller H. R. P. (1996) Mucosal mast cells and the allergic response against nematode parasites. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 54:331
- 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
- Moqbel R. (1986) Helminth-induced intestinal inflammation. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 80:719
- Morelle W., Haslam S. M., Morris H. R. and Dell A. (2000) Characterization of the N-linked glycans of adult *Trichinella spiralis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 109:171
- 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

- Mousli M., Hugli T. E., Landry Y. and Bronner C. (1992) A mechanism of action for anaphylatoxin C3a stimulation of mast cells. *J. Immunol.* 148:2456
- Mushegian A. and Medzhitov R. (2001) Evolutionary perspective on innate immune recognition. *J. Cell Biol.* 155:705
- Nakajima T., Inagaki N., Tanaka H., Tanaka A., Yoshikawa M., Tamari M., Hasegawa K., Matsumoto K., Tachimoto H, Ebisawa M., Tsujimoto G., Matsuda H., Nagai H. and Saito H. (2002) Marked increase in CC chemokine gene expression in both human and mouse mast cell transcriptomes following Fcε receptor I cross-linking an interspecies comparison. *Blood* 100:3861
- Nawa Y. and Miller H. R. P. (1979) Adoptive transfer of intestinal mast cell response in rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. *Cell. 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.* 157:4037
- 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* 86:1968
- Niborski V., Vallé I., Fonseca-Liñan R., Boireau P., Enciso A., Ortega-Pierres G. and Yépez-Mulia L. (2004) *Trichinella spiralis*: stimulation of mast cells by TSL-1 antigens trigger cytokine mRNA expression and release of IL-1 and TNF through an Ig-independent pathway. *Exp. Parasitol.* 108:101
- Niu X. F., Ibbotson G. and Kubes P. (1996) A balance between nitric oxide and oxidants regulates mast cell-dependent neutrophil-endothelial cell interactions. *Circ. Res.* 79:992
- Niyonsaba F., Someya A., Hirata M., Ogawa H. and Nagaoka I. (2001) Evaluation of the effects of peptide antibiotics human β-defensin-1/2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D₂ production from mast cells. *Eur. J. Immunol.* 31:1066
- Norn S., Stahl Skov P., Jensen C., Koch C., Permin H., Bog-Hansen T. C., Lowenstein H. and Hoiby N. (1983) Intrinsic asthma and bacterial histamine release via lectin effect. *Agents Actions* 13:210
- Norn S., Jarlov J. O., Jensen C. B., Clementsen P., Dahl B. T., Espersen F and Stahl Skov P. (1987) Bacteria and their products peptidoglycan and teichoic acid potentiate antigen-induced histamine release in allergic patients. *Agents Actions* 20:174
- Norn S., Clementsen P., Fomsgaard A. and Kilian M. (1990) *Haemophilus influenzae* potentiates basophil histamine release possibly by its endotoxins. *Agents Actions* 30:57
- Ochi H., Hirani W. M., Yuan O., Friend D. S., Austen K. F. and Boyce J. A. (1999) T helper cell type 2 cytokine-mediated comitogenic responses and CCR3 expression during differentiation of human mast cells in vitro. *J. Exp. Med.* 190:267
- Okamoto A., Lovett M. Payan D. G. and Bunnett N. W. (1994) Interactions between neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) and the substance P (NK1) receptor expressed in mammalian cells. *Biochem. J.* 299:683
- 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

- Okumura S., Kashiwakura J., Tomita H., Matsumoto K., Nakajima T., Saito H and Okayama Y. (2003) Identification of specific gene expression profiles in human mast cells mediated by Toll-like receptor 4 and FcεRI. *Blood* 102:2547
- 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 M. G., Muñoz 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
- Ortega-Pierres M. G., Yépez-Mulia L., Homan W., Gamble H. R., Lim P. L., Takahashi Y., Wasso D. I. and Appleton J. A. (1996) Workshop on a detailed characterization on *Trichinella spiralis* antigens: a platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. *Parasite Immunol.* 18:273
- Otsuka M. and Yoshioka K. (1993) Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol. Rev.* 73:229
- Ott V. L. and Cambier J. C. (2000) Activating and inhibitory signalling in mast cells: new opportunities for therapeutic intervention? *Allergy Clin. Immunol.* 106:429
- Ouaissi A., Guilvard E., Delneste Y., Caron G., Magistrelli ., Herbault N., Thieblemont N. and Jeannin P. (2002) The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2 and confers protection against lethal infection. *J. Immunol.* 168:6366
- Parkhouse R. M. E., Phillip M. 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* 40:297
- 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
- Pearce F. L., Befus A. D., Gauldie, J. and Bienenstock J. (1982) Mucosal mast cells. II. Effects of anti-allergic compounds on histamine secretion by isolated intestinal mast cells. *J. Immunol.* 128:2481
- Perdue M. H. and Gall D. G. (1986) Rat jejunal mucosal response to histamine and anti-histamines *in vitro*. Comparison with antigen-induced changes during intestinal anaphylaxis. *Agents Actions* 19:5.
- Perdue M. H., Masson S., Wershil B. K. and Galli S. J. (1991) Role of mast cell in ion transport abnormalities associated with intestinal anaphylaxis. Correction of the diminished secretory response in genetically mast cell-deficient *W/W^v* mice by bone marrow transplantation. *J. Clin Invest.* 87:687
- Phillipp M., Parkhouse R. M. E, and Ogilvie B. M. (1980) Changing Proteins on the surface of a parasitic nematode. *Nature* 287:538
- Pihel K., Hsieh S., Jorgenson J. W. and Winghtman R. M. (1995) Electrochemical detection of histamine and 5-hydroxytryptamine at isolated mast cells. *Anal. Chem.* 67:4514
- 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

- Quinlan K. L., Song I. S., Bunnet N. W., Letran E., Steinhoff M., Harten B., Olerud J. E., Armstrong C. A., Wright Caughman S. and Ansel, J. C. (1998) Neuropeptide regulation of human dermal microvascular endothelial cell ICAM-1 expression and function. *Am. J. Physiol.* 275:C1580
- Ramaswamy K., Goodman R. E. and Bell R. (1994) Cytokine profile of protective anti-*Trichinella spiralis* CD4⁺OX22⁻ and non-protective CD40⁺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
- Razin E., Mencia-Huerta J.M., Stevens R. L., Lewis R. A., Liu F. T., Corey J. and Austen F. (1983) IgE-mediated release of leukotriene C₄, chondroitin sulfate E proteoglycan, β -hexosaminidase, and histamine from cultured bone marrow-derived mouse mast cells. *J. Exp. Med.* 157:189
- Reason A. J., Ellis L. A., Appleton J. A., Wisnewski N., Grieve R. B., McNeil M., Wassom D. L., Morris H. R. and Dell A. (1994) Novel-tyvelose-containing tri- and tetra-antennary N-glycans in the immunodominant antigens of the intracellular parasite *Trichinella spiralis*. *Glycobiology*, 4:593
- Reed D. E., Barajas-Lopez C., Cottrell G., Velazquez-Rocha S., Dery O., Grady E.F., Bunnett N. W. and Vanner S. J. (2003) Mast cell tryptase and proteinase-activated receptor 2 induce hyperexcitability of guinea-pig submucosal neurons. *J. Physiol.* 547:531
- 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., 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., Grecis R.K. and Wakelin, D. (1986) Antigen specific T cell lines transfer protective immunity against *Trichinella spiralis* "in vivo". *Immunol.* 58:57
- Romagnani S. (1992) Induction of Th1 and Th2 responses: a key role for the "natural" immune response? *Immunol. Today* 13:379
- 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.* 13:391
- 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
- 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
- Rusell D. A. (1986) Mast cells in the regulation of intestinal electrolyte transport. *Am. J. Physiol.* 251:G253
- 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

- Sayama K., Diehn M., Matsuda K., Lunderius C., Tsai M., Tam S. Y., Botstein D., Brown P. O. and Galli S. J. (2002) Transcriptional response of human mast cells stimulated via the FcεRI and identification of mast cells as a source of IL-11. *BMC Immunol.* 3:5
- Schulman E. S., Post T. J., Henson P. M. and Giclas P. C. (1988) Differential effects of the complement peptides, C5a and C5a des Arg on human basophil and lung mast cell histamine release. *J. Clin. Invest.* 81:918
- Scudamore C. L., Jepson M. A., Hirst B. H. and Miller H. (1998) The rat mucosal mast cell chymase, RMCPII, alters epithelial cell monolayer permeability in association with altered distribution of the tight junction proteins ZO-1 and occludin. *Eur J. Cell Biol.* 75:321
- Shanahan F., Denburg J. A., Fox J. E. T., Bienenstock J. and Befus A. D. (1985) Mast cell heterogeneity: effects of neuroenteric peptides on histamine release. *J. Immunol.* 135:1331
- Sher A., Hein A., Moser G. and Caulfield J. P. (1979) Complement receptors promote the phagocytosis of bacteria by rat peritoneal mast cells. *Lab. Invest.* 41:490
- Shore P. A., Burkhalter A. and Cohn V. H. Jr. (1959) A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J. Pharm. Exp. Ther.* 127:182
- Silberstein D.S. (1983) En: Campbell W.C. (Ed.). *Trichinella and Trichinosis*. Plenum Press. NewYork.
- Stead R. H., Tomioka M., Quinonez G., Simon G. T., Felten S. Y. and Bienenstock J. (1987) Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2975
- Stead R. H., Bienenstock J. and Stanisiz A. M. (1988) Neuropeptide regulation of mucosal immunity. *Immunol. Rev.* 100:333
- Stead R. H., Dixon M. F., Bramwell N.H., Riddell R. H. and Bienenstock J. (1989) Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa. *Gastroenterology* 97:575
- Stenton G. R., Vliagoftis H. and Befus A. D. (1998) Role of intestinal mast cells in modulating gastrointesinal pathophyogy. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 81:1
- Stenton G. R., Nohara O., Dery R. E., Vliagoftis H., Gilchrist M., Johri A., Wallace J. L., Hollenberg M. D., Moqbel R. and Befus A. D. (2002) Proteinase-activated receptor (PAR)-1 and -2 agonists induce mediator release from mast cells by pathways distinct from PAR-1 and PAR-2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302:466
- Stevens R. L., Lee T D., Seldin D. C., Austen K. F., Befus A. D. and Bienenstock J. (1986) Intestinal mucosal mast cells from rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis* contain protease-resistant chondroitin sulfate di-B proteoglycas. *J. Immunol.* 137:291
- Stewart G. (1983) Pathophysiology of the muscle phase. En: *Trichinella and Trichinosis*. W. C. Campbell (Ed.) Plenum Press, New York
- Sturiale S., Barbara G., Qiu B., Figini M., Geppetti P., Gerard N., Gerard C., Grady E. F., Bunnet N. W. and Collins S. M. (1999) Neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) terminates colitis by degrading substance P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:11653
- Sundstrom B., Little D. M., Villinger F., Ellis J. E. and Ansari A. A. (2004) Signalling through Toll-like receptors triggers HIV-1 replication in latently infected mast cells. *J. Immunol.* 172:4391

