



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**“ ANÁLISIS DE LA POSIBLE ACTIVACIÓN DE CÉLULAS
CEBADAS POR ANTÍGENOS DEL ADULTO Y DE LA LARVA
RECIÉN NACIDA DEL PARÁSITO *Trichinella spiralis* ”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A:
CLAUDIA MONTAÑO ESCALONA**

**ASESORES: DRA. MA. GUADALUPE ORTEGA PIERRES
DRA. LILÍAN YÉPEZ MULIA
DR. ANDRÉS ROMERO ROJAS**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO.

2005



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Claudia Montaña

Escalona

FECHA: 20-Mayo-05

FIRMA: [Signature]



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Análisis de la posible activación de células cebadas por antígenos del adulto y de la larva recién nacida del parásito Trichinella spiralis.

que presenta la pasante: Claudia Montaño Escalona
con número de cuenta: 09951340-1 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Abril de 2005

PRESIDENTE	<u>MVZ. J. Pablo Martínez Labat</u>	
VOCAL	<u>QFB. René Damián Santos</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. Andrés Romero Rojas</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MVZ. Angel G. Martínez Sosa</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MFC. Beatriz de Jesús Maya Monroy</u>	



El presente trabajo de tesis fue realizado en Laboratorio 2 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I. P. N. bajo la dirección de la Dra. Ma. Guadalupe Ortega Pierres y en el laboratorio de parasitología de la UIMEIP del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional siglo XXI a cargo de la Dra. Lilián Yépez Mulia. Para el desarrollo de este trabajo el CONACYT otorgó la beca 6455 del proyecto G 38523 M.

AGRADECIMIENTOS

A mi **Mamá**, por sus sacrificios, esfuerzos y por que sin ella hubiera sido más difícil lograr esta meta. Gracias.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y en especial a la **FES-Cuautitlán**, por haberme permitido cumplir el sueño de ser universitaria.

A todos mis **profesores** que a lo largo de mi educación escolar me formaron como persona y profesionista. Quisiera poder nombrar a todos, pero han sido muchos los que aparte de transmitirme sus conocimientos, me han ofrecido su afecto. Gracias.

A la **Dra. Guadalupe Ortega Pierres** por haber permitido que realizará mi tesis en su laboratorio, y por el tiempo que me brindo.

A la **Dra. Lilián Yépez Mullá** por la atención y el tiempo dedicado para la elaboración de esta tesis.

A la **Biol. Roció Fonseca Liñán** por la ayuda técnica brindada durante mis ensayos experimentales en el CINVESTAV.

A la **Dra. Samira Muñoz Cruz**, por su ayuda incondicional en los ensayos de células cebadas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
por el apoyo económico proporcionado durante
la realización de esta tesis.

A **mis sinodales** por la revisión y sugerencias para mejorar el presente trabajo.

A los que integran el laboratorio 2 del departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV:
Roció, Rómel, Sara, Dulce, Luisa, Mari y Raúl
por su amistad y por los momentos que pasamos juntos.
A Blanca Herrera, Arturo Pérez T., Sr. René Bolaños
y **Leticia Juárez**, por la asistencia técnica recibida y por el afecto que me brindaron.

Al personal y estudiantes del laboratorio de parasitología y demás laboratorios de la UIMEIP-Pediatría CMN SXXI que me brindaron ayuda e hicieron que mi estancia ahí fuera más fácil; especialmente a **Samira, Norma, Hilda y Lety**.

DEDICATORIAS

A mi Mamá, la señora **Agustina Escalona Vera**, la persona mas importante de mi vida, con amor y cariño.

A mis hermanas **Paola, Lucia, Elizabeth, Guadalupe y Areli**, por las lecciones de vida que hemos aprendido.

A mis pequeños sobrinos **Allan U., Axel Y., Alison C., Fernando y Daniela Y.**, por su inocencia, sus risas, y sus travesuras. Los quiero mucho.

A mis amigas del bachillerato **Esther, Lupe, Ma. Félix, Isabel y Nelly**, por la amistad que hemos mantenido a lo largo de estos años.

Al QFB. **Sergio Baca González** por sus sabios consejos y enseñanzas. Con admiración y respeto.

A mis amigos y compañeros de la **Generación 26**,
por haber compartido esta etapa de nuestras vidas
y porque eran como mi segunda familia.

A **Conchita X, Bety y Yanalthé** por su valiosa
amistad y por aguantarme aunque fuera proteína.
Por que me motivaban a seguir siempre adelante,
y por las vivencias que tuvimos juntas.

A **Liliana C., Yesenia, Adriana, Normiga, Laurita,**
Cesáreo V., Olga L., Carmen M., Lalo O., Lisina, Rafa,
Aarón (Sangroncito), Abraham, Chucho, Tuti, Vladimir,
Maribel, Jenny A. y Ale C., por los instantes de alegría,
tristezas, triunfos y fracasos que compartimos durante
nuestra estancia en la universidad.

Para **Alma** por su amistad y palabras de aliento.

A todas aquellas personas que no nombre, pero las cuales
me permitieron conocer su mundo y aprender algo de ellas.

INDICE

	Página
INDICE	I
Lista de figuras	VI
Lista de tablas	V
Abreviaturas usadas	VI
Resumen	VII
1. INTRODUCCION	
1.1 Triquinelosis	1
1.1.1 Taxonomía	2
1.1.2 Morfología	3
1.1.3 Ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i>	5
1.1.4 Sintomatología	7
1.1.5 Patogénesis	8
1.1.6 Tratamiento	9
1.1.7 Métodos de diagnóstico	9
1.1.8 Prevención	10
1.2 Células cebadas	11
1.2.1 Histamina y β -hexosaminidasa	13
1.2.2 Activación de células cebadas	14
1.2.3 Células cebadas y respuesta inmune innata	16
2. ANTECEDENTES	
2.1 Respuesta inmune en contra de <i>Trichinella spiralis</i>	18

3. JUSTIFICACION	36
4. HIPOTESIS	38
5. OBJETIVOS	
5.1 Objetivo general	39
5.2 Objetivos particulares	39
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	40
7. MATERIALES Y MÉTODOS	
7.1 Mantenimiento de ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i>	41
7.2 Obtención de adultos de <i>Trichinella spiralis</i>	41
7.2.1 Obtención del extracto total soluble del adulto de <i>Trichinella spiralis</i>	42
7.3 Obtención de las larvas recién nacidas de <i>Trichinella spiralis</i>	43
7.3.1 Obtención del extracto total soluble de las larvas recién nacidas de <i>Trichinella spiralis</i>	43
7.4 Purificación de antígenos de la larva recién nacida de <i>Trichinella spiralis</i>	44
7.5 Cuantificación de proteínas	45
7.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida	47
7.7 Determinación de presencia de endotoxina	48
7.8 Obtención y purificación de células cebadas de peritoneo de rata	48
7.9 Ensayos de activación de células cebadas de peritoneo de rata con antígenos del adulto y de la larva recién nacida de <i>Trichinella spiralis</i>	49

7.10	Cuantificación de histamina	50
7.11	Cuantificación de β -hexosaminidasa	51

8. RESULTADOS

8.1	Análisis electroforético del extracto total soluble del adulto de <i>Trichinella spiralis</i>	52
8.2	Análisis electroforético del extracto total soluble y de los antígenos purificados de la larva recién nacida de <i>Trichinella spiralis</i>	53
8.3	Determinación de presencia de endotoxina	54
8.4	Obtención y purificación de células cebadas de peritoneo de rata	54
8.5	Cuantificación de histamina	54
8.6	Cuantificación de β -hexosaminidasa	58

9. DISCUSION	61
--------------------	----

10. CONCLUSIONES	66
------------------------	----

11. BIBLIOGRAFIA	67
------------------------	----

12. ANEXOS

12.1 Preparación de soluciones	76
--------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Complejo célula nodriza-larva muscular	3
Figura 2	Morfología del organismo adulto y de la larva recién nacida de <i>Trichinella spiralis</i>	4
Figura 3	Ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i>	6
Figura 4	Síntesis de histamina en la célula cebada	13
Figura 5	Activación de la célula cebada por un mecanismo dependiente de IgE	15
Figura 6	Mecanismo de expulsión de parásitos nematodos de forma independiente y dependiente de células cebadas	23
Figura 7	Correlación de células cebadas y expulsión de <i>Trichinella spiralis</i>	24
Figura 8	Representación esquemática de las citocinas secretadas en la linfa intestinal de ratas infectadas con <i>Trichinella spiralis</i>	26
Figura 9	Participación de las células cebadas en una respuesta inmune tipo Th2 dirigida contra parásitos helmintos	29
Figura 10	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por eosinófilos desarrollada contra parásitos helmintos	33
Figura 11	Comparación de la mortalidad de larvas recién nacidas producida por eosinófilos normales y activados	35
Figura 12	Curva estándar de albúmina sérica bovina de acuerdo al método de Lowry	46
Figura 13	Análisis electroforético del extracto total soluble de adulto de <i>Trichinella spiralis</i>	52
Figura 14	Análisis electroforético del extracto total soluble y de los antígenos purificados de la LRN de <i>Trichinella spiralis</i>	53
Figura 15	Determinación de los porcentajes de histamina liberada por CCPR activadas con extracto total soluble de adulto de <i>Trichinella spiralis</i>	55

Figura 16	Determinación de los porcentajes de histamina liberada por CCPR activadas con extracto total soluble de LRN de <i>Trichinella spiralis</i>	56
Figura 17	Determinación de los porcentajes de histamina liberada por CCPR activadas con antígenos purificados de LRN de <i>Trichinella spiralis</i>	57
Figura 18	Determinación de los porcentajes de β -hexosaminidasa liberada por CCPR activadas con extracto total soluble de adulto de <i>Trichinella spiralis</i>	58
Figura 19	Determinación de los porcentajes de β -hexosaminidasa liberada por CCPR activadas con extracto total soluble de LRN de <i>Trichinella spiralis</i>	59
Figura 20	Determinación de los porcentajes de β -hexosaminidasa liberada por CCPR activadas con antígenos purificados de LRN de <i>Trichinella spiralis</i>	60

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Principales características de los dos fenotipos de células cebadas de ratón	12
Tabla 2	Factores que activan, estimulan o inhiben las funciones de las células cebadas	14

ABREVIATURAS USADAS

PBS	Amortiguador de fosfatos
HTB	Amortiguador hepes-tyrode
CC	Célula cebada
CCM	Célula cebada de mucosa
CCPR	Célula cebada de peritoneo de rata
CCTC	Célula cebada de tejido conectivo
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
DO	Densidad óptica
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
E/S	Excreción/secreción
SCF	Factor de células tronco
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
PMSF	Fluoruro de fenil metil sulfonilo
ELISA	Inmunoabsorción enzimática
IFN- γ	Interferón gama
kDa	Kilodaltones
LRN	Larva recién nacida
LM	Larva muscular
TLCK	N- α -p-tosil-L-lisina cloro-metil cetona
TPCK	N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona
mMCP	Proteasa de célula cebada de ratón
RMCP	Proteasa de célula cebada de rata
Fc ϵ RI	Receptor de alta afinidad para IgE

RESUMEN

El parásito nematodo *Trichinella spiralis* causa la infección conocida como triquinelosis, sus principales síntomas son diarrea, dolor abdominal, vómito, fiebre, miositis, dolor muscular y edema periocular, entre otros. El parásito presenta tres estadios: la larva muscular, el adulto y la larva recién nacida, el primer estadio se hospeda en el músculo esquelético y el adulto se aloja en el intestino delgado. En este tipo de parasitosis se produce una mastocitosis, eosinofilia y altos niveles de IgE. La respuesta inmune intestinal dirigida contra este parásito se puede manifestar mediante la expulsión del adulto, reducción de su tamaño, disminución de la fecundidad de las hembras, así como también por prevención del establecimiento de la larva muscular en el hospedero.

Además, en infecciones con *T. spiralis* existe una relación entre la mastocitosis producida y la expulsión del adulto. Así mismo, se ha reportado y sugerido que las CC son activadas por antígenos del parásito durante este proceso y que las moléculas liberadas como interleucinas, prostanoïdes y proteasas contribuyen a la expulsión del organismo adulto de *T. spiralis*.

El presente trabajo se enfocó hacia el estudio de la participación de las células cebadas de peritoneo de rata en la respuesta inmune innata contra *T. spiralis* analizando su activación por antígenos del organismo adulto y de la larva recién nacida del parásito por un mecanismo independiente de IgE.

Se obtuvieron tres preparaciones antigénicas: extracto total soluble del organismo adulto, extracto total soluble de larva recién nacida y antígenos purificados de larva recién nacida con pesos moleculares de 104, 99, 95, 91, 80, 76, 74, 65, 39 y 36 kDa, se purificaron por cromatografía de afinidad mediante el uso del anticuerpo monoclonal

CE-4. Por otra parte se aislaron y purificaron células cebadas de peritoneo de ratas no infectadas con *T. spiralis*. Estas células se estimularon con diferentes concentraciones de las diferentes preparaciones antigénicas y se cuantificó la histamina y β -hexosaminidasa liberadas por las células.

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que las células cebadas de peritoneo de rata no sensibilizadas son activadas por extracto total soluble de adulto de *T. spiralis* de forma directa, liberándose histamina pero no β -hexosaminidasa. La máxima liberación de histamina fue de 39% a la concentración de 10 ng/mL de extracto total soluble de adulto. Sin embargo, el extracto total soluble de larvas recién nacidas así como los antígenos purificados de estas no activaron a células cebadas de peritoneo de rata a las concentraciones evaluadas.

Los datos obtenidos sugieren que los antígenos del adulto de *T. spiralis* pueden participar en la activación de respuestas inmunes innatas en el hospedero infectado con este parásito.