- Supajatura V., Ushio H., Nakao A., Okumura K., Ra C. and Ogawa H. (2001) Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *J. Immunol.* 167:2250
- Supajatura V., Ushio H., Nakao A., Akira S., Okumura K., Ra C. and Ogawa H. (2002) Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J. Clin. Invest.* 109:1351
- Suzuki Y., Yoshimaru T., Matsui T., Inoue T., Niide O., Nunomura S. and Ra C. (2003) FcεRI signaling of mast cells activates intracellular production of hydrogen peroxide: role in the regulation of calcium signals. *J. Immunol.* 171:6119
- Swain M. G., Agro A., Blennerhassett P., Stanisz A. and Collins S. M. (1992) Increased levels of substance P in the myenteric plexus of *Trichinella*-infected rats. *Gastroenterol.* 102:1913
- Swindle E. J., Hunt J. A. and Coleman J. W. (2002) A comparison of reactive oxygen species generation by rat peritoneal macrophages and mast cells using the highly sensitive real-time chemiluminescent probe pholasin: inhibition of antigen-induced mast cell degranulation by macrophage-derived hydrogen peroxide. *J. Immunol.* 169:5866
- 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
- Talkington J. and Nickell S. P. (1999) *Borrelia burgdorferi* spirochetes induce mast cell activation and cytokine release. *Infect. Immun.* 67:1107
- Tantavahi R. V., Stevens R. L., Austen K. F. and Weis J. H. (1986) A single gene in mast cells encodes the core peptides of heparin and chondroitin sulfate proteoglycans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9207
- Travis E. R., Wang Y-M., Michael D. J., Caron M. G. and Wightman R. M. (2000) Differential quantal release of histamine and 5-hydroxytryptamine from mast cells of vesicular monoamine transporter 2 knockout mice. *PNAS.* 97:162
- 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 Immunology* 12, 675-685.
- Turner H. and Kinet J. P. (1999) Signalling through the high-affinity IgE receptor FcεRI. *Nature* 402:B24
- Uber C. L., Roth R. L. and Levy D. A. (1980) Expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* by mice deficient-mast cells. *Nature* 287:226
- Umeno E., Nadel J. A., Huang H. A. T. and McDonald D. M. (1989) Inhibition of neutral endopeptidase potentiates neurogenic inflammation in the rat trachea. *J. Appl. Physiol.* 66:2647
- Umeno E., Nadel J. A. and McDonald D. M. (1990) Neurogenic inflammation of the rat trachea: fate of neutrophils that adhere to venules. *J. Appl. Physiol.* 69:2131
- 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
- van Der K. D., Latz E., Brouwers J. F., Kruize Y. C., Schmitz M., Kurt-Jones E. A., Espevik ., de Jong E. C. Kapsenberg M. L., Golenbock D. T., Tielens A. G. and Yazdanbakhsh M. (2002) A novel host parasite lipid cross-talk. *Schistosoma* lysophosphatidylserine activates Toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J. Biol. Chem.* 277:48122
- Varadaradjalou S., Feger F., Thieblemont N., Hamouda N. B., Pleau J. M., Dy M. and Arock M. (2003) Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human mast cells. *Eur. J. Immunol.* 33:899

- Vasselon T. and Detmers P. A. (2002) Toll-like receptors: a central element in innate immune responses. *Infect. Immun.* 70:1033
- Vergnolle N., Wallace J. L., Bunnett N.W. and Hollenberg M. D. (2001) Protease-activated receptor in inflammation, neuronal signaling and pain. *Trends Pharmacol. Sci.* 22:146
- Vliagoftis H. and Befus A. D. (2005) Rapidly changing perspectives about mast cells at mucosal surfaces. *Immunol. Rev.* 206:190
- Vowells S. J., Sekhsaria S., Malech H. L., Shalit M. and Fleisher T. A. (1995) Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *J. Immunol. Meth.* 178:89
- Wakelin D. (1993) *Trichinella spiralis*: Immunity, ecology and evolution. *J. Parasitol.* 79:488
- Wang C. H., 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 OX8⁻ OX22⁻ and OX8⁻ OX22⁺ cells. *Immunol.* 71:166
- Wang L., Stanisz A. M., Wershil B. K., Galli S. J. and Perdue M. H. (1995) Substance P induces ion secretion in mouse small intestine though effects on enteric nerves and mast cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 269:G85
- Wang H. W., Tedia N., Lloyd A. R., Wakefield D. and McNeil P. H. (1998) Mast cell activation and migration to lymph nodes during induction of an immune response in mice. *J. Clin Invest.* 102:1617
- Wedemeyer J., Tsai M. and Galli S. J. (2000) Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr Opin Immunol.* 12:624
- Weinreich D., Udem B. J. and Leal-Cardoso J. H. (1992) Functional effects of mast cell activation in sympathetic ganglia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 664:293
- Weinreich D. (1995) Cellular mechanisms of inflammatory mediators acting on vagal sensory nerve excitability. *Pulm. Pharmacol.* 8:173
- Williams C. M. M. and Galli S. J. (2000) The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105:847
- Windmiller D. A. and Baker J. M. (2003) Distinct phosphoinositide 3-kinases mediate mast cell degranulation in response to G-protein-coupled versus FcεRI receptors. *J. Biol. Chem.* 278:11874
- Wisniewski N., McNeil M., Grieve R. B. and Wassom D. L. (1993) Characterization of novel fucosyl containing glycoconjugates from *Trichinella spiralis* muscle stage larvae. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61:25
- Wolfreys K. D. and Oliveira B. G. (1997) Alterations in intracellular reactive oxygen species generation and redox potential modulate mast cell function. *Eur. J. Immunol.* 27:297
- 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
- Woolhiser M. R., Okayama Y., Gilfillan A. M. and Melcalfe D. D. (2001) IgG-dependent activation of human mast cells following up-regulation of FcγRI by IFNγ. *Eur. J. Immunol.* 31:3298

Yano H., Wershil B. K., Arizono N. and Galli S. J. (1989) Substance P-induced augmentation of cutaneous vascular permeability and granulocyte infiltration in mice is mast cell dependent. *J. Clin. Invest.* 84:1276

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

Yu L. and Perdue M. H. (2001) Role of mast cells in intestinal mucosal function: studies in models of hypersensitivity and stress. *Immunol Rev* 179:61

Zar J. H. (1994) *Biostatistical Analysis*, 3rd ed., Prentice Hall Int. NJ

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

Trichinella spiralis: Histamine secretion induced by TSL-1 antigens from unsensitized mast cells

Narcy G. Arizmendi-Puga^{a,b}, J. Antonio Enciso^c, Guadalupe Ortega-Pierres^d, Zhongwei Zhao^a, Marek Duszyk^a, Marina Ulanova^a, A. Dean Befus^a, Lilián Yépez-Mulia^{b,*}

^a Pulmonary Research Group, Department of Medicine, and Department of Physiology, University of Alberta, Edmonton, Alta., Canada

^b UIMEIP-Pediatría, CMN-Siglo XXI, IMSS, Mexico City, Mexico

^c UIMS-Zacatecas, IMSS, Mexico

^d Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV, Mexico City, Mexico

Received 12 October 2005; received in revised form 8 February 2006; accepted 10 February 2006

Abstract

Mast cells' hyperplasia and activation are prominent features in *Trichinella spiralis* infection. Recently, it was shown that TSL-1 antigens from *T. spiralis* muscle larvae induce IL-4 and TNF release by unsensitized, normal mast cells (MC) involving an Ig-independent mechanism. In this study, we characterized histamine secretion induced by TSL-1 antigens from normal, unsensitized rat peritoneal MC. Maximum histamine secretion ($30 \pm 5.3\%$ SEM, $n = 13$) was achieved with 30 ng/mL TSL-1 antigens. However, TSL-1 did not induce an increase in β -hexosaminidase release or NADPH oxidase activity by MC. Interestingly, histamine secretion by TSL-1 was completed at 10 s, and was inhibited by both *Bordetella pertussis* toxin and neuraminidase V, characteristics similar to those involved in substance P-induced histamine secretion. However, in contrast to substance P, TSL-1 induced histamine secretion in the absence of detectable changes in intracellular Ca^{2+} . We are investigating the molecular pathways involved in MC activation by TSL-1.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Index Descriptors and Abbreviations: *Trichinella spiralis*; TSL-1 antigens; *Trichinella spiralis* muscle larvae antigens; Substance P; Nematode; MC, mast cells; ML, muscle larvae

1. Introduction

The expulsion of *Trichinella spiralis* adult worms from the intestine of infected animals is a major component of the defence against infection (Lawrence, 2003). There is a temporal correlation between the kinetics of mucosal mastocytosis, release of inflammatory mediators from mast cells (MC) and adult worm loss (Alizadeh and Wakelin, 1982; Moqbel et al., 1987; Tuohy et al., 1990). In mice, worm expulsion is MC dependent (Urban et al., 2000). Mice deficient in MC protease 1 showed a delayed rejection of the parasite (Knight et al., 2000). There is abundant evidence for MC hyperplasia and activation in *T. spiralis*

infection in rats, but the role for MC in worm expulsion is less clear than in mice. Indeed, Wang et al. (1990) suggested that MC are probably not involved in expulsion of worms from the intestine to terminate a primary infection. However, it is well known that MC are involved in the intestinal pathophysiology of the infection in rats (Harari et al., 1987). Interestingly, mice infected with *T. spiralis*, but deficient in the common γ chain of Fc receptors, expelled adult worms efficiently and had a strong intestinal MC response, including secretion of mucosal MC protease 1 (Grencis, 1997; Onah et al., 2000). These data suggested that MC were activated through an Ig-independent mechanism and participated in worm expulsion. However, specific parasite antigens involved in this activation had not been defined.

We have investigated if antigens produced by the muscle larvae (ML) stage of *T. spiralis* (TSL-1 antigens) could be involved in the direct activation of MC. TSL-1 antigens

* Corresponding author. Fax: +52 55 5627 6949.

E-mail address: lilianyepesz@yahoo.com (L. Yépez-Mulia).

induce protection against infection reducing both adult and ML burdens and could involve MC in the intestine or elsewhere, e.g., muscle (Gamble et al., 1986; Ortega-Pierres et al., 1989). These antigens are a group of at least six glycoproteins, which share a unique carbohydrate epitope. These molecules are a novel family of tri- and tetra-antennary N-linked structures with sub-terminal *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) residues that are β -linked to *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) (Reason et al., 1994). The antennae glycans are uniformly fucosylated in their GlcNAc residues. All antennae glycans are capped with 3,6-dideoxy-D-arabinohexose tyvelose (Morelle et al., 2000; Wisniewski et al., 1993) which confers their immunodominance and recognition by a wide range of hosts (Denkers et al., 1990; Robinson et al., 1991; Yépez-Mulia et al., 1996). We previously demonstrated that TSL-1 antigens can activate freshly isolated rat peritoneal MC through an Ig-independent mechanism leading to release of histamine, MC protease 5, and TNF (Arizmendi-Puga et al., 1997). Direct binding of TSL-1 antigens to a rat mast cell line (HRMC) was shown to increase IL-4 and TNF at mRNA and protein levels (Arizmendi et al., 2001; Niborski et al., 2004). It is well known that the participation of these two cytokines in the initial inflammatory response observed in *Trichinella*-infected animals associated with enteropathy (TNF and IL-4) and parasite expulsion (IL-4) (Lawrence et al., 1998). Within the intestinal mucosa of infected animals, MC activated by TSL-1 antigens may be the source of IL-4 and TNF.

There are several secretagogues such as human neutrophil defensins, the anaphylatoxins C3a and C5a, bee venom peptides, compound 48/80, polylysine, substance P, neurotensin, vasoactive intestinal peptide, somatostatin, and Toll-like receptor agonists that induce histamine release from MC through Ig-independent pathways (Befus et al., 1999; Foreman, 1993; Fukuoka and Hugli, 1990; Janiszewski et al., 1994; Marshall, 2004; Mousli et al., 1992; Niyonsaba et al., 2001; Shanahan et al., 1985; Vliagoftis and Befus, 2005). Substance P is a neuropeptide contained in extrinsic (sensory) and intrinsic (enteric) neurons innervating the gastrointestinal tract (Otsuka and Yoshioka, 1993) involved in the formation of gaps between endothelial cells of postcapillary venules, inducing plasma protein extravasation, inflammatory cell recruitment, and degranulation of intestinal MC (Bowden et al., 1994; McDonald et al., 1996; Quinlan et al., 1998; Wang et al., 1995). It is known to activate both mucosal and connective tissue MC (Janiszewski et al., 1994; Pearce et al., 1982). Also, abundant evidence indicates that its uncontrolled release within intestinal tissues promotes a sequence of events referred to as “neurogenic inflammation” (McDonald et al., 1996). Substance P secretion is increased in the jejunum of *T. spiralis*-infected rats (Swain et al., 1992) and in other animal models of intestinal inflammation (Castagliuolo et al., 1997; Sturiale et al., 1999).

Because both TSL-1 antigens and substance P are present in *T. spiralis*-infected animals and can activate MC and release histamine, we compared characteristics of histamine

secretion from unsensitized rat peritoneal MC induced by these *T. spiralis*-specific antigens with those associated with substance P activation of MC. The mechanism involved in histamine secretion by TSL-1 antigens shares some features with substance P-induced histamine release (occurs rapidly \sim 5 s; and is inhibited by *Bordetella pertussis* toxin and neuraminidase V). Interestingly, TSL-1 antigens did not induce β -hexosaminidase release, NADPH oxidase activity nor did they have a demonstrable effect on intracellular Ca^{2+} mobilization by peritoneal MC.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Sprague–Dawley rats weighing over 250 g were obtained from Charles River Canada and maintained in an isolated room in filter-top cages to minimize unwanted infections. Food and water were provided ad libitum and animals were maintained on a 12 h dark–12 h light (07:00–19:00) cycle. Experimental procedures were approved by the University of Alberta Animal Care Committee in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and by the Mexican Institute of Social Security.

2.2. Parasites and antigens

Trichinella spiralis (MSUS/MEX/91/CM-91) was maintained in Sprague–Dawley rats which were orally infected with 3000 muscle larvae (ML). ML were recovered by acid pepsin digestion of muscle from infected rats according to Dennis et al. (1970). *T. spiralis* surface antigens (TSL-1 antigens) were purified by affinity chromatography using monoclonal antibody NIM-M1 following the procedure previously described by Ortega-Pierres et al. (1989). The presence of endotoxin in TSL-1 antigens was tested using the kit (Sigma) and shown to be negative (<0.1 EU/mL). The sensitivity of the Lit E-Toxate kit is 0.015 EU/mL.

Either normal rats or rats infected with 3000 third stage larvae of the nematode, *Nippostrongylus brasiliensis*, 35–100 days prior to experiments (Shanahan et al., 1985), or rats infected with 3000 *T. spiralis* 28 days prior to experiments were used to isolate peritoneal MC and characterize histamine secretion.

2.3. Mast cell isolation

Peritoneal MC obtained from male rats were enriched as described (Lee et al., 1985). Briefly, 15 mL of cold HEPES-buffered Tyrode's (HTB) solution containing 12 mM HEPES and 1% BSA (Sigma) pH 7.3 was injected into the peritoneal cavity. The abdomen was massaged and the fluids were collected on ice and centrifuged for 5 min at 180g at 4°C. The recovered cells were layered on a 30%:80% discontinuous gradient of Percoll (Pharmacia) and centrifuged at 220g for 20 min at 4°C. Peritoneal MC recovered from the cell pellet were washed once in HTB and examined for purity

($\geq 98\%$ by toluidine blue staining; contaminating cells were largely small lymphocytes) and viability ($\geq 98\%$, by trypan blue exclusion) (Shanahan et al., 1985). They were kept on ice until exposure to either TSL-1 antigens or other secretagogues.

2.4. TSL-1 antigen stimulation of peritoneal MC determined by ruthenium red staining

Unsensitized peritoneal MC (25×10^3 , $\geq 98\%$ purity) were simultaneously incubated with 0.005% of ruthenium red dye (Sigma) and 30 ng/mL TSL-1 antigens at 37°C for 30 min. Positive controls included unsensitized peritoneal MC incubated with ruthenium red dye in the presence of 2.5×10^{-6} M of A23187 (Sigma), 1 μ g/mL compound 48/80 (Sigma) or unsensitized peritoneal MC incubated with 1 μ g/mL anti-DNP IgE (Sigma) for 2 h at 37°C and exposed to 50 ng/mL DNP-HAS (Sigma) at 37°C for 30 min. Unsensitized peritoneal MC incubated with ruthenium red dye alone were included as negative controls. The cells were analysed by light microscopy and results are given as the percentage of stained cells determined in three independent experiments done in duplicate.

2.5. Histamine secretion

For studies on histamine secretion, 25×10^3 highly enriched peritoneal MC were incubated in duplicate in HTB at 37°C for 10 min with different concentrations (1–100 ng/mL) of TSL-1 antigens or 10 worm equivalent/mL (WE/mL) of *N. brasiliensis* antigens. MC without treatment (spontaneous release) or stimulated with 2.5×10^{-6} M calcium ionophore A23187 were included as negative and positive controls, respectively. For an IgE-dependent pathway of histamine release, *N. brasiliensis* sensitized peritoneal MC were stimulated with the homologous antigen (10 WE/mL). After incubation, MC were centrifuged at 4°C to separate the supernatant and cell pellet. The pellets were resuspended in 200 μ L of HTB and the samples were boiled for 10 min to release cell-associated histamine and destroy histaminase activity. After TCA (25%) precipitation of proteins, histamine levels were measured in both supernatant and pellet fractions by fluorometric assay (Shore et al., 1959) using a Cytofluor™ 2350 fluorescence measurement system (Millipore). Histamine release was expressed as a percentage of the total cellular histamine content as calculated by the formula: (histamine in supernatant/histamine in supernatant and pellet) $\times 100$. Spontaneous histamine release was obtained from MC in HTB alone.