1. INTRODUCCION

1.1 Triquinelosis

La triquinelosis es la parasitosis causada por el nematodo *Trichinella*. Este es un parásito intracelular que en una fase de su ciclo de vida se aloja en células del músculo estriado. La infección se desarrolla en humanos y en animales, por lo que constituye un problema de salud pública tanto médico como veterinario. La triquinelosis se caracteriza por desórdenes gastrointestinales, fiebre, miositis, mialgia, edema periocular, entre otros síntomas. La fuente principal de transmisión es la carne de cerdo infectada con la larva muscular (LM) del parásito, sin embargo existen casos de triquinelosis relacionados con el consumo de carne de otros animales como oso, caballo, jabalí, etc. (Despommier, 1983; Pawloski, 1983).

T. spiralis presenta tres diferentes estadios de su ciclo biológico en un solo hospedero. En la naturaleza, este último es sucesivamente, hospedero definitivo e intermediario del parásito; es definitivo y a que en este se lleva a cabo todo su ciclo y es intermediario debido a que puede transmitir la infección a otros hospederos (Stewart y Giannini, 1982).

La triquinelosis es una parasitosis zoonótica de distribución cosmopolita. Durante el periodo de 1995 a 1997 en países como: Alemania, Argentina, Canadá, Chile, China, Francia, Italia, Latvia, Lituania, México, Polonia, Rumania, Rusia, Tailandia, República Eslovaca, España, Yugoslavia y Estados Unidos de América, se han reportado en total 10, 030 casos de triquinelosis en humanos (Dupouy-Camet, 2000).

En nuestro país no se tienen datos exactos y actuales sobre la prevalencia y distribución de la triquinelosis, pero se han reportado brotes causados por *Trichinella spiralis* en varios estados, siendo Durango, Zacatecas, Estado de México y el D. F., las entidades de

mayor incidencia en casos de esta parasitosis. Se han reportado aproximadamente 758 casos de triquinosis en humanos del periodo de 1952 a 1997 (Ortega-Pierres y cols., 2000). Así mismo, en estudios serológicos realizados en México en los últimos años se detectaron anticuerpos específicos contra antígenos de *T. spiralis* mediante la prueba de hemaglutinación indirecta, en los cuales se obtuvieron prevalencias de 3.65% en adolescentes y de 3.3% en niños (Gutiérrez y cols., 2000; Martínez-Barbabosa y cols., 2000).

La amplia distribución de *Trichinella* a nivel mundial, el extenso rango de hospederos susceptibles a este parásito y el impacto de la infección que tiene en la economía de varios países requiere del diseño de estrategias efectivas para su control y prevención. Es por esto que es necesario realizar el diagnóstico oportuno de la infección, así como producir vacunas que prevengan la infección por este parásito.

1.1.1 Taxonomía

La clasificación taxonómica del parásito fue hecha por Owen en 1935, quien describió a *Trichinella*. Este parásito tiene la siguiente clasificación taxonómica:

Reino	Animalia
Phylum	Nematoda
Clase	Adenoforea
Orden	Enoplida
Familia	Trichinellidae
Género	<i>Trichinella</i>
Especie	<i>spiralis</i>

1.1.2 Morfología

En su ciclo de vida el parásito presenta tres estadios de desarrollo: la LM (fase infectiva), el adulto y la larva recién nacida (LRN), los cuales son organismos cilíndricos, largos y no presentan segmentación. Estos presentan una cavidad en la que se localizan el aparato digestivo, el aparato reproductor, el sistema nervioso y el sistema muscular; en la LRN estas estructuras están ausentes (Levine, 1980).

La LM se aloja dentro de la célula nodriza (Figura 1), que tiene un aspecto fusiforme o alargado y en su interior contiene 1 o dos larvas enrolladas, mide 1.2 mm x 40 µm de diámetro y está formada por una cápsula de colágena en asociación con la célula muscular. Esta estructura se encuentra rodeada por una red de capilares que se forma por una acción angiogénica inducida por el parásito, las cuales tienen la finalidad de eliminar los desechos metabólicos así como de proveer nutrientes al parásito (Despommier, 1990). El esticosoma es un organelo del aparato digestivo y está formado por 30 a 40 esticocitos (células secretoras) que se acomodan en hilera alrededor del esfago y ocupa las dos terceras partes anteriores del cuerpo de la LM. La superficie exterior de la cutícula de la LM es una estructura trilaminada y sólo presenta estrías transversales (Gonzalez-Robles y cols., 1989).

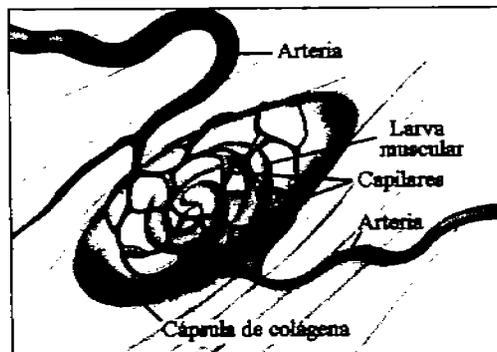


Figura 1. Complejo célula nodriza-larva muscular. Tomado y modificado de Despommier, 1990.

El organismo adulto es cilíndrico de color blanquecino, las hembras miden entre 3.5 a 4 mm de longitud x 36 μ m de diámetro, mientras que los machos no sobrepasan de 1.5 mm x 36 μ m (Figura 2). Ambos presentan el extremo anterior aguzado y el posterior redondeado, poseen un pequeño estilete en la boca y el esófago ocupa un tercio del cuerpo. En la hembra el esticosoma ocupa el tercio corporal anterior, tiene un ovario y el orificio vulvar se abre hacia la mitad de la región esofágica; el útero es simple y en la hembra grávida este órgano está lleno de huevos en la parte posterior y en la parte anterior contiene LRN maduras. En el macho el esticosoma ocupa las dos terceras partes anteriores del cuerpo, el testículo tiene un tramo ascendente y uno descendente y forma el conducto deferente, cuya última porción termina en la cloaca; en el extremo posterior del cuerpo posee un par de pequeños apéndices copuladores cónicos y entre ellas dos pares de papilas (Figura 2).

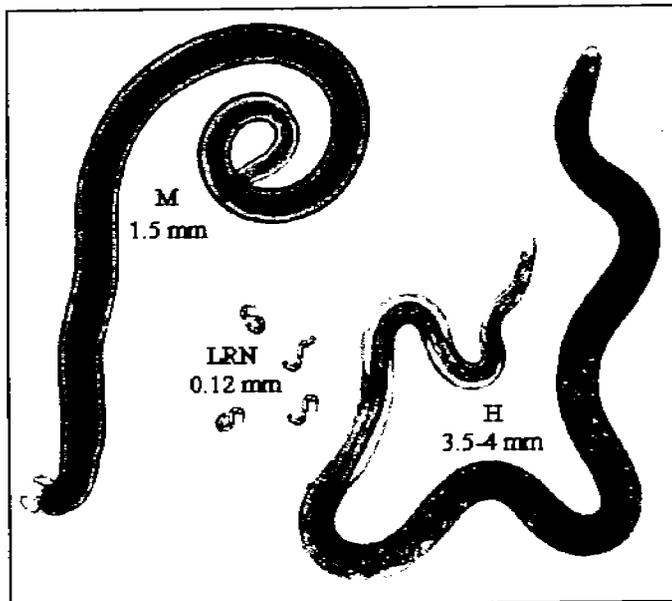


Figura 2. Morfología del organismo adulto y de la larva recién nacida de *Trichinella spiralis*. M= macho, H= hembra y LRN= larva recién nacida. Tomado y modificado de Despommier y cols., 2000.

Las LRN miden entre 0.08 y 0.12 mm de longitud por 7 μ m de diámetro, presentan un color blanquecino y están provistas de un estilete localizado en la boca (Figura 2). La superficie exterior de la cutícula se exhibe como una estructura trilaminada, y presenta estriaciones transversales y longitudinales (Gonzalez-Robles y cols., 1989).

1.1.3 Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*

El ciclo biológico (Figura 3) que presenta *T. spiralis* es autoheterógeno, ya que los diferentes estadios se desarrollan en el mismo hospedero, pero muestran diferente localización anatómica (Despommier, 1983). Dentro del ciclo biológico de este parásito existen dos fases: la enteral y la parenteral.

El ciclo de vida y la fase enteral comienzan cuando un hospedero ingiere carne contaminada con LM de *T. spiralis*. Durante esta fase los jugos digestivos del hospedero digieren el tejido muscular y las larvas quedan en libertad en el intestino delgado, los parásitos penetran el epitelio columnar en la base de las vellosidades del intestino, en donde en un período aproximado de 48 horas (h) se desarrollan rápidamente a través de 4 fases larvarias y finalmente se diferencian en hembras y machos adultos, después estos copulan en el lumen intestinal. Los machos son eliminados del hospedero después de copular, mientras que las hembras grávidas, que son vivíparas, se localizan en el interior de la mucosa del duodeno y del yeyuno, y al día 5 comienza la postura de LRN, cada hembra libera entre 1, 000 y 1, 500 larvas. La hembra produce LRN continuamente hasta que la inmunidad del hospedero lo permite, ya que ésta interfiere con el proceso. Los adultos permanecen en el intestino delgado durante 1 a 3 semanas y finalmente son expulsados, eliminándose de esta manera la fuente productora de LRN (Despommier, 1983; Despommier, 2000).

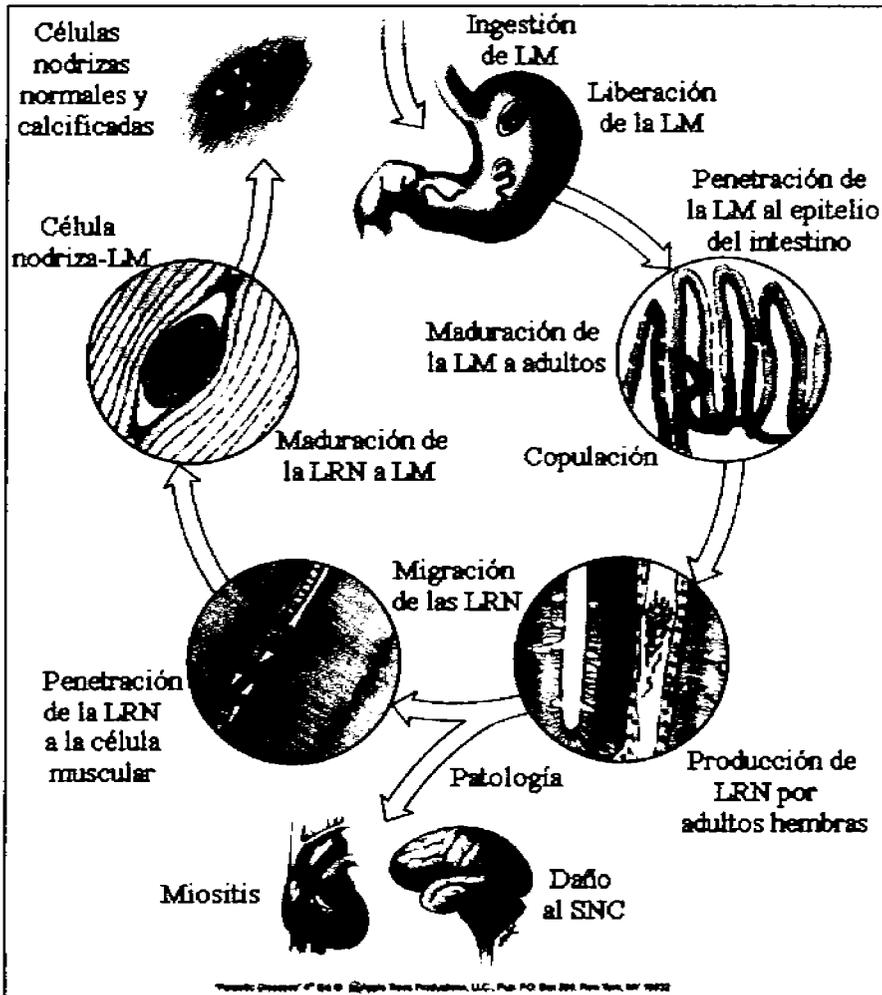


Figura 3. Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*. SNC= Sistema nervioso central. Tomado y modificado de Despommier y cols., 2000.

La fase parenteral da comienzo cuando las LRN penetran a la mucosa intestinal y migran a través de los capilares linfáticos y venosos, llegando a la circulación general y diseminándose por todo el organismo para finalmente establecerse en la musculatura

esquelética. Estas larvas usan un estilete localizado en la cavidad oral para penetrar a la célula muscular e inician un periodo de desarrollo post-embionario creciendo exponencialmente; empiezan a enrollarse y se diferencian sexualmente, su transformación a LM dura aproximadamente 20 días. Una vez en la célula muscular, la LRN induce la formación de una cápsula de colágena que la rodea, esto la protege de la destrucción inmunológica. Para esto, el parásito altera la expresión de genes específicos de la célula muscular para la formación de la célula nodriza, en la cual y de la cual recibe nutrientes (Jasmer, 1990).

Los tejidos diferentes al músculo esquelético en los que penetran las LRN no inducen la formación de células nodrizas, estas larvas entran nuevamente a la circulación sanguínea o son rodeadas por células por lo que se forma un granuloma, y con el paso del tiempo mueren. La célula nodriza mantiene viva a la LM durante toda la vida del hospedero, pero se ha observado que en el ser humano la célula nodriza se calcifica cuando la LM muere (Despommier, 1990).

1.1.4 Sintomatología

La sintomatología se presenta durante la fase intestinal de la infección causada por los adultos o durante la fase parenteral con la migración de la LRN cuando ocurre la penetración de LRN a la célula muscular y su transformación a LM. El periodo de incubación y la sintomatología son variables, ya que dependen de la cantidad de LM ingerida y de la fase del ciclo de vida que se desarrolla en el hospedero. En algunos casos, cuando la dosis de LM es baja la infección es asintomática.