2.6. Hexosaminidase secretion

β -Hexosaminidase activity was measured in medium and cell lysates (by freeze/thawing) by hydrolysis of the substrate 4-methylumbelliferyl *N*-acetyl- β -D-glucosamide (Sigma) according to Cromwell et al. (1991). For this,

25×10^3 highly enriched peritoneal MC were incubated in duplicate in HTB at 37°C for 10 min with different concentrations (1–100 ng/mL) of TSL-1 antigens or 10 WE/mL of *N. brasiliensis* antigens. MC without treatment (spontaneous release) or stimulated with 2.5×10^{-6} M calcium ionophore A23187 were included as negative and positive controls, respectively. An IgE-dependent pathway of β -hexosaminidase release was also included. Results are reported as the percentage of intracellular β -hexosaminidase that was released into the medium after correction for spontaneous release.

2.7. Time course of histamine secretion induced by TSL-1 antigens and different secretagogues

To examine the time course of histamine secretion, *N. brasiliensis* antigens (10 WE/mL), substance P (10^{-5} M) (Sigma), calcium ionophore A23187 (2.5×10^{-6} M), and 30 ng/mL TSL-1 antigens were used. The activation protocol was as described above, but secretion was abruptly terminated at various times by placing the tubes on ice, and then separating into supernatant and pellet fractions by centrifugation at 150g for 5 min at 4°C.

2.8. Modulation of histamine secretion by *B. pertussis* toxin and neuraminidase treatment

MC (25×10^3 , $\geq 98\%$ purity) were incubated in duplicate and pre-treated with different concentrations of *B. pertussis* toxin (Sigma) or neuraminidase V (Sigma) at 37°C for 2 or 1 h, respectively (Bueb et al., 1990; Coleman et al., 1986). After incubation, cells were sedimented (150g, 5 min) and washed three times in 1 mL of HTB. Peritoneal MC were resuspended in pre-warmed HTB with *N. brasiliensis* antigens (10 WE/mL), substance P (10^{-5} M) (Sigma), or with 30 ng/mL TSL-1 antigens for 10 min at 37°C. Reactions were terminated by centrifugation at 150g for 5 min and supernatants were removed.

2.9. In vitro analysis of NADPH oxidase activity by flow cytometry

For studies on NADPH oxidase activity in peritoneal MC, we used a method based on oxidation of dihydroxy-rhodamine (DHR) 123, originally described for granulocytes (Vowells et al., 1995). Briefly, $0.5\text{--}1 \times 10^6$ peritoneal MC were loaded with 5×10^{-5} M DHR 123 (Molecular Probes) at room temperature (RT) for 10 min. After loading with DHR 123, cells were incubated with either 1 μ g/mL of the calcium ionophore A23187 or 30 ng/mL TSL-1 antigens or a combination of both for 10 min at RT. A portion of cells loaded with DHR alone was used as a control for background fluorescence in the absence of stimulation. Following stimulation, cells produce reactive oxygen species (ROS), which cause oxidation of non-fluorescent dye DHR 123 to fluorescent rhodamine 123. A fluorescence signal emitted by the cells was measured on 1×10^4 cells using the FACScan (Becton–Dickinson). In some experiments,

peritoneal MC were pre-incubated for 15 min at RT with the nitric oxide synthase inhibitor, 1×10^{-5} M *N*-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (Sigma) and further stimulated with either $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ of the calcium ionophore A23187 or $30 \text{ ng}/\text{mL}$ TSL-1 antigens or a combination of both. Cells loaded with DHR plus L-NAME were used as control for background fluorescence in the absence of stimulation.

2.10. Intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ measurements in peritoneal MC treated with TSL-1 antigens

Peritoneal MC ($1 \times 10^6/\text{mL}$, $\geq 98\%$ purity) obtained from unsensitized rats were loaded with HTB containing 4×10^{-6} M of the ratiometric Ca^{2+} dye FURA-2AM (Molecular Probes) for 30 min at 37°C . Cells were washed three times and resuspended in HTB, followed by additional 20 min incubation at 37°C . After loading, cells were pre-warmed in a cuvette with a small magnetic stirrer for 20 min at 37°C and then exposed to $30 \text{ ng}/\text{mL}$ TSL-1 antigens. The fluorescence of FURA-2AM was monitored in a fluorimeter (Photon Technology), after approximately 10 min of exposure to TSL-1 antigens. One microgram per millilitre of compound 48/80 (Sigma) was added as a positive control to evaluate intracellular calcium changes. Other control samples containing peritoneal MC obtained from rats infected with *T. spiralis* were run in parallel, and used

for TSL-1 antigen activation of IgE sensitized MC. The ratios of maximum and minimum fluorescence were terminated by the addition of Triton X-100 (0.4%) (Sigma) and 0.9 M EGTA/10 mM Tris, pH 8.8 (Sigma), respectively. Fluorescence was monitored at $\lambda_{\text{ex1}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex2}} = 380 \text{ nm}$, and $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$, and the data are presented as intracellular Ca^{2+} concentration calculated from the formula given by Grynkiewicz et al. (1985); data were collected every second.

2.11. Statistical analysis

Data are given as means \pm SEM. Differences were assessed for statistical significance ($p < 0.05$) by two-way ANOVA and Dunnet's multiple comparison test.

3. Results and discussion

3.1. Ruthenium red uptake by unsensitized peritoneal MC stimulated with TSL-1 antigens

The stimulation of unsensitized peritoneal MC by TSL-1 antigens and other secretagogues was evaluated by incubation with ruthenium red dye that can enter cells undergoing degranulation (Fig. 1). The percentage of cells stimulated with TSL-1 antigens (Fig. 1B) that became ruthenium red positive was $30 \pm 7\%$. Values for positive controls were

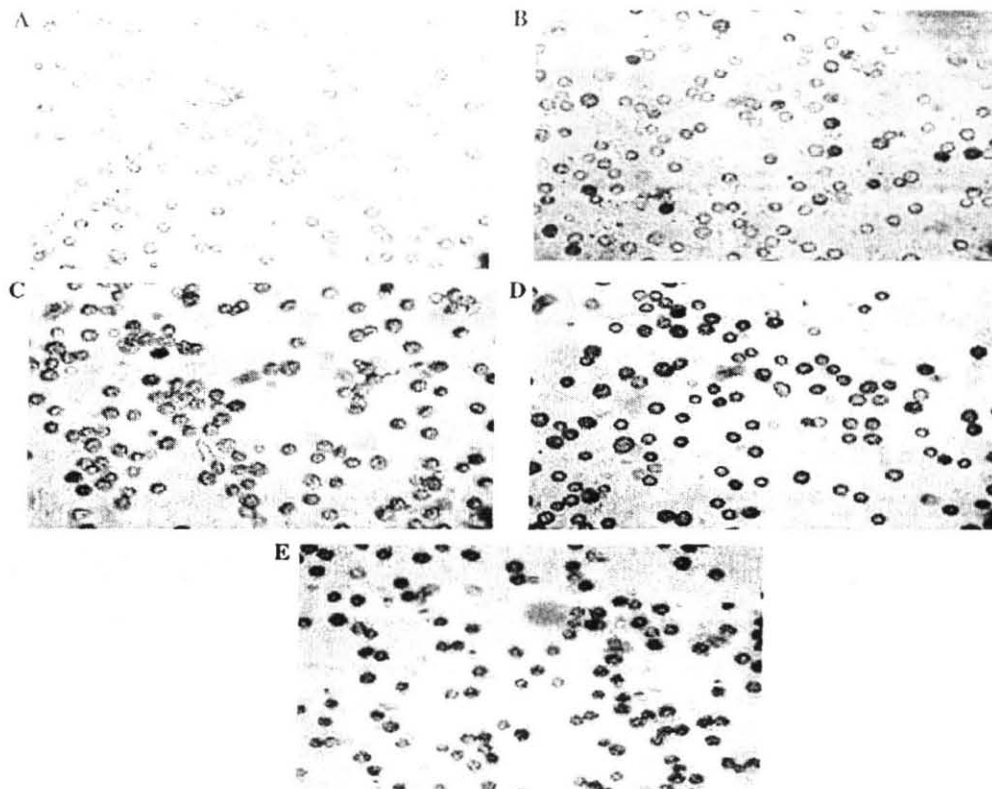


Fig. 1. Unsensitized peritoneal MC activated by different secretagogues. Peritoneal MC were pre-incubated with 0.005% of ruthenium red dye and $30 \text{ ng}/\text{mL}$ TSL-1 antigens (B), 2.5×10^{-6} M, A23187 (C), $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ compound 48/80 (D), and $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ anti-IgE (E) at 37°C for 30 min. Peritoneal MC incubated with ruthenium red dye alone were incubated as negative controls (A). This figure is representative of three independent experiments done in duplicate.

85 ± 8% for A23187 (Fig. 1C), 95 ± 2% for compound 48/80 (Fig. 1D), and 81 ± 11% for IgE/anti-IgE (Fig. 1E). For sham-treated cells 6 ± 6% were positive (Fig. 1A). The percentage of MC stained by ruthenium red following TSL-1 antigen treatment was significantly different from the negative control ($p < 0.01$) and from the positive controls (A23187, 48/80 or IgE/anti-IgE) ($p < 0.05$). Thus, TSL-1 antigens activate a portion of the unsensitized MC population in a manner that makes them permeable to ruthenium red, although this portion is smaller than that activated by other secretagogues studied. Why only 30% of the MC respond to TSL-1 antigens is unknown, although, it is well known that depending upon recent environmental stimuli the proportion of MC in a population that are responsive can vary (Gilchrist et al., 2003).