La fase enteral es transitoria y puede durar hasta 10 días después de la ingestión de la LM, esta etapa es caracterizada por gastroenteritis asociada con diarrea, dolor abdominal y vómito (Capo y Despommier, 1996).

La fase parenteral se presenta una semana después de la infección y puede persistir durante varias más. Los pacientes presentan fiebre, mialgia, edema periocular y facial, dolor muscular, hinchazón y debilidad de los músculos afectados. Otros síntomas menos frecuentes son cefalea, conjuntivitis, disnea, prurito y anorexia. Las lesiones provocadas en los músculos en esta fase pueden provocar dificultad para mover los ojos, la respiración, la masticación, la deglución, la emisión de la palabra o el uso de las extremidades (Capo y Despommier, 1996).

Algunas infecciones finalizan con la muerte del hospedero. La letalidad por triquinosis es menor de 1% y es debida a complicaciones secundarias graves ocasionadas por la localización de las LM en el encéfalo, corazón o diafragma (Capo y Despommier, 1996).

1.1.5 Patogénesis

En la patología producida en una infección con *T. spiralis* existen lesiones fisiológicas que incluyen síndrome de mala absorción, trastornos en la motilidad intestinal, inflamación local en el intestino delgado intensificada por la infiltración de eosinófilos, neutrófilos y linfocitos (Ruitenbergh y Buys, 1986); así mismo se producen lesiones morfológicas de la mucosa intestinal como deformación de vellosidades, proliferación de enterocitos e hiperplasia en las criptas de Lieberkühn (Kocięcka y cols., 1985).

Durante la penetración de la LRN a la célula muscular y su transformación a LM, se dan una serie de cambios moleculares y celulares en el hospedero. Estos cambios incluyen incremento del número de ribosomas y mitocondrias disfuncionales, proliferación del retículo endoplásmico liso y rugoso, estimulación del aparato de Golgi y niveles elevados de ácido desoxirribonucleico (DNA) y ácido ribonucleico (RNA), hay lesiones en el núcleo, aumento de tamaño del nucleolo y el sarcoplasma se hace basofílico. Estas alteraciones también incluyen la pérdida de componentes químicos y estructurales

cruciales para que se lleve a cabo la contracción muscular (Jasmer, 1993; Gabryel y cols., 1995).

1.1.6 Tratamiento

Para el tratamiento de esta infección se usan antihelmínticos como: mebendazol, albendazol, tiabendazol y pirantel. La aplicación de estos fármacos durante los primeros 3 días siguientes a una infección con *T. spiralis* es muy importante, ya que tienen el objetivo de evitar que el adulto penetre en el intestino, así como también para impedir que el músculo sea invadido por la LRN, pero es muy raro que el diagnóstico de triquinelosis se realice en la etapa temprana de la infección (Kocięcka, 2000).

Durante el tratamiento de la infección con *T. spiralis* también se administran glucocorticoides e inmunomoduladores. Los primeros se usan para suprimir los signos y síntomas de la hipersensibilidad de tipo inmediata desarrollada en la fase aguda y los inmunomoduladores se administran en pacientes con triquinelosis severa que presentan síntomas de inmunosupresión (Kocięcka, 2000).

1.1.7 Métodos de diagnóstico

La triquinelosis es un padecimiento difícil de diagnosticar debido a lo inespecífico de las manifestaciones clínicas que se producen, por lo que suele confundirse con otras patologías (Álvarez-Chacón y cols., 1992). Los métodos para detectar infecciones por *Trichinella* se pueden dividir en directos por demostración visual del parásito que incluyen triquinoscopia y digestión artificial; e indirectos, los cuales sugieren la presencia de la infección a través de la respuesta inmunológica del hospedero a los antígenos del parásito y que incluyen las técnicas de hemaglutinación indirecta, inmunoabsorción enzimática (ELISA) y Western-Blot (Campbell, 1983).

Actualmente el ensayo de ELISA es el mejor método serológico en el diagnóstico de triquinosis disponible en el comercio, comparado con la biopsia tiene una sensibilidad de 100% para detectar la IgG específica contra antígenos de *T. spiralis* y una especificidad del 97% (Morakote y cols., 1992; Yépez-Mulia y Ortega-Pierres, 1994; Mahannop y cols., 1995).

Sin embargo el diagnóstico definitivo se realiza por medio de la detección de DNA específico de *Trichinella* mediante el uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, esta prueba es muy sensible y específica para detectar pequeñas cantidades de LM en el tejido, pero su costo es muy elevado y además no está disponible comercialmente (Wu y cols., 1999).

1.1.8 Prevención

Las infecciones provocadas por *T. spiralis* en humanos son fáciles de prevenir mediante: la cocción (71 °C por 10 min) y congelación (-20 °C por 3 semanas) adecuadas de la carne de cerdo, el control apropiado en la producción de los cerdos en las granjas y el exterminio de las ratas en sus proximidades, la inspección de los animales en los rastros para detectar al parásito, además de una educación adecuada acerca del consumo de carne de cerdo bien cocida en los humanos (Despommier., 2000).

1.2 Células cebadas

Las células cebadas (CC) son células residentes de muchos tejidos del organismo, éstas participan en una gran variedad de procesos fisiológicos, inmunológicos y patológicos en el cuerpo, incluyendo curación de heridas y angiogénesis, respuestas inmunes contra parásitos y tumores, inflamación aguda y crónica, así como en reacciones de hipersensibilidad inmediata dependientes de IgE (Galli, 1993).

Estas células poseen las características necesarias para considerarlas como células efectoras de la respuesta inmune innata dirigida en contra de agentes infecciosos. Dentro de estas características se encuentran las siguientes: a) están localizadas estratégicamente en la interfase hospedero-medio ambiente, por lo que son una de las primeras células inflamatorias que se enfrentan a los patógenos, b) son una fuente de citocinas de respuesta rápida, tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 4 (IL-4), que son esenciales para el inicio de una respuesta inflamatoria e inmune del hospedero hacia patógenos, y c) tienen la capacidad para modular las células del tejido conectivo al sanar una herida (Abraham y Malaviya, 1997).

Las CC son más abundantes en las superficies epiteliales de la piel y de las mucosas de los aparatos genitourinario, gastrointestinal y respiratorio, así mismo se encuentran adyacentes a los vasos sanguíneos o linfáticos en gran número (Wasserman, 1989). En el tracto gastrointestinal son más abundantes, hay 20, 000 células por mm³, este sitio entra en contacto con muchos agentes infecciosos entre los cuales se encuentra el parásito *T. spiralis*; por lo que las CC podrían ser una de las primeras células inflamatorias que interactúan con estos organismos patógenos.

La población de CC en los diferentes tejidos es heterogénea, y se ha reportado que existen dos fenotipos de CC (Tabla 1), las cuales son distintas bioquímicamente y

biológicamente. Los aspectos considerados para definir el fenotipo de CC son morfología, contenido de mediadores, sensibilidad a la estimulación por varios secretagogos e interacción con diferentes receptores en las células blanco. El fenotipo de CC de mucosa (CCM) se encuentra en la lámina propia intestinal y en el pulmón; y el otro fenotipo que es el de CC de tejido conectivo (CCTC) se encuentra en la cavidad peritoneal, en el tejido conectivo de la piel, adyacente a vasos sanguíneos y en nervios periféricos (Féger y cols., 2002). Las CC de peritoneo de rata (CCPR) son de tipo CCTC y han sido las más estudiadas debido a la facilidad de su aislamiento y purificación.

Tabla 1. Principales características de los dos fenotipos de células cebadas de ratón.

	CCM	CCTC
Tinción con ABS*	azul	rojo
Características	núcleo multilobulado	núcleo regular
Gránulos	pequeños	grandes
Vida media	< 40 días	> 6 meses
Características bioquímicas		
Proteoglicanos		
Heparina	no	si
Condroitín sulfato A	si	no
Condroitín sulfato E	si	si
Aminas biogénicas	histamina (3-8 pg/cél)	histamina (10-30 pg/cél) y serotonina
Proteasas neutras	mMCP-1 y 2	mMCP-3, -4, -5, -6 y -7 y carboxipeptidasa
Degranulación		
IgE	+++	++
Ionóforo de calcio	+	+
Substancia P, compuesto 48/80	+++	+/-

ABS*= safranina azul de Alciano, mMCP= proteasa de CC de ratón, +++ = máxima liberación, ++ = mediana liberación, + = poca liberación, +/- = muy poca liberación. Tomado y modificado de Féger y cols., 2002.

1.2.1 Histamina y β -hexosaminidasa

La histamina es una amina biogénica, sintetizada en el aparato de Golgi de la CC por descarboxilación del aminoácido histidina, bajo la influencia de la histidina descarboxilasa (Figura 4). Las CCM contienen de 1-2 pg/célula, mientras que las CCTC contienen de 10-30 pg/célula. Esta amina es encontrada en asociación iónica con residuos de glicosaminoglicanos en los gránulos de la CC y es excretada por exocitosis. La acción producida por la histamina dura poco, ya que una vez que es excretada al medio extracelular es metabolizada rápidamente por metilación (70%) u oxidación (30%) (Kapeller-Adler, 1965; Uvnas y cols., 1970).

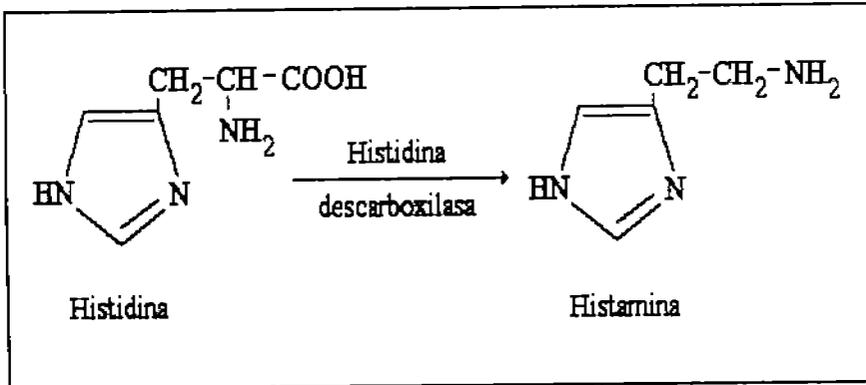


Figura 4. Síntesis de histamina en la célula cebada. Esta amina biogénica se sintetiza mediante la descarboxilación del aminoácido histidina.

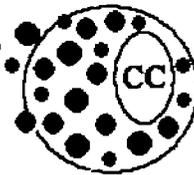
La β -hexosaminidasa es una enzima de tipo hidrolasa ácida, su actividad óptima es a pH ácidos, el cual prevalece en procesos inflamatorios. Esta enzima es encontrada en los gránulos de CC y en lisosomas secundarios, y es liberada en paralelo con histamina. La función extracelular precisa de esta enzima exoglicosidasa aún es desconocida, aunque probablemente actúe en conjunto con otras exoglicosidasas y proteasas neutras para la degradación de glicoproteínas y proteoglicanos (Schwartz y cols., 1979).

1.2.2 Activación de células cebadas

Las CC entran en contacto con una gran variedad de microorganismos, como células efectoras del sistema inmune; durante este contacto con patógenos, en la CC se pueden llevar a cabo dos mecanismos de reconocimiento microbiano mediante los cuales se activan. El primero es dependiente de IgE, con la unión de antígenos de helmintos a IgE y a receptores de alta afinidad para IgE (FcεRI) presentes en la CC (Lukacs y cols., 1996); el segundo mecanismo se lleva a cabo mediante la unión directa de receptores específicos en la CC a sus ligandos complementarios en la superficie de patógenos, como ejemplo de este se tiene la unión directa de CC a *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (Arok y cols., 1998). Estas células pueden ser activadas o inhibidas por una gran variedad de compuestos inmunológicos y no inmunológicos (Tabla 2).

Tabla 2 . Factores que activan, estimulan o inhiben las funciones de las células cebadas.

<u>Activación/estimulación</u>	<u>Inhibición</u>
Moléculas específicas IgE, alérgeno Citocinas, quimiocinas	Endógenos Interferón α/β, γ Inhibidores de fosfolipasa A 2 Lactoferrina/transferrina
Péptidos catiónicos Neuropeptidos: sustancia P, Compuesto 48/80, C3a/C5a, Endorfinas, RMCP I, Ionóforo de calcio: A23187	
Factores/citocinas liberadores de histamina IL-1, IL-3, IL-8 GM-CSF, Productos microbianos	Exógenos Cromoglicato de sodio Ciclosporina A Productos microbianos Sulfasalacina Inhibidores de fosfodiesterasa



C3a/C5a= moléculas del complemento, GM-CSF= factor estimulante de las colonias de granulocitos-monocitos. Tomado y modificado de Befus, 1994.

Durante la formación del complejo entre la IgE y el receptor FcεRI que se encuentra en la membrana de la CC, y la unión de antígenos multivalentes a este complejo, se desencadena la activación de esta célula (Figura 5).