3.2. Histamine and β -hexosaminidase secretion from unsensitized peritoneal MC treated with TSL-1 antigens

To examine the ability of TSL-1 antigens to stimulate unsensitized peritoneal MC, cells were exposed to different concentrations of TSL-1 antigens and both histamine and β -hexosaminidase secretion was determined. Maximum levels of histamine release (30 ± 5.3%, $n = 13$) were observed at 30 ng/mL (Fig. 2). Spontaneous histamine release and values from peritoneal MC exposed to A23187 (2.5×10^{-6} M) were 6 ± 0.4, and 70 ± 2.8%, respectively. Interestingly, *N. brasiliensis* Ag (10 WE/mL) did not activate unsensitized peritoneal MC as *N. brasiliensis* sensitized peritoneal MC stimulated with homologous antigen did (32 ± 8%). Dunnet's multiple comparison test showed that histamine release obtained at 5, 10, and 30 ng/mL TSL-1 antigens was statistically significant ($p < 0.05$) compared to spontaneous release. Thus, for further studies of the mechanisms involved in histamine secretion, 30 ng/mL of TSL-1 antigens was used.

By contrast to histamine secretion, no β -hexosaminidase release was detected from unsensitized MC with TSL-1

antigens (Fig. 3). However, β -hexosaminidase release from peritoneal MC exposed to A23187 and from *N. brasiliensis* sensitized peritoneal MC stimulated with homologous antigen were 64 ± 6 and 68 ± 8%, respectively.

It was of interest that TSL-1 antigens induced histamine release but not β -hexosaminidase. In this context, it is well known that MC secretion can be selectively modulated by bacterial toxins (Feger et al., 2002; McCurdy et al., 2003; Supajatura et al., 2001). For example, Calderón et al. (1998) reported the release of TNF but not histamine by peritoneal MC activated with *Clostridium difficile* toxin A. There is increasing evidence that MC and other granulocytes such as eosinophils can release their different mediators in a highly selective and differential manner (piecemeal degranulation) that might be regulated by several signals (Dvorak, 2000; Erjefalt et al., 2001; Lacy et al., 2001). However, to our knowledge this is the first example of selective secretion of the granule mediators histamine and β -hexosaminidase, although previous studies have shown differential release of histamine and serotonin, both of which are thought to be stored in the same granules (Theoharides et al., 1982).

3.3. Time course of histamine secretion from unsensitized peritoneal MC

MC were exposed to TSL-1 antigens and to different secretagogues and histamine secretion was evaluated (Fig. 4). The maximum release of histamine induced by A23187 (not shown) was rapid (5 s). Release of histamine by TSL-1 antigens followed a time course similar to that of substance P with over 75% of the maximal histamine release at 5 s and maximal histamine release for TSL-1 antigens was achieved at 20 s ($n = 6$). Histamine release by an IgE allergen-dependent pathway reached 40% of the maximal histamine release at 5 s as described previously (Befus et al., 1999), and was maximal by 10 s (32%).

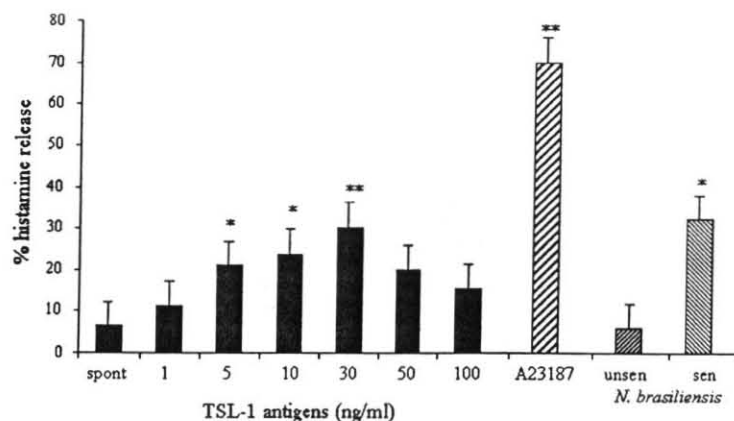


Fig. 2. Histamine secretion from unsensitized peritoneal MC activated by TSL-1 antigens. Peritoneal MC were incubated with different concentrations of TSL-1 antigens at 37 °C for 10 min. Spontaneous (spont) histamine release from non-exposed peritoneal MC is shown, as well as values obtained from unsensitized (unsen) peritoneal MC exposed to *N. brasiliensis* Ag (10 WE/mL). Histamine release from peritoneal MC exposed to A23187 (2.5×10^{-6} M) and *N. brasiliensis* sensitized (sen) peritoneal MC stimulated with homologous antigen are included as positive controls. Values are means ± SEM ($n = 13$). Histamine secretion by TSL-1 antigens at 5, 10, and 30 ng/mL is significantly different from spontaneous histamine release (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

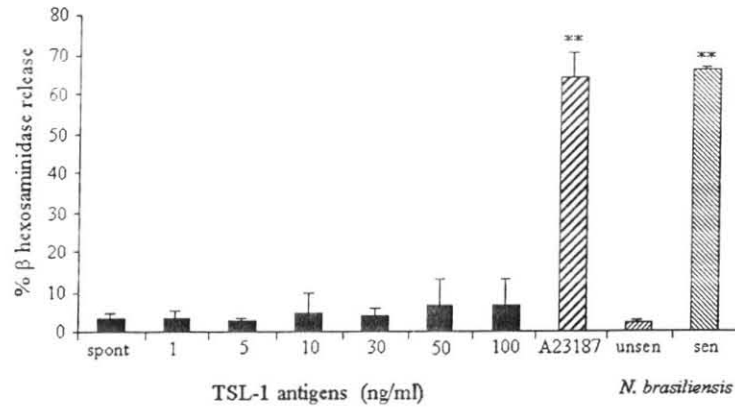


Fig. 3. β -Hexosaminidase secretion from unsensitized peritoneal MC activated by TSL-1 antigens. Peritoneal MC were incubated with different concentrations of TSL-1 antigens at 37 °C for 10 min. Spontaneous (spont) β -hexosaminidase release from non-exposed peritoneal MC is shown, as well as values obtained from unsensitized (unsens) peritoneal MC exposed to *N. brasiliensis* Ag (10 WE/mL). Hexosaminidase release from peritoneal MC exposed to A23187 (2.5×10^{-6} M) and *N. brasiliensis* sensitized (sen) peritoneal MC stimulated with homologous antigen are included as positive controls. Values are means \pm SEM ($n = 8$; ** $p < 0.01$).

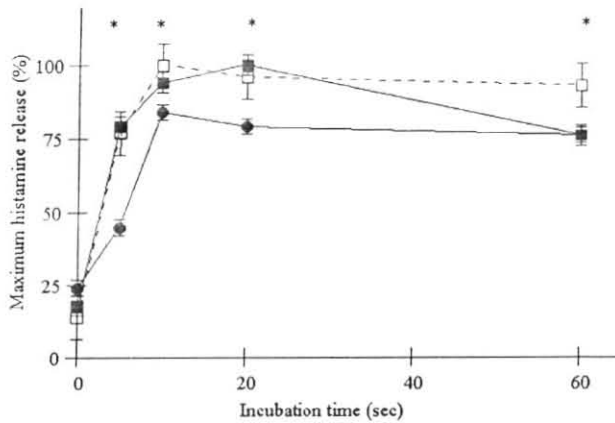


Fig. 4. Time-course analysis of specific histamine secretion induced by TSL-1 antigens (■, 30 ng/mL) and substance P (□, 10^{-5} M). *N. brasiliensis* sensitized MC were stimulated with the homologous antigen (●, 10 WE/mL). Values are means \pm SEM; $n = 5$ –7 experiments for each secretagogue. TSL-1 antigens and substance P are significantly different from *N. brasiliensis* Ag at 5 s (* $p \leq 0.05$). Maximum histamine value was determined according to each secretagogue, taking higher % value of histamine release as 100% and lower values adjusted to this 100% of histamine release.

3.4. Modulation of histamine secretion by *B. pertussis* toxin and neuraminidase treatment

Given that TSL-1 antigens activated unsensitized peritoneal MC with a similar time course to substance P, and since histamine release induced by substance P is sensitive to the G protein inhibitor *B. pertussis* toxin, we evaluated the effects of *B. pertussis* toxin on histamine secretion induced by TSL-1 antigens. *B. pertussis* toxin treatment inhibited histamine release by TSL-1 antigens similar to its effects on substance P-induced histamine secretion (Fig. 5). The maximum inhibition for TSL-1 antigens and substance P occurred at 100 ng/mL *B. pertussis* toxin ($73 \pm 8.1\%$, $n = 7$ and $72 \pm 5.7\%$, $n = 10$, respectively). However, with *N. bra-*

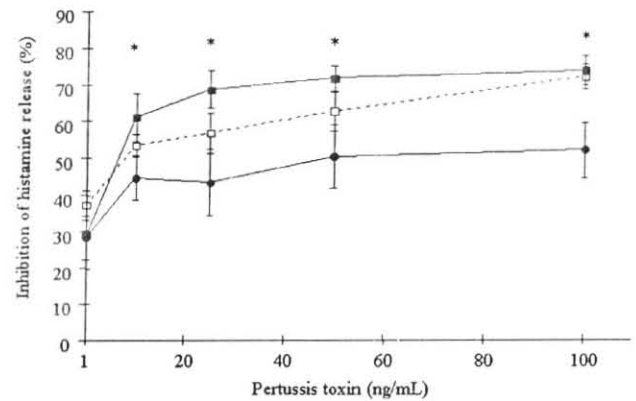


Fig. 5. Effects of pre-treatment with *B. pertussis* toxin on the inhibition of specific histamine secretion stimulated by TSL-1 antigens (■, 30 ng/mL) and substance P (□, 10^{-5} M). After treatment with *B. pertussis* toxin (2 h, 37 °C), unsensitized peritoneal MC were incubated with secretagogues at 37 °C for 10 min. *N. brasiliensis* sensitized MC were also pre-treated with *B. pertussis* toxin and stimulated with the homologous antigen (●, 10 WE/mL). Values are means \pm SEM; $n = 6$ –10 experiments for each secretagogue. TSL-1 antigens and substance P are significantly different from *N. brasiliensis* Ag (* $p \leq 0.05$).

siliensis sensitized peritoneal MC the response to homologous antigens reached a maximum inhibition of $50 \pm 5.1\%$ ($n = 6$). The magnitude of inhibition of histamine secretion by *B. pertussis* toxin was significantly greater for TSL-1 antigens and substance P than for *N. brasiliensis*-induced secretion ($p < 0.05$).

It is well known that histamine secretion induced by substance P is sensitive to inhibition by the removal of sialic acid residues from the cell surface using neuraminidase V. To assess the sensitivity of TSL-1 antigen-induced histamine secretion to neuraminidase in comparison to substance P, unsensitized peritoneal MC were incubated with different concentrations of neuraminidase V (0.01–0.1 U/mL) and then exposed to substance P or TSL-1 antigens.

Inhibition of histamine secretion was observed, reaching $32 \pm 2.2\%$ ($n = 10$) and $57 \pm 6.3\%$ ($n = 12$) at 0.1 U/mL neuraminidase V, for substance P and TSL-1 antigens, respectively (Fig. 6). In our experiments, there was no significant effect of neuraminidase on histamine release induced by *N. brasiliensis* Ag on sensitized peritoneal MC. It has been demonstrated that antigen-IgE-dependent histamine secretion is less sensitive to neuraminidase treatment than sub-

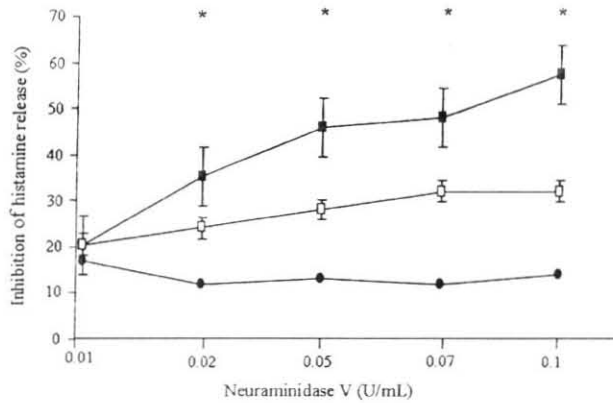


Fig. 6. Effects of pre-treatment with neuraminidase V on the inhibition of specific histamine secretion stimulated by TSL-1 antigens (■, 30 ng/mL) and substance P (□, 10^{-5} M). After the treatment with neuraminidase V (1 h, 37°C) unsensitized peritoneal MC were incubated with secretagogues at 37°C for 10 min. *N. brasiliensis* sensitized MC were also pre-treated with neuraminidase V and stimulated with the homologous antigen (●, 10 WE/mL). Values are means \pm SEM; $n = 10$ –12 experiments for each secretagogue. TSL-1 antigens and substance P are significantly different from *N. brasiliensis* Ag (* $p \leq 0.05$).

stance P-induced histamine secretion (Coleman et al., 1986). Our results show that *B. pertussis* toxin inhibited histamine release induced by TSL-1 antigens, suggesting the participation of G proteins in TSL-1 antigen-induced histamine secretion. Similarly, treatment with neuraminidase V demonstrated that histamine release induced by both TSL-1 antigens and substance P is dependent on surface sialic acid residues. Therefore, altogether our data demonstrate that histamine release induced by TSL-1 antigens shares some features with that of substance P.

3.5. Evaluation of oxidative burst of peritoneal MC exposed to TSL-1 antigens

Previous studies have shown that rat peritoneal MC generate intracellular reactive oxygen species (ROS) upon activation with calcium ionophore A23187 and that ROS enhance histamine release from MC (Niu et al., 1996; Wolfreys and Oliveira, 1997). Thus, to define the spectrum of effects of TSL-1 antigens on MC we investigated if TSL-1 antigens would induce ROS production. In our studies, peritoneal MC exposed to A23187 showed a higher oxidative activity (MFI 148; Fig. 7B) than non-stimulated peritoneal MC (MFI, 50; Fig. 7A). However, TSL-1 antigens had no demonstrable effect on the oxidative burst by normal peritoneal MC (Fig. 7C). Because nitric oxide (NO) has an inhibitory effect on ROS production from MC (Brooks et al., 1999), we assessed whether TSL-1 antigens might induce NO production that would inhibit the oxidative burst. For this, peritoneal MC were pre-incubated with

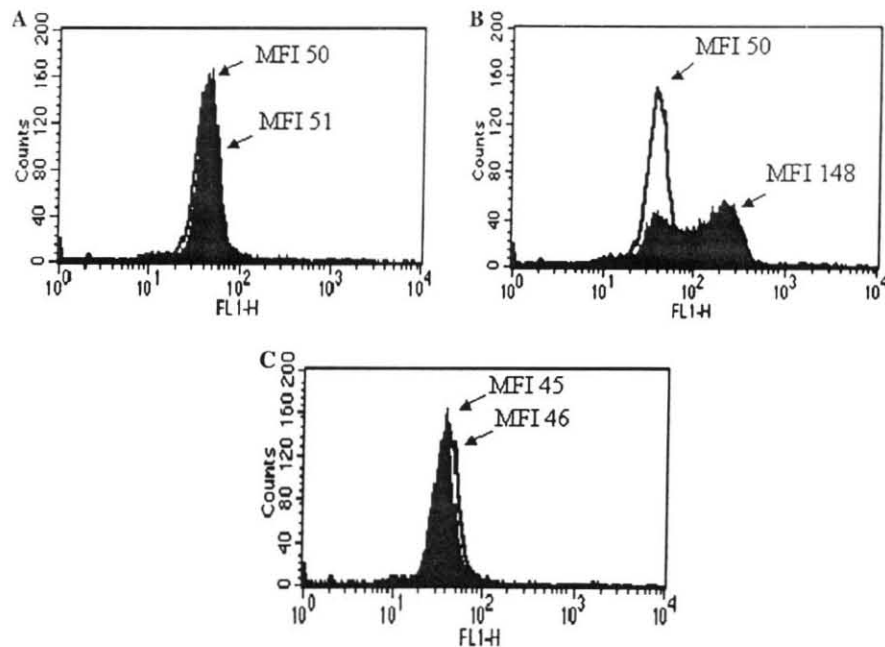


Fig. 7. In vitro flow cytometric analysis of NADPH oxidase activity of peritoneal MC using DHR 123. Peritoneal MC (0.5 – 1×10^6) were loaded with DHR 123 5×10^{-5} M for 10 min at room temperature (RT) and consequently stimulated with 30 ng/mL TSL-1 antigens or 1 μ g/mL A23187 for 10 min at RT. Filled histograms represent cells activated by stimulus, whereas empty histograms those loaded with DHR 123, but not stimulated. (A) Unstimulated peritoneal MC; (B) peritoneal MC plus A23187 showed oxidative burst compared to unstimulated peritoneal MC; (C) peritoneal MC plus TSL-1 antigens showed no measurable ROS. Mean fluorescence intensity (MFI).

L-NAME (NOS inhibitor) and their oxidative activity in the presence of TSL-1 antigens was determined. However, even in the presence of this inhibitor, it was not possible to measure any oxidative burst in non-sensitized peritoneal MC exposed to TSL-1 antigens (data not shown). Both TSL-1 and A23187 were used together in some experiments and TSL-1 did not inhibit the A23187 response.

3.6. Intracellular Ca^{2+} measurements

Because there is an absolute requirement for elevated intracellular Ca^{2+} in an IgE-dependent MC secretion and this depends on Ca^{2+} influx (Kim et al., 1997), we investigated if TSL-1 antigen-induced histamine release was associated with changes in intracellular Ca^{2+} . To evaluate this, MC exposed to TSL-1 antigens were incubated with FURA-2AM and changes in calcium levels were measured. Interestingly, despite inducing histamine secretion, various concentrations (30–450 ng/mL, $n = 11$) of TSL-1 antigens did not alter intracellular calcium levels in unsensitized peritoneal MC (Fig. 8A). By contrast, when *T. spiralis* sensitized peritoneal MC were exposed to 30 ng/mL TSL-1 antigens, there was an immediate increase in Ca^{2+} levels (Fig. 8B). As is well known for several secretagogues including IgE-antigen and substance P, the positive control compound 48/80 induced a strong Ca^{2+} signal in both unsensitized and sensitized MC (Figs. 8A and B). Interestingly, in contrast to IgE-dependent MC activation, TSL-1 antigens induced histamine release in the absence of Ca^{2+} mobilization in unsensitized MC. Recent evidence suggests that phosphoinositide (PI) 3-kinase class IA p110 α mediates a calcium-independent signal during MC degranulation (Windmiller and Backer, 2003). Given the surprising evidence that TSL-1 antigens induced histamine release by a process that involves a Ca^{2+} -independent pathway, current investigation is focusing on this potentially important observation.