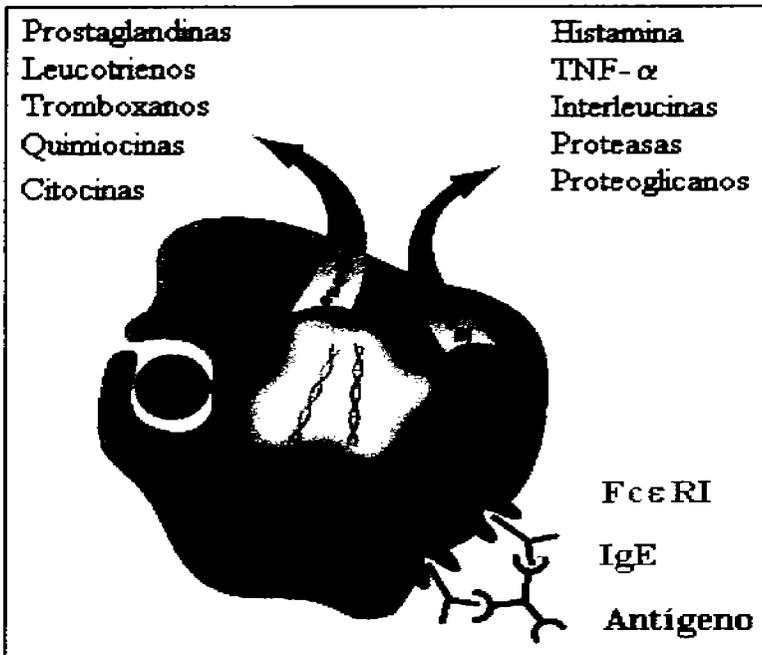


Figura 5. Activación de la célula cebada por un mecanismo dependiente de IgE. Se muestra la liberación inmediata de moléculas preformadas en los gránulos citoplasmáticos y la síntesis *de novo*; inducida por la unión de un antígeno al complejo IgE-FcεRI en la célula cebada. Tomado y modificado de <http://ist-socrates.berkeley.edu/~jmp/EstherWeb/mechanisms.html>

Lo anterior origina que se produzcan tres efectos: a) la liberación inmediata de histamina, heparina, proteasas, citocinas y quimiocinas, los cuales están preformados en los gránulos citoplasmáticos de la célula, b) la síntesis y secreción de derivados lipídicos como leucotrienos, tromboxanos y prostaglandinas (prostanoides), y c) la transcripción, traducción y secreción de una gran variedad de citocinas tales como TNF-α, factor

estimulante de las colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF), factor de células tronco (SCF), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-14 e IL-16, además de la expresión de ciertas quimiocinas tales como la proteína inflamatoria de macrófagos -1α (MIP-1 α), MIP-1 β , linfotactina, eotaxina 1/2, IL-8 y Rantes (Befus, 1996). Debido a la longevidad de las CC (meses o años), éstas pueden sintetizar nuevamente los compuestos de sus gránulos citoplasmáticos después de la liberación de mediadores en respuesta a un estímulo específico y pueden participar en múltiples ciclos de liberación de mediadores (Féger y cols., 2002).

1.2.3 Células cebadas y respuesta inmune innata

En cuanto a la participación de las CC en respuestas inmunes innatas se han realizado estudios en donde se reporta que estas células pueden servir como células efectoras críticas en estas respuestas. Las funciones relevantes de las CC en inmunidad innata son las siguientes: participan en el reclutamiento de leucocitos *in vivo*, en inflamación aguda y juegan un papel importante en la defensa del organismo contra infecciones bacterianas (Wershil y cols., 1988; Gaboury y cols., 1995; Malaviya y cols., 1996a).

Se ha demostrado que el TNF- α derivado de CC puede actuar directa e indirectamente para inducir la inflamación intestinal; por otro lado el reclutamiento de neutrófilos en una infección bacteriana es principalmente a través de la producción de TNF- α por estas células (Malaviya y cols., 1996b).

Por otra parte, se ha demostrado que las CC pueden fagocitar y matar bacterias, pero la eficiencia fagocítica de las CC parece ser mucho menor que los fagocitos tradicionales (neutrófilos y macrófagos) (Abraham y Malaviya, 1997; Malaviya y Abraham, 1998). Se ha reportado que las CC pueden procesar bacterias y otros antígenos y pueden funcionar

como células presentadoras de antígeno vía complejo principal de histocompatibilidad clase I o clase II (Frاندji y cols., 1996; Malaviya y cols., 1996b).

Así mismo, se ha demostrado que las CC participan en la respuesta inmune innata contra otros agentes infecciosos. Se sabe que en infecciones experimentales con el parásito *Trypanosoma brucei brucei* las CC son activadas y liberan histamina (Ben-Rashed y cols., 2003). Además, recientemente se demostró que las CC al entrar en contacto con *Mycobacterium tuberculosis* ó con los antígenos recombinantes ESAT-6, MTSA-10 y MPT-63, se activan por medio de un mecanismo independiente de IgE, liberando moléculas preformadas, tales como histamina y β -hexosaminidasa, así como moléculas de la síntesis *de novo*: TNF- α e IL-6 (Muñoz y cols., 2003). De la misma manera se ha observado que las CC del tracto urinario son activadas por *E. coli* que expresan fimbria H, lo que originó la liberación de una gran cantidad de histamina, además de que la viabilidad de las bacterias dependió del número de CC (Malaviya y cols., 2004).

2.- ANTECEDENTES

2.1 Respuesta inmune en contra de *Trichinella spiralis*

Los helmintos como *T. spiralis* producen infecciones crónicas y persistentes debido a que la inmunidad desarrollada contra ellos es poco eficiente, además de que a lo largo de su evolución han generado múltiples mecanismos para evadir y resistir la inmunidad específica inducida en el hospedero.

En hospederos infectados con *T. spiralis* se desarrollan respuestas inmunes que pueden impedir el establecimiento del parásito en el músculo esquelético, por esta razón es importante estudiar los mecanismos efectores que participan en la inmunidad contra este parásito. La respuesta inmune hacia este nematodo es compleja ya que es una combinación de respuestas dirigidas hacia los tres estadios del parásito, los cuales son antigénicamente diferentes, ya que presentan cambios moleculares de superficie tanto en el mismo como en los diferentes estadios (Philipp y cols., 1980; Philipp y cols., 1981; Jungery y cols., 1983).

Las infecciones en animales de experimentación con *T. spiralis* representan un excelente modelo para estudiar la biología del parásito, en los cuales se desarrollan respuestas inmunes que impiden su establecimiento. En estos modelos se ha estudiado tanto la respuesta inmune celular como la humoral pero aún no se conoce con precisión como se activan la respuesta inmune innata y como se induce la respuesta inmune específica en contra de esta infección (Ortega-Pierres y cols., 1987).

Durante la respuesta inmune humoral en infecciones con *T. spiralis* en humanos los anticuerpos específicos que son detectados en suero son de clase IgG, IgA, IgM e IgE (Van Knapen y cols., 1982). De la misma forma, en la inmunidad humoral contra el

adulto existen altos niveles de IgA, IgE e IgM en la fase aguda de triquinosis, pero sólo la IgE se produce a lo largo de la infección (Chapa-Ruiz y cols. 2001).

Mediante una prueba de ELISA se detectaron coproanticuerpos de clase IgA e IgE en ratas infectadas experimentalmente con *T. spiralis*, observándose que los coproanticuerpos contra el adulto son producidos durante los primeros 14 días post-infección y los coproanticuerpos contra la LM sólo se producen hasta el día 4 post-infección (Nuñez y cols., 2003).

La identificación de antígenos de *T. spiralis* que participan en la inducción de respuestas inmunes contra este parásito ha sido estudiada ampliamente bajo diferentes condiciones y en distintos modelos animales. Así se ha descrito que la respuesta inmune está dirigida principalmente hacia los antígenos de superficie y del esticosoma, así como hacia los productos de excreción y secreción (E/S) del parásito (Ortega-Pierres y cols., 1989).

Yépez-Mulia y cols. (1997) mostraron que los antígenos de E/S y de superficie/esticosoma de la LM fueron reconocidos por el suero de varios animales mamíferos (lobos, coyotes, zorros, jaguares, leones y tigres) del zoológico de Chapultepec de la Ciudad de México mediante ensayos de ELISA y Western-Blot, confirmando así la inmunodominancia de estos antígenos en la activación de mecanismos inmunes en animales infectados con *T. spiralis*. De la misma forma, en estudios de Western-Blot sueros de caballos infectados con *T. spiralis* reconocieron componentes de la LM con pesos moleculares de 47, 52, 59, 67, 72 y 105 kDa (Yépez-Mulia y cols., 1999). En otro estudio con antígenos del adulto de *T. spiralis* se observó que sueros de humanos y cerdos infectados con el parásito mostraron reactividad hacia proteínas de 95, 87, 74 y 64 kDa; mientras que sueros de humanos y ratas reaccionaron en común con proteínas de 98, 35 y 16 kDa (Hassanain y cols., 2004).

Actualmente se considera a los antígenos de E/S y de superficie/esticosoma de la LM dentro del grupo de antígenos TSL-1. Estos antígenos están conformados por 6 glicoproteínas, cuya inmunodominancia es conferida por residuos de tivelosa (Appleton y cols., 1991; Wisnewski y cols., 1993; Ortega-Pierres y cols., 1996; Appleton y Romaris, 2001).

De esta manera, se sabe que en hospederos infectados con parásitos nematodos gastrointestinales como *T. spiralis* la respuesta inmune se puede manifestar mediante la expulsión del adulto, reducción en su tamaño, disminución de la fecundidad de las hembras, así como también por la prevención del establecimiento de la LM en el hospedero. Sin embargo la manifestación de una respuesta inmune desarrollada que más beneficia al hospedero es la expulsión del parásito adulto del tracto alimentario, aunque también es muy importante afectar la fecundidad de las hembras para reducir la cantidad de fases migratorias del parásito (Rothwell, 1989).

Por otra parte, durante la fase entérica de una infección con *T. spiralis* se induce una intensa reacción inflamatoria caracterizada por incremento en el número de CC, eosinófilos y producción de altos niveles de IgE, estas respuestas son características de infecciones con helmintos y son reguladas por una respuesta inmune tipo Th2, en estas respuestas intervienen una extensa variedad de citocinas como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (Matossian y cols., 1977). La expulsión del adulto es dependiente de linfocitos B y T, y la expulsión eficiente del parásito depende de linfocitos T CD4⁺ a través del control de la respuesta de CC (Garside y cols., 1992).

Miller (1984) propuso que la expulsión del adulto de *T. spiralis* es considerada como el primer mecanismo de defensa en una infección con este parásito. Hasta la fecha se han realizado una gran variedad de investigaciones en infecciones experimentales en ratas y

raciones acerca del mecanismo de expulsión del adulto de *T. spiralis*, pero aún no se conoce con precisión. Es claro que el estudio de este mecanismo es de considerable importancia para saber y conocer el tipo de células, citocinas, moléculas, anticuerpos, etc., que participan para que se lleve a cabo, además también es de suma importancia debido a que nos podría ayudar al desarrollo de vacunas con extractos antigénicos del parásito e innovar tratamientos para minimizar los síntomas e inducir la expulsión del organismo adulto.

La expulsión del organismo adulto es el resultado del proceso inflamatorio en el intestino de hospederos infectados inducido por células activadas por antígenos de estadios pre-adulto así como antígenos de la LM (Wakelin y Donachie, 1983). Al respecto, Bell y McGregor (1979) examinaron la fase del ciclo de vida de *T. spiralis* contra la cual está dirigido el proceso de expulsión rápida. Ellos observaron que la expulsión del parásito era menos eficiente cuando las ratas eran infectadas con adultos de 4 días en comparación a cuando la infección se realizaba con la LM y adultos de 1 día. Esto sugiere que el proceso de expulsión rápida está dirigido principalmente contra la LM y el adulto de 1 día, inducido tal vez por moléculas liberadas inmediatamente después de la penetración de la LM a la mucosa.

En el intestino delgado, existen mecanismos inespecíficos de la respuesta inmune innata que funcionan en conjunto con el sistema inmune para evitar la adhesión y penetración de antígenos. Estos mecanismos inespecíficos incluyen barreras físicas (epitelio, fluidos, peristaltismo y moco), químicas (secreciones, enzimas, pH, ácidos grasos) y biológicas (flora bacteriana) (Mayrhofer, 1984). Con base en lo anterior, en infecciones producidas por nematodos como *T. spiralis* intervienen mecanismos inespecíficos de defensa como la mucina y el hiperperistaltismo. En estas infecciones existe una hiperplasia de células caliciformes y se producen altos niveles de mucina que atrapan al parásito y minimizan

su capacidad para establecerse en el intestino y facilitan su expulsión. De la misma forma, el hiperperistaltismo y la secreción de fluidos en el intestino provocan la expulsión de estos parásitos. Estos mecanismos son extremadamente importantes para eliminar rápidamente a las hembras fecundadas y así evitar que las LRN de *T. spiralis* se establezcan en el músculo. Así, se ha observado que la hiperplasia de células caliciformes y los altos niveles de mucina ocurren al día 8 post-infección cuando la expulsión del parásito comienza, además de que las citocinas predominantes fueron del tipo 2; sugiriéndose que probablemente la hiperplasia de células caliciformes es regulada por células Th2 (Ishikama y cols., 1997).

Además, se sabe que durante la infección primaria con *N. brasiliensis* se induce una población de linfocitos o eosinófilos que reaccionan hacia los antígenos del parásito y generan rápidamente citocinas tipo 2, las cuales promueven una respuesta Th2. Las células Th2 estimulan la proliferación de células caliciformes y la secreción de mucina a través de la producción de IL-4 e IL-13, lo cual induce cambios fisiológicos en el epitelio y músculo del intestino que conducen a la expulsión del parásito (Figura 6A) (Maizels y Holland, 1998).

En una infección primaria o secundaria producida por helmintos como *T. spiralis*, las células Th2 producen citocinas que estimulan la diferenciación de CC. Estas células son activadas por antígenos del parásito a través de IgE específica liberando moléculas que inducen un incremento de la permeabilidad intestinal, contracción del músculo liso y secreción de fluidos. Estas alteraciones provocadas en el intestino participan para que se lleva a cabo la expulsión del parásito (Figura 6B) (Maizels y Holland, 1998).