In summary, this is the first report that shows that a set of well-characterized *T. spiralis* antigens (TSL-1 antigens) promotes histamine secretion from unsensitized normal MC. This secretion exhibits both similarities and some differences from that induced by other secretagogues (eg., Ca^{2+} mobilization). We are currently investigating other signaling components that may be involved in MC activation by TSL-1 antigens. Furthermore, the identification and characterization of the receptor on MC surface that recognizes TSL-1 antigens is under investigation, as it is possible that Toll-like receptors or other pattern recognition receptors associated with innate immune responses are involved, as it has been shown in MC activation (Marshall, 2004). Alternately, it is possible that the antigens bind non-specific IgE or IgG through some unknown mechanism. In this regard, it is interesting that extracts of *Echinococcus multilocularis* and *Schistosoma mansoni* eggs trigger IL-4 release from basophils of apparently non-sensitized donors, albeit in an IgE-dependent manner (Aumuller et al., 2004).

The significance of our observations in the *T. spiralis* host–parasite relationship is unknown. However, it is worth mentioning that both TSL-1 antigens and substance P are present in *T. spiralis*-infected animals and, as demonstrated in this study, histamine secretion induced by them shares some features. Therefore, it may be possible that both TSL-1 antigens and substance P through the activation of MC in the intestine or other tissues release pro-inflammatory molecules that contribute to the inflammatory process and influence survival of adult worms or ML. In addition, given that the infective larvae produce TSL-1 antigens upon infection in an unsensitized host, Ig-independent MC activation that selectively releases certain mediators may play an important role in the initial responses to the parasite, including fostering the development of T helper 2 pathways (Niborski et al., 2004). Subsequently, as IgE and other responses are generated and other parasite antigens are produced, MC activation likely involves other mechanisms,

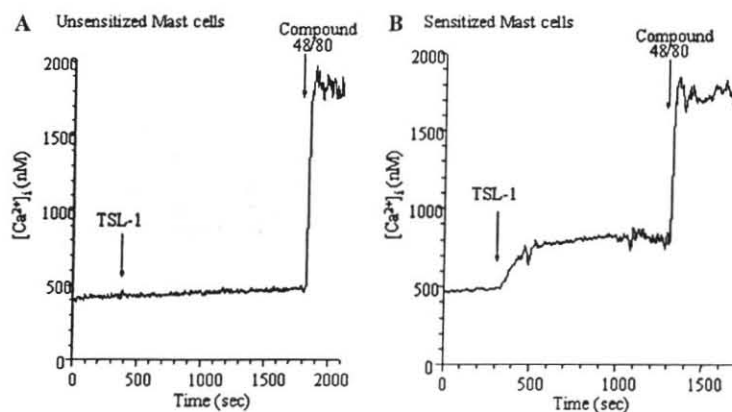


Fig. 8. Intracellular Ca^{2+} mobilization induced by TSL-1 antigens. (A) Unsensitized and (B) *T. spiralis* sensitized peritoneal MC were loaded with the ratiometric Ca^{2+} dye FURA-2AM (4×10^{-6} M) exposed to TSL-1 antigens (30 ng/mL), and changes in calcium levels were evaluated. Peritoneal MC were also stimulated with compound 48/80 (1 μ g/mL) as a positive control. Data are representative of 11 separate experiments. TSL-1 antigens induced Ca^{2+} mobilization in sensitized, but not in unsensitized, peritoneal MC. Arrows indicate the addition of agonists.

perhaps inducing secretion of a different array of MC-derived mediators that function in distinct ways in the host–parasite relationship. Given that host protection can occur in an Fc receptor-independent manner (Grencis, 1997; Onah et al., 2000), the mechanisms involved in TSL-1 activation of unsensitized MC may function together with other mechanisms of MC activation in host protection against *T. spiralis*. This aspect is also of major interest and will help us to understand the role of MC in the innate response against *T. spiralis*.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Andrew Stadnyk, Dalhousie University, for providing *T. spiralis*-infected rats for initial experiments. We are grateful to Rocio Fonseca and Ramses Ilarraza for their help and excellent technical assistance. We also thank to the PDCB UNAM, Mexico. This work was supported, in part, by CONACYT (Grants 32677 and G38523), IMSS, and from the Canadian Institutes for Health Research, Canada. N.G. Arizmendi-Puga was a recipient of a scholarship from IMSS, CONACYT, and DGEP-UNAM (Mexico).

References

- Alizadeh, H., Wakelin, D., 1982. Comparison of rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in mice and rats. *International Journal of Parasitology* 12, 65–73.
- Arizmendi-Puga, N., Casas, O., Yépez-Mulia, L., Cedillo, R., Ortega-Pierres, G., Muñoz, O., Befus, D., Enciso-Moreno, J.A., 1997. Activation of mast cells by surface antigens of *Trichinella spiralis* through an IgE independent mechanism. In: Ortega-Pierres, M.G., Gamble, R., van Knapen, F., Wakelin, D. (Eds.), *Proceedings of the Ninth International Conference on Trichinellosis*. CINVESTAV, Mexico City, pp. 397–441.
- Arizmendi, N., Yépez-Mulia, L., Cedillo-Rivera, R., Ortega-Pierres, M.G., Muñoz, O., Befus, D., Enciso-Moreno, J.A., 2001. Interleukin mRNA changes in mast cells stimulated by TSL-1 antigens. *Parasite* 8, S114–S116.
- Aumuller, E., Schramm, G., Gronow, A., Brehm, K., Gibbs, B.F., Doenhoff, M.J., Haas, H., 2004. *Echinococcus multilocularis* metacystode extract triggers human basophils to release interleukin-4. *Parasite Immunology* 26, 387–395.
- Befus, A.D., Mowat, C., Gilchrist, M., Hu, J., Solomon, S., Bateman, A., 1999. Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action. *Journal of Immunology* 163, 947–953.
- Bowden, J.J., Garland, A.M., Baluk, P., Lefevre, P., Grady, E.F., Vigna, S.R., Bunnet, N.W., McDonald, D.M., 1994. Direct observation of substance P-induced internalization of neurokinin 1 (NK1) receptors at sites of inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 8964–8968.
- Brooks, A.C., Whelan, C.J., Purcell, W.M., 1999. Reactive oxygen species generation and histamine release by activated mast cells: modulation by nitric oxide synthase inhibition. *British Journal of Pharmacology* 128, 585–590.
- Bueb, J.L., Mousli, M., Landry, Y., Bronner, C., 1990. A pertussis toxin sensitive G protein is required to induce histamine release from rat peritoneal mast cells by bradykinin. *Ingesta and Actions* 30, 98–101.
- Calderón, G.M., Torres-López, J., Lin, T.-J., Chávez, B., Hernández, M., Muñoz, O., Befus, A.D., Enciso, J.A., 1998. Effects of toxin A from *Clostridium difficile* on mast cell activation and survival. *Infection and Immunity* 66, 2755–2761.
- Castagliuolo, I., Keates, A.C., Qiu, B., Kelly, C.P., Nikulasson, S., Leeman, S.E., Pothoulakis, C., 1997. Increased substance P responses in dorsal root ganglia and intestinal macrophages *Clostridium difficile* toxin enteritis in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 4788–4793.
- Coleman, J.W., Huang, Q., Stanworth, R., 1986. The mast cell response to substance P: effects of neuraminidase, limulin and some novel synthetic peptide antagonists. *Peptides* 7, 171–175.
- Cromwell, O., Bennett, J.P., Hide, I., Kay, A.B., Gomperts, B.D., 1991. Mechanisms of granule enzyme secretion from permeabilized guinea pig eosinophils. Dependence on Ca^{2+} and guanine nucleotides. *Journal of Immunology* 147, 1905–1911.
- Denkers, E.Y., Wassom, D.L., Krco, C.J., Hayes, C.E., 1990. The mouse antibody response to *Trichinella spiralis* defines a single, immunodominant epitope shared by multiple antigens. *Journal of Immunology* 144, 3152–3159.
- Dennis, D.T., Despommier, D.D., Davis, N., 1970. Infectivity of the newborn larvae of *Trichinella spiralis* in the rat. *Journal of Parasitology* 56, 974–977.
- Dvorak, A.M., 2000. Ultrastructural features of human basophil and mast cell secretory function. In: Marone, G., Lichtenstein, L.M., Galli, S.J. (Eds.), *Mast Cells and Basophils*. Academic Press, San Diego, pp. 63–88.
- Erjefalt, J.S., Greiff, L., Andersson, M., Adelroth, E., Jeffery, P.K., Persson, C.G., 2001. Degranulation patterns of eosinophil granulocytes as determinants of eosinophil driven disease. *Thorax* 56, 341–344.
- Feger, F., Varadaradjalou, S., Gao, Z., Abraham, S.N., Arock, M., 2002. The role of mast cells in host defense and their subversion by bacterial pathogens. *Trends in Immunology* 3, 151–158.
- Foreman, J.C., 1993. Non-immunological stimuli of mast cells and basophil leukocytes. In: Foreman, J.C. (Ed.), *Immunopharmacology of Mast Cells and Basophils*. Academic Press, London, pp. 57–70.
- Fukuoka, Y., Hugli, T.E., 1990. Anaphylatoxin binding and degradation by rat peritoneal mast cells: mechanisms of degranulation and control. *Journal of Immunology* 145, 1851–1858.
- Gamble, H.R., Murrell, K.D., Marti, H.P., 1986. Inoculation of pigs against *Trichinella spiralis* using larval excretory–secretory antigens. *American Journal of Veterinary Research* 47, 2396–2399.
- Gilchrist, M., Hesslinger, C., Befus, A.D., 2003. Tetrahydrobiopterin, a critical factor in the production and role of nitric oxide in mast cells. *Journal of Biological Chemistry* 278, 50607–50614.
- Grencis, R.K., 1997. Th_2 -mediated host protective immunity to intestinal nematode infections. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London: Biological Science* 352, 1377–1384.
- Gryniewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y., 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* 260, 3440–3450.
- Harari, Y., Russell, D.A., Castro, G.A., 1987. Anaphylaxis-mediated epithelial Cl^- secretion and parasite rejection in rat intestine. *Journal of Immunology* 138, 1250–1255.
- Janiszewski, J., Bienenstock, J., Blennerhassett, M.G., 1994. Picomolar doses of substance P trigger electrical responses in mast cells without degranulation. *American Journal of Physiology* 267, C138–C145.
- Kim, T.D., Eddlestone, G.T., Mahmoud, S.F., Kuchty, J., Fewtrell, C., 1997. Correlating Ca^{2+} responses and secretion in individual RBL-2H3 mucosal mast cells. *Journal of Biological Chemistry* 272, 31225–31229.
- Knight, P.A., Wright, S.H., Lawrence, C.E., Paterson, Y.Y.W., Miller, H.R.P., 2000. Delayed expulsion of the nematode *Trichinella spiralis* in mice lacking the mucosal mast cell-specific granule chymase, mouse mast cell protease-1. *Journal of Experimental Medicine* 192, 1849–1856.
- Lacy, P., Logan, M.R., Bablitz, B., Moqbel, R., 2001. Fusion protein vesicle-associated membrane protein 2 is implicated in IFN-gamma-induced piecemeal degranulation in human eosinophils from atopic individuals. *Journal of Allergy Clinical Immunology* 107, 671–678.
- Lawrence, C.E., Paterson, J.C., Higgins, L.M., MacDonald, T.T., Kennedy, M.W., Garside, P., 1998. IL-4-regulated enteropathy in an intestinal nematode infection. *European Journal of Immunology* 28, 2672–2684.