Tuohy y cols. (1990) trabajando un modelo en ratones infectados con *T. spiralis* observaron una mastocitosis pronunciada en ratones NIH y altos niveles de la proteasa de

CC de ratón (mMCP) entre el día 9 y 12 post-infección, coincidiendo con la mastocitosis y la expulsión del parásito producidas al día 9 post-infección (Figura 7). Esto sugirió que existe una correlación entre la mastocitosis y la expulsión del parásito.

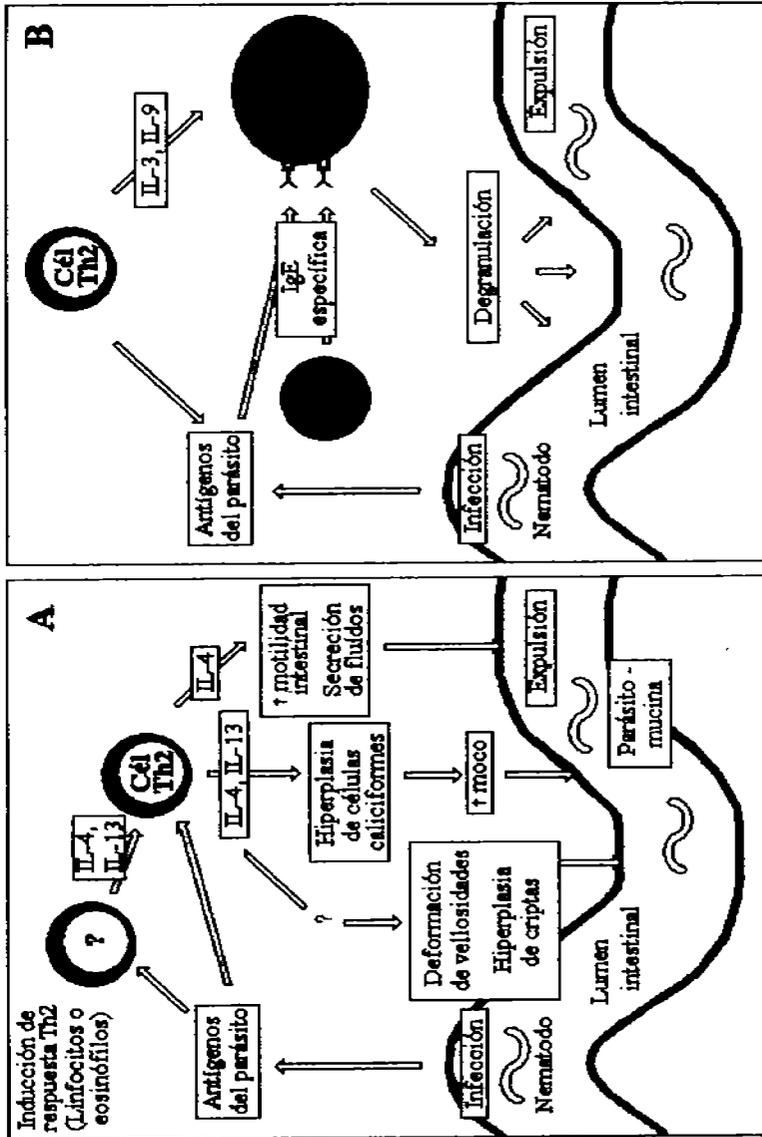


Figura 6. Mecanismo de expulsión de parásitos nematodos de forma independiente y dependiente de células cebadas. (A) Respuesta inmune producida en una infección primaria con *N. brasiliensis* independiente de CC. (B) Respuesta inmune producida en una infección primaria o secundaria con *T. spiralis* dependiente de CC. Cél = célula. Tomado y modificado de Maizels y Holland, 1998.

Al respecto, existen varias evidencias de que las moléculas liberadas por CC juegan un papel muy valioso en el proceso de expulsión del adulto de *T. spiralis*. Es así que en 1987, Moqbel y cols. midieron niveles de leucotrienos inmunoreactivos C₄ y B₄ (LTC₄ y LTB₄) en moco y en tejido intestinal de ratas inmunizadas contra *T. spiralis*, ellos encontraron que estos mediadores fueron liberados durante el fenómeno de expulsión rápida. La presencia de gran número de CCM sugirió que estas células pueden ser las responsables de la liberación de estas sustancias.

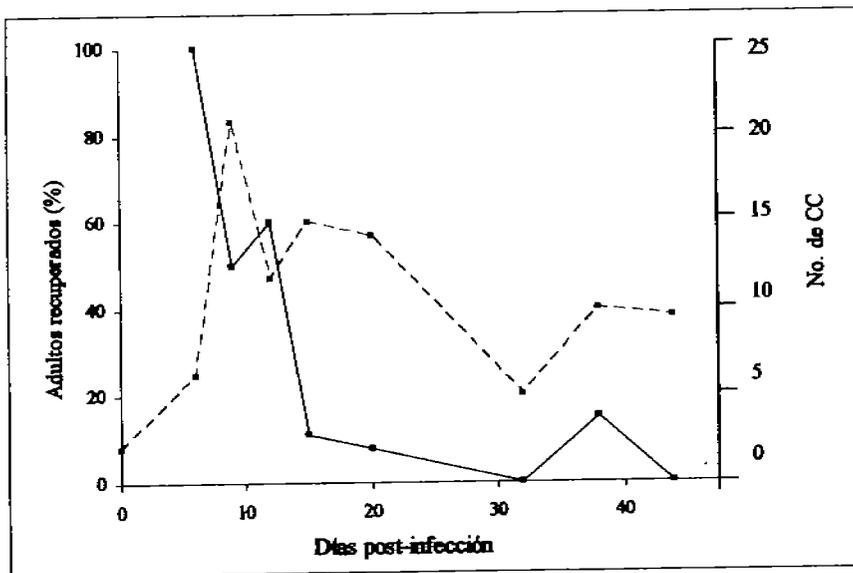


Figura 7. Correlación de células cebadas y expulsión de *Trichinella spiralis*. Se muestra los porcentajes de adultos recuperados (—■—) y el número de CC por unidad de vellosidad-cripta (—▲—) del intestino delgado de ratones NIH infectados con *T. spiralis*. Tomado y modificado de Tuohy y cols, 1990.

Por otra parte, también se ha demostrado que las proteasas liberadas por las CC, participan en el mecanismo de expulsión de *T. spiralis* y de otros nematodos parásitos. Es así que Woodbury y cols. (1984) observaron que en ratas infectadas con *T. spiralis* y *N.*

brasiliensis la secreción sistémica de la proteasa de CC de rata II (RMCP II) coincide con la expulsión del organismo adulto de *T. spiralis* y de *N. brasiliensis*, por lo que esto sugirió que las CCM son activadas funcionalmente durante la eliminación del parásito en infecciones primarias por nematodos.

En cuanto a la identificación de interleucinas presentes en una infección con *T. spiralis*, que participan en la respuesta inmune producida con este parásito, Ramaswamy y cols. (1996) determinaron paradójicamente que las citocinas típicas de una respuesta tipo Th2 (IL-4 e IL-5) y una respuesta tipo Th1 (IFN- γ) son detectadas simultáneamente en la linfa intestinal de ratas infectadas en fase temprana (Figura 8). A las 35 h después de la infección se observaron incrementos intermitentes en IFN- γ en la linfa intestinal, este aumento fue paralelo con el de IL-5 durante la primera fase de la infección en el intestino. Se detectaron altos niveles de IL-4 (Citocina que estimula la producción de IgE) e IL-5 entre las 264-290 h post-infección (periodo de expulsión del parásito), pero la actividad de IL-4 fue más prolongada que IL-5 durante este periodo.

Lawrence y cols. (1998) demostraron que la expulsión del adulto de *T. spiralis* es dependiente de IL-4 y que el TNF- α está implicado en la patología intestinal producida en esta infección, aparentemente bajo control de IL-4. Los autores observaron que la expulsión del parásito en ratones deficientes en IL-4 fue prolongada en comparación con ratones control, esto confirmó que la expulsión del adulto de *T. spiralis* requiere de la presencia de IL-4. Por otro lado, ratones deficientes en el receptor para TNF- α no mostraron patología severa (atrofia de vellosidades, hiperplasia de criptas y aumento de células en mitosis) en comparación con ratones control; esto indicó que el TNF fue necesario para que se promoviera la patología intestinal producida. Por otro lado, la mastocitosis en ratones deficientes en IL-4 y en ratones deficientes en el receptor para TNF infectados con el parásito fue menor. Estos experimentos también mostraron que la

expulsión del parásito se puede llevar a cabo en ausencia de enteropatía, ya que en ratones deficientes para el receptor de TNF, la expulsión del parásito no disminuyó.

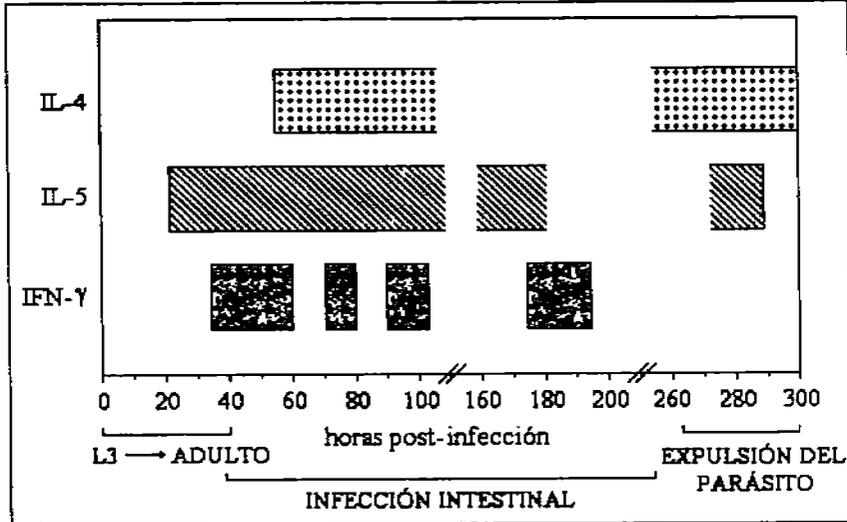


Figura 8. Representación esquemática de las citocinas secretadas en la lúmina intestinal de ratas infectadas con *Trichinella spiralis*. Los niveles de las citocinas IL-4, IL-5 e IFN-γ fueron determinados de 0 a 300 h post-infección. Tomado de Ramaswamy y cols., 1996.

Al respecto, en otro estudio se demostró que la enteritis producida durante la expulsión de *T. spiralis* es mediada por la producción de TNF- α y la óxido nítrico sintasa inducible, que ocasiona la enteropatía resultante caracterizada por atrofia de vellosidades e hiperplasia de criptas (Lawrence y cols., 2000).

Recientemente Lawrence y cols. (2004) demostraron que las CC participan en la expulsión de *T. spiralis* y que juegan un papel importante en la promoción o amplificación de la respuesta inmune Th2 requerida para la expulsión del parásito y para que se desarrolle la enteropatía. En estos ensayos, los autores observaron que los ratones deficientes en CC (W/Wv) al día 13 post-infección mostraron un aumento en la cantidad

de adultos recuperados y hubo niveles bajos de IL-4 e IgE (moléculas características de una respuesta tipo Th2), mientras que en ratones deficientes en mMCP-1 (mMCP-1 KO) y en ratones normales hubo un aumento en IL-4 e IgE. Lo anterior indicó que en ratones W/Wv la respuesta Th2 fue reducida y que en ratones mMCP-1 KO no se afectó.

También se ha observado que en ratones infectados con *T. spiralis* la sobreexpresión de IL-9 (citocina tipo Th2 que activa CC y aumenta la producción de IgE e IgG1), les confiere la habilidad para expulsar rápidamente al parásito. De la misma manera y por supresión de CC con un anticuerpo anti-*c-kit* o por uso de IL-9 que aumenta la expresión de CC en ratones transgénicos, han demostrado que estas células son las mediadoras clave del incremento de la permeabilidad en la mucosa (Godfraind y cols., 1998).

El efecto de histamina en infecciones por *T. spiralis* resulta en la inhibición de la fecundidad en las hembras de *T. spiralis*. Ya que en ratones que recibieron una dosis oral de histamina, la fecundidad de las hembras disminuyó y hubo una elevación de la enteritis. Mientras que en ratones inyectados intramuscularmente con antihistamínicos incrementó la fecundidad de las hembras y la enteritis disminuyó comparada con ratones control (Stewart y cols., 1985).

La IL-5, es otra citocina tipo Th2 que participa en la producción de eosinófilos, y se ha demostrado que participa en la protección contra la infección de *T. spiralis*. De esta manera, en ratones deficientes en IL-5 y en ratones normales infectados con *T. spiralis* la recuperación de adultos fue similar; pero en ratones deficientes en IL-5 no se desarrolló eosinofilia, mientras que en ratones normales hubo una alta expresión de IL-5 y eosinofilia intestinal. Esto sugirió que la IL-5 y los eosinófilos contribuyeron al proceso de protección contra la infección de *T. spiralis* en el ratón pero no participaron para que se llevara a cabo la expulsión del parásito (Vallance y cols., 1999).

En cuanto a la participación de la IgE en el mecanismo de expulsión del adulto de *T. spiralis*, se ha mostrado que al día 11 post-infección con el parásito, la IgE sérica y de lavados intestinales reconocen antígenos de la LM, y que al día 14 la IgE sérica no reconoce antígenos del adulto, mientras que la IgE intestinal reconoce antígenos tanto de LM como del adulto. La IgE sérica representa sólo del 0.2 al 1% de la cantidad total de IgE que puede ser producida en una respuesta intestinal durante una infección con *T. spiralis*. Por esta razón es probable que la IgE sea producida en el intestino y no sea transportada a la circulación sanguínea, para posteriormente participar en el bloqueo de la penetración de adultos a las células epiteliales (Negrão-Corrêa y cols. 1996; Negrão-Corrêa y cols. 1997).

De manera interesante en ratones deficientes para la cadena γ y del receptor para IgE, infectados con *T. spiralis*, desarrollaron una mastocitosis intestinal y expulsaron al parásito. Además, en estos animales se detectó en suero la proteasa mMCP-1, como indicio de que las CC fueron activadas, lo anterior sugiere la participación de CC en el proceso de expulsión de manera independiente de IgE (Grencis, 1997).

A este respecto, Arizmendi y cols. (1997) demostraron que los antígenos TSL-1 de la LM de *T. spiralis* activaron a CCPR tanto por un mecanismo dependiente de IgE como por vía directa (mecanismo independiente de IgE). Las CCPR activadas de manera directa por los antígenos TSL-1 liberaron histamina, proteasa-5 y carboxipeptidasa. Por otra parte, se determinó que CC de la línea HRMC con fenotipo de mucosa son activadas por antígenos TSL-1 de la LM de *T. spiralis* mediante un mecanismo independiente de IgE e inducen el incremento de los niveles de mRNA para IL-4 y TNF- α . Lo anterior sugiere que las CC pueden participar en la inducción de una respuesta inmune tipo Th2 por un mecanismo independiente de IgE durante infecciones intestinales causadas por helmintos (Arizmendi y cols., 2001).

Así mismo, en un trabajo reciente Niborski y cols. (2004) demostraron mediante inmunofluorescencia que antígenos TSL-1 de la LM de *T. spiralis* se unen a la superficie de células HRMC, induciendo la transcripción y liberación de TNF- α e IL-4. Por lo que se demostró que la activación de CC por antígenos de *T. spiralis* fue de manera directa sin la presencia de inmunoglobulinas. Esto sugiere que las CC tienen un papel esencial en la respuesta inmune innata contra infecciones por *T. spiralis*. Respecto a lo anterior, los resultados obtenidos reafirman la propuesta hecha por Romagnani (1992), en la que el autor propuso que la producción de IL-4 por CC puede determinar y amplificar el tipo de respuesta inmune a través de células Th2 durante infecciones por helmintos (Figura 9).

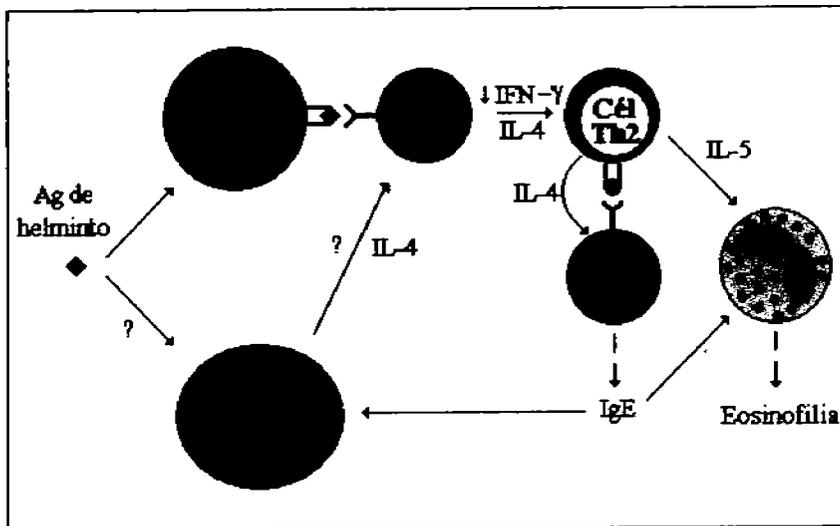


Figura 9. Participación de las células cebadas en una respuesta inmune tipo Th2 dirigida contra parásitos helmínticos. CPA= célula presentadora de Ag, Cél= célula, Eo= eosinófilo. Tomado y modificado de Romagnani, 1992.

Otro estadio que se puede considerar como un blanco de importancia relevante para la respuesta inmune producida por el hospedero hacia una infección con *T. spiralis*, es la

LRN, debido a que son tres las rutas principales que participan en la migración de la LRN de *T. spiralis*: vía circulación sanguínea, a través de tejido conectivo y fluidos corporales y la última es por medio de la linfa hacia la sangre (Wang, 1997). Por otro lado, se sabe que los adultos y la LM son aislados en sitios anatómicos, donde los factores de defensa del hospedero no pueden alcanzarlos en suficiente concentración, mientras que la LRN está expuesta a una gran variedad de mecanismos efectores celulares y humorales durante su migración hacia el músculo esquelético.

Se ha señalado que la protección anti-LRN (eosinófilos, complemento y procesos oxidativos) puede ser importante y efectiva para dañar la viabilidad de las larvas, además de disminuir la cantidad de LRN en la circulación e impedir su establecimiento en el músculo estriado (Lee y Befus, 1989; Wang y Bell, 1992).

En relación a este estadio del parásito, los estudios realizados acerca de la respuesta inmune han sido pocos en comparación con los de la LM y el organismo adulto, debido posiblemente a la dificultad de su recuperación de los hospederos, además de que la cantidad de LRN que se recupera es poca. Por lo que a la fecha se desconocen muchos aspectos en lo que se refiere a respuesta inmune innata y específica producida en contra de este estadio de *T. spiralis*.

En cuanto a los antígenos de la LRN de *T. spiralis*, se conoce que el patrón de proteínas de superficie difiere cualitativamente de los adultos y de la LM. Se ha demostrado que 6 h después de que la LRN atraviesa la mucosa intestinal hacia el torrente sanguíneo, expresa una sola proteína de superficie de 64 kDa y entre las 6 a 18 h, expresan tres componentes de 58, 34 y 32 kDa. Durante el mismo periodo en que aparecen los tres componentes específicos de superficie, las LRN desarrollan la capacidad para activar complemento; esto sugiere la posibilidad de que uno o más de los tres antígenos

originados después puedan ser responsables de la activación del complemento (Jungery y cols., 1983).

Respecto a la inmunidad generada contra este estadio del parásito, Bell y cols. (1985) observaron que en ratones DBA/1 y ratones AKR la administración de LRN de *T. spiralis* por vía intravenosa generó una inmunidad anti-LRN y promovió una protección del 96-98% contra este estadio del parásito al administrar LRN a los ratones al día 10 post-infección. Estos resultados indicaron que la inmunidad anti-LRN puede ocurrir rápidamente después de la exposición a antígenos de la LRN.

Así mismo, en cerdos inmunizados pasivamente con suero inmune total o con la fracción de inmunoglobulinas conteniendo anticuerpos contra la LRN, se observó una disminución en el establecimiento de la LM, por lo tanto los anticuerpos anti-LRN previenen la migración de la larva. Los anticuerpos contra la LRN se detectaron 4 semanas después de la infección, lo anterior sugiere que la respuesta inmune hacia la migración de la LRN se desarrolla bastante rápido, jugando un papel regulador en el establecimiento de la LM en infecciones primarias en los cerdos (Marti y cols., 1986).

Por otra parte se ha investigado la presencia de anticuerpos anti-LRN en humanos con triquinosis aguda y crónica. Los resultados mostraron que sólo 64% de los pacientes con infección aguda presentaron anticuerpos anti-LRN y que 87% de los sueros fueron citotóxicos; mientras en infecciones crónicas el 63% de los pacientes tuvo anticuerpos anti-LRN y solo 20% tuvo actividad citotóxica. En pacientes con infección aguda tuvieron todos los isotipos de anticuerpos evaluados (IgM, IgA, IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄) mientras que en infecciones crónicas hubo sólo IgG₁, y en algunos pacientes también hubo IgM o IgG₃ (Venturiello y cols., 1997). Posteriormente, se estudiaron las propiedades biológicas de estos anticuerpos anti-LRN, para ello se purificaron

anticuerpos anti-superficie de LRN de sueros de individuos con triquinelosis crónica y se observó que estos anticuerpos reconocen antígenos de E/S de la LM mediante ELISA y Western-Blot. Además de que estos anticuerpos anti-LRN fueron incapaces de inducir la muerte de la LRN por activación de leucocitos, por otra parte cuando LRN fueron incubadas con estos anticuerpos antes de los ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (se usó suero de pacientes con triquinelosis aguda), el efecto citotóxico fue inhibido indicando que los anticuerpos tienen la capacidad de bloquear la acción de anticuerpos efectores contra la LRN (Venturiello y cols., 2000).

En un estudio reciente se midió la frecuencia de anticuerpos anti-LRN de *T. spiralis* en sueros de pacientes con triquinelosis aguda y crónica, para analizar la relevancia de epitopos proteicos y glicanos de los productos de E/S de la LM en el fenómeno de reactividad cruzada. Mediante estudios de deglicosilación se demostró que los epitopos proteicos son los principales responsables del fenómeno de reactividad cruzada implicado con productos de E/S de la LM y la superficie de la LRN durante ambas fases de la infección. Aunque si bien, los epitopos glicanos son inmunodominantes en la estimulación del sistema inmune. Por lo que los investigadores postularon la existencia de un fenómeno de modulación en la inmunidad adquirida contra la LRN, dada en parte por epitopos presentes en los productos de E/S de la LM y en la cutícula de la LRN (Malmassari y cols., 2003).

Este estadio del parásito es demasiado grande como para ser fagocitado por neutrófilos y macrófagos, pero puede ser destruido por componentes de los gránulos de los eosinófilos. En cuanto a esto, se sabe que los eosinófilos participan en un tipo especial de ADCC dirigida contra algunos parásitos helmintos (Figura 10), en esta citotoxicidad celular, la IgE se une a receptores Fcε de los eosinófilos y a antígenos del parásito; estas células se activan y liberan el contenido de sus gránulos, los cuales provocan la destrucción del

parásito (Abbas y Lichtman, 2004). Esto es muy importante ya que la participación de los eosinófilos en contra de la LRN de *T. spiralis*, puede provocar su destrucción y así evitar que se establezca en el músculo esquelético.

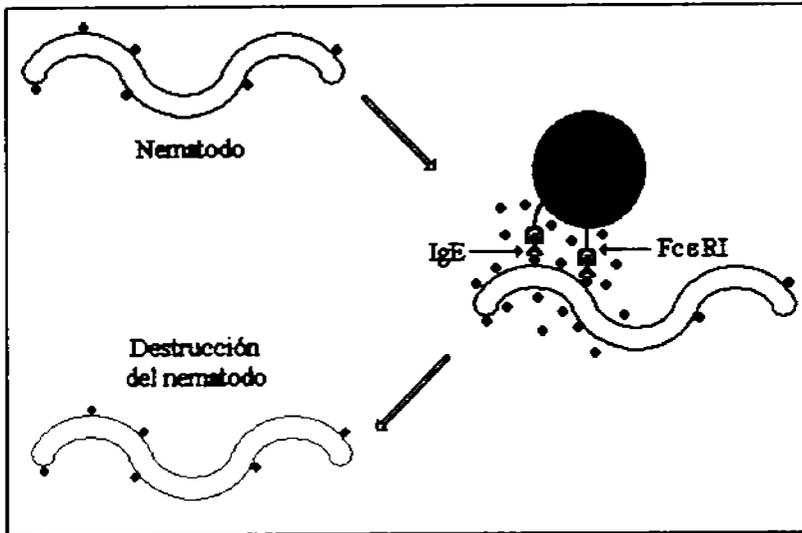


Figura 10. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por eosinófilos desarrollada contra parásitos helmintos. Tomado y modificado de Abbas y Lichtman, 2004.

De esta manera, Ortega-Pierres y cols. (1984) determinaron que el anticuerpo monoclonal (NIM-M5) dirigido contra la LRN de *T. spiralis*, es capaz de destruirla *in vitro* por medio de un mecanismo dependiente de eosinófilos, lo cual redujo la infectividad de la LRN *in vivo*. Cuando el anticuerpo monoclonal NIM-M1 dirigido contra la LM se usó, no se promovió la adhesión de eosinófilos ni la muerte de la LRN. Eso sugirió, que anticuerpos dirigidos contra la superficie de la LRN pueden ser importantes para prevenir infecciones subsecuentes de células musculares.

Así mismo, se sabe que los leucocitos humanos normales tienen la capacidad de matar a la LRN de *T. spiralis*, observándose que neutrófilos y monocitos atacaron y mataron a LRN de 2 y 20 h de edad. Mientras que los eosinófilos no tuvieron efecto en LRN de 2 h y sólo en larvas de 20 h. El complemento fue esencial en el efecto citotóxico de los leucocitos. Esto sugiere que la defensa del hospedero contra *T. spiralis* es un mecanismo complejo en la cual diferentes tipos de células pueden intervenir (Venturiello y cols., 1993).

Se ha demostrado que la maduración de la LRN de *T. spiralis* y el estado de activación de eosinófilos, son cruciales para la ADCC. En este estudio se emplearon eosinófilos de individuos normales y eosinófilos de individuos con eosinofilia (activados) los cuales se incubaron con LRN de 2 y 20 h de edad en presencia de suero normal y suero inmune. Los eosinófilos de individuos normales sólo mataron a larvas de 20 h, mientras que eosinófilos de pacientes con eosinofilia mataron a las dos (Figura 11), todos en presencia de suero inmune. Por otra parte también se observó que la citotoxicidad hacia la LRN de eosinófilos normales y activados fue significativamente menor en ausencia de suero inmune (Venturiello y cols., 1995).

En un estudio más reciente sobre ADCC en la LRN de *T. spiralis*, en el cual se usó suero obtenido de ratones inmunizados oralmente con LM y suero de ratones inmunizados con LRN por vía intraocular. Se observó que las células peritoneales se adhirieron y destruyeron estas larvas sólo en presencia de suero inmune, pero se logró una mayor susceptibilidad de las LRN al suero inmune obtenido de ratones infectados con LM. Por lo que el efecto citotóxico de células peritoneales es dependiente en los niveles de IgG1 estadio-específico en el suero inmune (Moskwa, 1999).