- Lawrence, C.E., 2003. Is there a common mechanism of gastrointestinal nematode expulsion? *Parasite Immunology* 25, 271–281.
- Lee, T.D.G., Shanahan, F., Miller, H.R.P., Bienenstock, J., Befus, A.D., 1985. Intestinal mucosal mast cells: isolation from rat lamina propria and purification using unit gravity velocity sedimentation. *Immunology* 55, 721–728.
- Marshall, J.S., 2004. Mast-cell responses to pathogens. *Nature Reviews. Immunology* 4, 787–799.
- McCurdy, J.D., Olynych, T.J., Maher, L.H., Marshall, J.S., 2003. Cutting edge: distinct Toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells. *Journal of Immunology* 170, 1625–1629.
- McDonald, D.M., Bowden, J.J., Baluk, P., Bunnet, N.W., 1996. Neurogenic inflammation. A model for studying efferent actions of sensory nerves. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 410, 453–462.
- Moqbel, R., Wakelin, D., MacDonald, A.J., King, S.J., Grecis, R.K., Kay, A.B., 1987. Release of leukotrienes during rapid expulsion of *Trichinella spiralis* from immune rats. *Immunology* 60, 425–430.
- Morelle, W., Haslam, S.M., Morris, H.R., Dell, A., 2000. Characterization of the N-linked glycans of adult *Trichinella spiralis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 109, 171–177.
- Mousli, M., Hugli, T.E., Landry, Y., Bronner, C., 1992. A mechanism of action for anaphylatoxin C3a stimulation of mast cells. *Journal of Immunology* 148, 2456–2461.
- Niborski, V., Vallé, I., Fonseca-Liñan, R., Boireau, P., Enciso, A., Ortega-Pierres, G., Yépez-Mulia, L., 2004. *Trichinella spiralis*: stimulation of mast cells by TSL-1 antigens trigger cytokine mRNA expression and release of IL-1 and TNF through an Ig-independent pathway. *Experimental Parasitology* 108, 101–108.
- Niu, X.F., Ibbotson, G., Kubes, P., 1996. A balance between nitric oxide and oxidants regulates mast cell-dependent neutrophil-endothelial cell interactions. *Circulatory Research* 79, 992–999.
- Niyonsaba, F., Someya, A., Hirata, M., Ogawa, H., Nagaoka, I., 2001. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human β -defensins-1/2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D₂ production from mast cells. *European Journal of Immunology* 31, 1066–1075.
- Onah, D.N., Uchiyama, F., Nagakui, Y., Ono, M., Takai, T., Nawa, Y., 2000. Mucosal defense against gastrointestinal nematodes: responses of mucosal mast cells and mouse mast cell protease 1 during primary *Strongyloides venezuelensis* infection in FcRgamma-knockout mice. *Infection and Immunity* 68, 4968–4971.
- Otsuka, M., Yoshioka, K., 1993. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiological Review* 73, 229–308.
- Ortega-Pierres, M.G., Muñoz, E., Coral-Vázquez, R., Parkhouse, R.M.E., 1989. Protection against *Trichinella spiralis* induced by purified stage-specific surface antigens of infective larvae. *Parasitology Research* 75, 563–567.
- Pearce, F.L., Befus, A.D., Gaudie, J., Bienenstock, J., 1982. Mucosal mast cells. II. Effects of anti-allergic compounds on histamine secretion by isolated intestinal mast cells. *Journal of Immunology* 128, 2481–2486.
- Quinlan, K.L., Song, I.S., Bunnet, N.W., Letran, E., Steinhoff, M., Harten, B., Olerud, J.E., Armstrong, C.A., Wright Caughman, S., Ansel, J.C., 1998. Neuropeptide regulation of human dermal microvascular endothelial cell ICAM-1 expression and function. *American Journal of Physiology* 275, C1580–C1590.
- Reason, A.J., Ellis, L.A., Appleton, J.A., Wisniewski, N., Grieve, R.B., McNeil, M., Wassom, D.L., Morris, H.R., Dell, A., 1994. Novel tyvelose-containing tri- and tetra-antennary N-glycans in the immunodominant antigens of the intracellular parasite *Trichinella spiralis*. *Glycobiology* 4, 593–603.
- Robinson, M., Krco, C.J., Beito, T.G., David, C.S., 1991. Genetic control of the immune response to *Trichinella spiralis*: recognition of muscle larval antigens. *Parasite Immunology* 13, 391–404.
- Shanahan, F., Denburg, J.A., Fox, J.E.T., Bienenstock, J., Befus, A.D., 1985. Mast cell heterogeneity: effects of neuroenteric peptides on histamine release. *Journal of Immunology* 135, 1331–1337.
- Shore, P.A., Burkhalter, A., Cohn, V.H., 1959. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 127, 182–186.
- Sturiale, S., Barbara, G., Qiu, B., Figini, M., Geppetti, P., Gerard, N., Gerard, C., Grady, E.F., Bunnet, N.W., Collins, S.M., 1999. Neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) terminates colitis by degrading substance P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 11653–11658.
- Supajatura, V., Ushio, H., Nakao, A., Okumura, K., Ra, C., Ogawa, H., 2001. Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *Journal of Immunology* 167, 2250–2256.
- Swain, M.G., Agro, A., Blennerhassett, P., Stanisz, A., Collins, S.M., 1992. Increased levels of substance P in the myenteric plexus of *Trichinella*-infected rats. *Gastroenterology* 102, 1913–1919.
- Theoharides, T.C., Bondy, P.K., Tsakalos, N.D., Askenase, P.W., 1982. Differential release of serotonin and histamine from mast cells. *Nature* 297, 229–231.
- Tuohy, M., Lammas, D.A., Wakelin, D., Huntley, J.F., Newlands, G.F.J., Miller, H.R.P., 1990. Functional correlations between mucosal mast cell activity and immunity to *Trichinella spiralis* in high and low responder mice. *Parasite Immunology* 12, 675–685.
- Urban Jr., J.F., Schopf, L., Morris, S.C., Orekhova, T., Madden, K.B., Betts, C.J., Gamble, H.R., Byrd, C., Donaldson, D., Else, K., Finkelman, F.D., 2000. Stat6 signaling promotes protective immunity against *Trichinella spiralis* through a mast cell- and T cell-dependent mechanism. *Journal of Immunology* 164, 2046–2052.
- Vliagoftis, H., Befus, A.D., 2005. Rapidly changing perspectives about mast cells at mucosal surfaces. *Immunological Review* 206, 190–203.
- Vowells, S.J., Sekhsaria, S., Malech, H.L., Shalit, M., Fleisher, T.A., 1995. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *Journal of Immunological Methods* 178, 89–97.
- Wang, C.H., Korenaga, M., Greenwood, A., 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 OX8⁺ OX22⁺ and OX8⁺ OX22⁻ cells. *Immunology* 71, 166–175.
- Wang, L., Stanisz, A.M., Wershil, B.K., Galli, S.J., Perdue, M.H., 1995. Substance P induces ion secretion in mouse small intestine through effects on enteric nerves and mast cells. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 269, G85–G92.
- Windmiller, D.A., Backer, J.M., 2003. Distinct phosphoinositide 3-kinases mediate mast cell degranulation in response to G-protein-coupled versus FcepsilonRI receptors. *Journal of Biological Chemistry* 278, 11874–11878.
- Wisniewski, N., McNeil, M., Grieve, R.B., Wassom, D.L., 1993. Characterization of novel fucosyl containing glycoconjugates from *Trichinella spiralis* muscle stage larvae. *Molecular and Biochemical Parasitology* 61, 25–35.
- Wolfreys, K.D., Oliveira, B.G., 1997. Alterations in intracellular reactive oxygen species generation and redox potential modulate mast cell function. *European Journal of Immunology* 27, 297–306.
- Yépez-Mulia, L., Arriaga, C., Peña, M.A., Gual, F., Ortega-Pierres, M.G., 1996. Serologic survey of trichinellosis in wild mammals kept in a Mexico City Zoo. *Veterinary Parasitology* 67, 237–246.