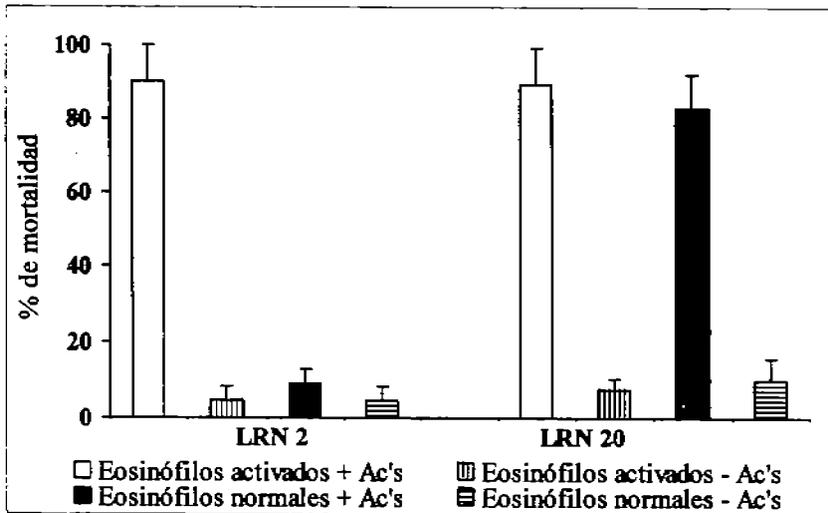


Figura 11. Comparación de la mortalidad de larvas recién nacidas producida por eosinófilos normales y activados. El ensayo se realizó en LRN de 2 y 20 h de edad (LRN 2 y LRN 20). Tomado de Venturiello y cols., 1995.

Wang (1998) estudió la cinética de la inmunidad anti-LRN, para esto se inmunizaron ratones con 2,000 LM y se infectaron con 20,000 LRN por vía intraperitoneal; y se evaluó la cantidad de LRN, adherencia celular y muerte de LRN a los 7, 14 y 21 días post-infección. En ratones inmunizados se recuperó menor cantidad de LRN al día 14 y 21 post-infección (30 y 23% respectivamente) en comparación con ratones control (64 y 65% respectivamente). Al mismo tiempo, se midió el porcentaje de adherencia de células y muerte de LRN en el fluido peritoneal y se observó que en ratones inmunizados hubo de 10-65% de adherencia de células a la LRN y de 6-65% de muerte de la LRN, mientras que en ratones control se obtuvo de 0.3-3% de adherencia celular y 0.3-1.9 de muerte de LRN. En estos ensayos se demostró que la inmunidad anti-LRN fue desarrollada a los 3-4 días después de la producción de LRN en una infección primaria con *T. spiralis*.

3. JUSTIFICACION

Las fases adultas de *T. spiralis* penetran al epitelio columnar de las vellosidades del duodeno y yeyuno, y viven dentro de estas células. Durante su estancia en el intestino delgado, el parásito entra en contacto con una gran variedad de células, mecanismos inespecíficos y específicos que promueven su destrucción. Entre las células que se observan en gran cantidad en la lámina propia del intestino en hospederos infectados con el parásito se encuentran las CC. Los adultos de *T. spiralis* permanecen en el intestino delgado durante 1 a 3 semanas, periodo en el cual los antígenos del parásito pueden entrar en contacto con estas células. Al respecto, existen evidencias de que moléculas liberadas por CC como interleucinas, leucotrienos y proteasas participan en la expulsión del organismo adulto de *T. spiralis* (Ramaswamy y cols., 1996; Moqbel y cols., 1987; Knight y cols., 2000). Además, se ha reportado que las CC son activadas durante el proceso de expulsión de *T. spiralis* en animales deficientes en la cadena γ y del receptor Fc ϵ , sugiriéndose su activación a través de un mecanismo independiente de IgE (Grencis, 1997).

Con respecto a la LRN, se ha reportado que las rutas principales que participan en la migración de esta larva hacia el músculo esquelético son: vía circulación sanguínea, a través de tejido conectivo y fluidos corporales y la última es por medio de la linfa hacia la sangre (Wang, 1997). Durante estas rutas de migración las LRN están expuestas a una gran variedad de mecanismos efectores celulares y humorales. Así mismo, antes de llegar al músculo estriado las LRN atraviesan una gran cantidad de tejidos y órganos en los que están presentes las CC, por lo que es posible que antígenos de la LRN entren en contacto con estas células y generen su activación, participando en el daño producido a las LRN y así se evita su establecimiento en el músculo esquelético.

Recientemente, se demostró la activación de CC por antígenos específicos de la LM de *T. spiralis* (TSL-1) sin embargo no se ha investigado si antígenos del adulto ó de la LRN de *T. spiralis* activan a CC por un mecanismo independiente de IgE.

Con base en lo anterior, en este trabajo de tesis se analizará si antígenos del adulto y de la LRN de *T. spiralis* inducen la activación directa de CCPR (no sensibilizadas) por un mecanismo independiente de IgE; tomando como marcadores de activación la liberación de histamina y de β -hexosaminidasa.

Este estudio aportará información importante sobre la participación de las CC en la respuesta inmune innata contra la fase de adulto y de la LRN de *T. spiralis*.

4. HIPÓTESIS

Antígenos del adulto y de la LRN de *T. spiralis* inducen la activación de CC por un mecanismo independiente de IgE y promueven la liberación de histamina y β -hexosaminidasa.

5. OBJETIVOS

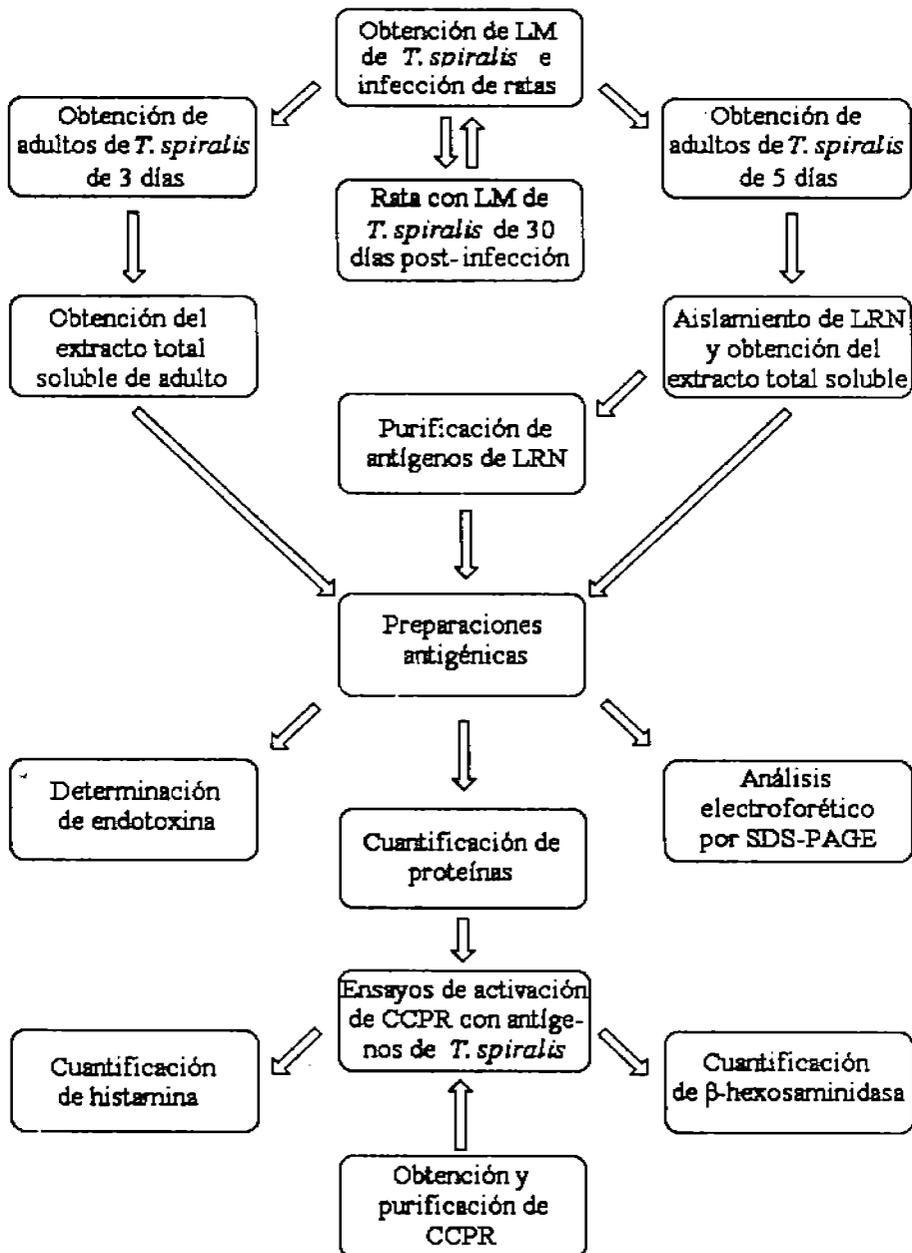
5.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la activación *in vitro* de células cebadas de peritoneo de rata no sensibilizadas por antígenos del adulto y de la LRN de *T. spiralis* a través de un mecanismo independiente de IgE.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la liberación de histamina y β -hexosaminidasa como marcadores de activación de células cebadas de peritoneo de rata estimuladas por extracto total soluble de adulto de *T. spiralis*.
- Determinar la liberación de histamina y β -hexosaminidasa como marcadores de activación de células cebadas de peritoneo de rata estimuladas por extracto total soluble y antígenos purificados de la LRN de *T. spiralis*.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7.- MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Mantenimiento del ciclo de vida de *Trichinella spiralis*

A partir de ratas infectadas con *T. spiralis*, se procedió a la obtención de las LM de acuerdo a lo descrito por Dennis y cols., 1970. Las ratas infectadas con el parásito se anestesiaron con éter etílico para posteriormente sacrificarlas por dislocación cervical, después con ayuda de bisturí y tijeras se procedió a quitarles la piel, cabeza, extremidades y vísceras. El músculo obtenido se trituró finamente y se mezcló con la solución de pepsina-HCl al 1%, la cual se preparó previamente, la mezcla se incubó a 37 °C por 3 h en agitación constante. Una vez terminada la incubación, las LM se recuperaron en un aparato de Baerman y se dejó reposar de 20 a 30 minutos (min) para que las LM se sedimentaran. Las LM obtenidas se lavaron varias veces con amortiguador de fosfatos (PBS) para eliminar los restos de tejido.

Una vez que las LM estuvieron limpias se resuspendieron en PBS a un volumen de 20 mL, después se realizaron diluciones 1:10 en gelatina al 0.5% en PBS. Se tomaron alícuotas de 25 µL y se contaron con ayuda de un microscopio óptico y se calculó el número total de LM obtenidas. Para mantener el ciclo ratas Sprague-Dawley hembras de 200-250 g de peso se infectaron por vía intragástrica con 4,000 LM.

7.2 Obtención de adultos de *Trichinella spiralis*

Los adultos se obtuvieron al tercer día post-infección con la finalidad de obtenerlos libres de LRN. Para esto, ratas Sprague-Dawley se infectaron con 10,000 LM por medio de una cánula gástrica y al día 3 post-infección se sacrificaron para obtener los adultos, los cuales se recuperaron del intestino delgado siguiendo lo descrito por Jungery y cols. (1983). Para llevar a cabo lo anterior las ratas se anestesiaron con éter etílico y se sacrificaron por dislocación cervical, se colocaron con el vientre hacia arriba y éste se

limpió con alcohol al 70%, después se procedió a abrir la cavidad peritoneal para retirar el intestino delgado. Este se abrió longitudinalmente con unas tijeras y se le retiró el moco, los intestinos limpios se partieron en trozos y se colocaron en el aparato de Baerman, el cual contenía PBS y se incubaron a 37 °C en una incubadora THELCO® durante 3 h. Una vez que transcurrió este tiempo, se retiró la gasa que contenía los intestinos y el sobrenadante se decantó. Los adultos obtenidos se lavaron varias veces en PBS estéril con antibióticos (penicilina 100 unidades/mL, estreptomycin 100 µg/mL y anfotericina B 2.5 µg/mL). Los parásitos se mantuvieron a -70 °C en Tris-HCl 10 mM pH 8.13 con inhibidores de proteasas (a una concentración final de 50 µg/mL de N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK), 25 µg/mL de N- α -p-tosil-L-lisina cloro-metil cetona (TLCK) y 174 µg/mL de Fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF)) en un refrigerador REVCO hasta que se usaron para obtener el extracto total soluble.

7.2.1 Obtención del extracto total soluble del adulto de *Trichinella spiralis*

Los adultos de *T. spiralis* mantenidos a -70 °C en Tris-HCl 10 mM pH 8.13 con inhibidores de proteasas se descongelaron, se colocaron en hielo, se maceraron y homogeneizaron en PBS en un homogeneizador de tejidos durante 30 min a 4 °C. Posteriormente el lisado se centrifugó a 18, 490 X g durante 30 min a 4 °C en una centrífuga refrigerada Mikro 22R (Hettich), el extracto total soluble se separó y se congeló a -70 °C. Se realizó la cuantificación de proteínas al extracto total soluble de adulto, así como la determinación de endotoxina y este se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE); y posteriormente se usó para los ensayos de activación de CCPR.

7.3 Obtención de las larvas recién nacidas de *Trichinella spiralis*

Para este procedimiento se siguió la misma metodología empleada para obtener los adultos de *T. spiralis* de 3 días de infección de los animales, con la diferencia de que las ratas se sacrificaron al día 5 post-infección tiempo en que las hembras empiezan a liberar LRN. Una vez que se obtuvieron los organismos adultos se lavaron varias veces en PBS estéril con antibióticos.

Los adultos se colocaron en medio RPMI, antibióticos y suero fetal bovino al 10%, y se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda con CO₂ al 5% en una incubadora (NUAIRETM). A las 24 h las LRN se recuperaron por sedimentación diferencial de los adultos. Las LRN recuperadas se lavaron varias veces con PBS estéril y se concentraron por centrifugación a 200 X g por 5 min. Las LRN obtenidas se mantuvieron a -70 °C en Tris-HCl 10 mM pH 8.13 con inhibidores de proteasas en un refrigerador REVCO hasta su uso.

7.3.1 Obtención del extracto total soluble de las larvas recién nacidas de *Trichinella spiralis*

Las LRN de *T. spiralis* mantenidas a -70 °C en Tris-HCl 10 mM pH 8.13 con inhibidores de proteasas se descongelaron y se mantuvieron en hielo. Estas se sonicaron por 1 min a 12 micrones y se dejaron reposar en hielo. Esto se repitió dos veces más y con el objetivo de determinar si las LRN estaban destruidas se tomó una alícuota de 5 µL, la cual se observó bajo el microscopio. Del lisado de LRN sonicadas, se tomaron 100 µL y se centrifugaron a 18,490 X g durante 30 min a 4 °C, el extracto total soluble se separó y se congeló a -70 °C. En este se realizó la cuantificación de proteínas, la determinación de endotoxina y se analizó por SDS-PAGE. Este extracto total soluble de LRN se empleó para llevar a cabo los ensayos de activación con CCPR. A otra preparación de LRN se le adicionaron después de sonicar 60 µL de deoxicolato de sodio al 20 % en Tris-HCl 10 mM pH 8.13 (a una concentración final de 2%) y se volvió a sonicar a las mismas

condiciones por 1 min. El lisado se centrifugó a 18, 490 X g por 30 min a 4 °C, el extracto total soluble se separó y se congeló a -70 °C. Este extracto total soluble de LRN se usó para obtener los antígenos purificados de LRN.

7.4 Purificación de antígenos de la larva recién nacida de *Trichinella spiralis*

La purificación de antígenos de la LRN de *T. spiralis* se realizó mediante cromatografía de afinidad usando el anticuerpo monoclonal CE-4, el cual se había acoplado a sefarosa. Este anticuerpo monoclonal reconoce antígenos de superficie de la LRN en ensayos de inmunofluorescencia (comunicación personal Rocío Fonseca Liñán). La purificación se realizó de acuerdo a lo descrito por Parkhouse (1984). Brevemente, se empacó una columna con 5 mL de Sefarosa-4B (Pharmacia) cuidando que no hubiera formación de burbujas y se lavó con agua y amortiguador álcali-strip pH 11.3 (1:1) (Anexo), ésta se equilibró con amortiguador de columna pH 8.3 hasta que el pH de la resina fue de 8.3. El extracto total soluble de LRN de *T. spiralis* se pasó por la columna tres veces y se lavó con amortiguador de columna (Anexo) hasta que la densidad óptica (D.O.) de las fracciones fuera de cero, la absorbancia se midió a 280 nm en un espectrofotómetro (DU-40 Spectrophotometer).

La elución del antígeno adherido a la columna se realizó en condiciones de pH básico empleando dos tipos de amortiguadores: pre-strip pH 9.3 y álcali-strip (Anexo). El cambio de amortiguador se realizó de acuerdo a la D.O. de las fracciones colectadas, así, de la fracción 1 a la 13 contenían amortiguador de columna, de la 14 a la 29 pre-strip y de la 30 a la 42 alkali-strip. Las fracciones eluidas con alkali-strip que contenían proteína (fracción 34 a 40) se les ajustó el pH a 8.3 con Tris-HCl 1 M. El antígeno obtenido se dializó en Tris-HCl 20 mM pH 8.3 en una membrana de diálisis con corte de 3,500 daltones para eliminar el deoxicolato de sodio y se concentró en Aquacide I (Calbiochem®) hasta obtener aproximadamente 2 mL. Posteriormente se determinaron la

concentración de proteínas, la presencia de endotoxina, y estos se analizaron por SDS-PAGE. Los antígenos purificados fueron utilizados para realizar los ensayos de activación de CCPR.

7.5 Cuantificación de proteínas

Para determinar la cantidad de proteína total presente en el extracto total soluble de adulto, en el extracto total soluble de LRN y en los antígenos purificados de LRN de *T. spiralis* se usó el método de Lowry modificado (Lowry y cols, 1951). Para esto se prepararon las siguientes soluciones: sulfato de cobre al 0.5% en H₂O bidestilada (solución A), carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 normal (N) (solución B), Tartrato de Na y K al 2% en H₂O bidestilada (solución C), se mezcló un volumen de la solución A y un volumen de la solución C (solución D), también se mezclaron cincuenta volúmenes de la solución B con un volumen de la solución D (solución E).

Posteriormente se preparó una curva estándar de albúmina sérica bovina empleando diferentes cantidades: 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µg (Figura 12). Tanto la curva estándar como las muestras se trabajaron por duplicado, una vez que se colocó la albúmina sérica bovina y las muestras problema (extracto total soluble de adulto, extracto total soluble de LRN y antígenos purificados de LRN de *T. spiralis*) en los tubos, se agregó un volumen de H₂O bidestilada hasta llevar a 500 µL. Después se adicionaron 2.5 mL de la solución E preparada previamente, los tubos se mezclaron e incubaron 10 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se les agregaron 250 µL de reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma®) diluido 1:2 en H₂O bidestilada y 500 µL de dodecil sulfato de sodio al 5%; los tubos se mezclaron e incubaron durante 30 min a temperatura ambiente.

Después se obtuvo la lectura de D.O. en un espectrofotómetro (DU-40 Spectrophotometer) a 750 nm. La cantidad de proteína presente en los extractos totales solubles de adulto y de LRN así como en los antígenos purificados de LRN de *T. spiralis* se obtuvo al interpolar los valores de D.O. en la curva estándar de albúmina sérica bovina.

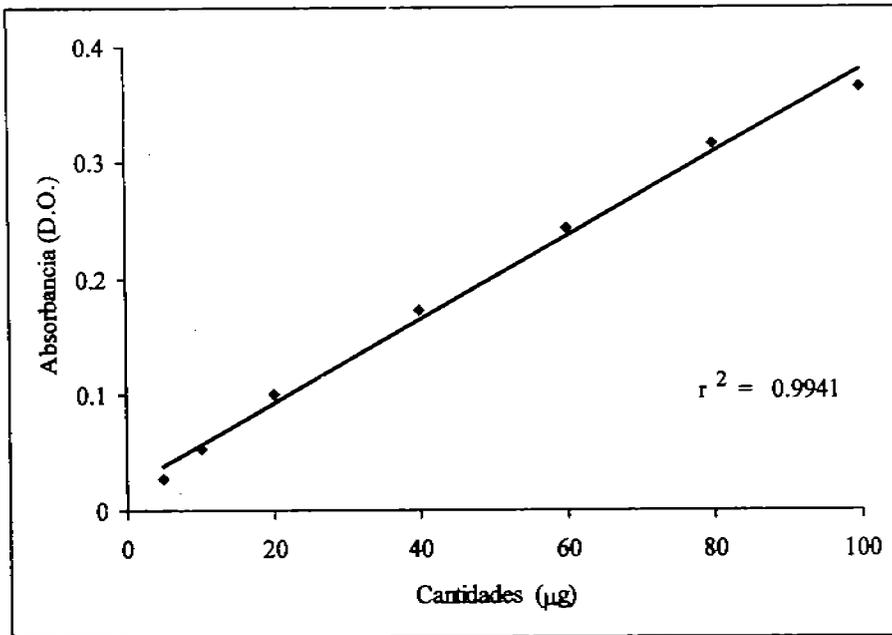


Figura 12. Curva estándar de albúmina sérica bovina de acuerdo al método de Lowry. Los valores de absorbancia determinados en las muestras problema se interpolaron en la curva estándar y así se determinó la cantidad de proteína presente en cada muestra.

7.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida

El análisis electroforético del extracto total soluble de adulto, extracto total soluble de LRN y antígenos purificados de LRN de *T. spiralis* se realizó de acuerdo al método de Laemmli (1970). El gel separador y el gel concentrador se trabajaron a un porcentaje de acrilamida de 15 y 7.5 respectivamente. Para la preparación del gel separador al 15% se mezclaron las siguientes soluciones: 4.5 mL de acrilamida/bisacrilamida al 30%-0.8%, 3.4 mL de Tris-HCl 1.5 molar (M) pH 8.8, 0.046 mL de SDS al 20%, 1 mL de H₂O desionizada, 0.005 mL de N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y 0.05 mL de persulfato de amonio al 10%; la mezcla anterior se adicionó entre los vidrios y se añadió 1 mL de isopropanol. Una vez que el gel polimerizó se lavó para eliminar el isopropanol y se agregó la mezcla del gel concentrador al 7.5% preparándose con los siguientes compuestos: 0.5 mL de acrilamida/bisacrilamida al 30%-0.8%, 0.26 mL de Tris-HCl 1 M pH 6.8, 0.01 mL de SDS al 20%, 1.22 mL de H₂O desionizada, 0.001 mL de TEMED y 0.01 mL de persulfato de amonio al 10%, inmediatamente después se procedió a colocar el peine para 10 pozos.

Después de la polimerización del gel se colocaron las muestras en amortiguador de muestra 4X y se hirvieron por 3 min, posteriormente se les añadió β-mercaptoetanol al 5% y se volvieron a hervir por 2 min más. Las muestras se colocaron en hielo y posteriormente se cargaron en el gel. Cada carril se cargó con 30 µg de proteína de cada una de las muestras. En un carril se incluyeron marcadores de peso molecular (Bio-Rad), con un rango de peso de 19 a 116 kDa.

El corrimiento se realizó en amortiguador Tris-glicina 250 mM pH 8.3, inicialmente a 120 volts y una vez que las muestras penetraron al gel separador, la separación se realizó a 150 volts. Los geles se tñeron con azul de Coomassie al 0.1% en agitación constante por 1 h y se destñeron con una solución de metanol-ácido acético (30%-10%).

7.7 Determinación de presencia de endotoxina

Para la determinación de endotoxina se utilizó un kit de E-Toxate® (Sigma®). El extracto total soluble de adulto, extracto total soluble de LRN y antígenos purificados de LRN de *T. spiralis* se usaron a concentraciones de 100 y 500 ng/mL. Las cuales se trabajaron de acuerdo a las recomendaciones realizadas por el fabricante.

7.8 Obtención y purificación de células cebadas de peritoneo de rata

Las CCPR se obtuvieron de la cavidad peritoneal de ratas no infectadas con *T. spiralis* después de una inyección con un amortiguador Hepes-Tyrode (HTB) e estéril. Para ello se anestesiaron a las ratas con éter etílico y se sacrificaron por dislocación cervical, posteriormente las ratas se colocaron con el vientre hacia arriba y se les retiró la piel de esa zona. Con ayuda de una jeringa se les inyectaron 20 mL de HTB en la cavidad peritoneal y se les aplicó un masaje suave en el vientre durante 3 min. El amortiguador se colectó y se depositó en un tubo cónico de 50 mL el cual se colocó en hielo. Los tubos se centrifugaron a 200 X g durante 5 min a 4 °C en una centrifuga Sorvall® RT 6000 D. Posteriormente el tubo se decantó y el paquete celular se resuspendió en 5 mL de HTB. Las CCPR se purificaron a través de un gradiente discontinuo de Percoll (30-80%) (Sigma®), el cual se centrifugó a 510 X g por 20 min a 4 °C en una centrifuga Sorvall®, de acuerdo al protocolo descrito por Lee y cols. (1985). Las CCPR obtenidas se lavaron con HTB por centrifugación a 200 X g por 5 min y se resuspendieron en HTB, determinándose su viabilidad y pureza con azul de Tripán al 0.4% (GIBCO BRL®) y azul de Toluidina al 0.5% (GIBCO BRL®), respectivamente. La cuantificación de las células se realizó por observación al microscopio y empleando una cámara de Neubauer.

Las CCPR se estabilizaron con 20 mL de HTB en un tubo cónico durante 2 h a 37 °C en atmósfera húmeda de CO₂ al 5%, después se procedió a realizar los ensayos de activación; estas células se usaron para determinación de histamina. En la cuantificación

de β -hexosaminidasa se adicionaron 50, 000 CCPR/ pozo en una placa de cultivo de 96 pozos (Costar), y se dejaron estabilizar en HTB durante 2 h a 37 °C en CO₂ al 5%.

7.9 Ensayos de activación de células cebadas de peritoneo de rata con antígenos del adulto y de la larva recién nacida de *Trichinella spiralis*

Las CCPR estabilizadas en el tubo cónico se lavaron con HTB y se colocaron 25, 000 células/tubo en tubos eppendorf, después se adicionaron diferentes concentraciones de las muestras. Para el extracto total soluble de adulto de *T. spiralis* estas fueron de: 1, 5, 10, 50 y 100 ng/mL, para el extracto total soluble de LRN de *T. spiralis* de: 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 30, 50 y 100 ng/mL y por último para los antígenos purificados de la LRN de *T. spiralis* de: 5, 10, 30, 50 y 100 ng/mL. Como control negativo se utilizaron CCPR sin tratamiento (espontánea) y como control positivo CCPR en presencia de ionóforo de calcio A23187 (ICa) (Sigma®) a una concentración de 1 μ M. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los tubos se incubaron a 37 °C por 30 min en atmósfera húmeda con CO₂ al 5%. Posteriormente se centrifugaron a 2, 310 X g por 5 min a 4 °C en una centrífuga Sorvall, las pastillas y los sobrenadantes se separaron, estos últimos se usaron para determinar histamina.

Las células estabilizadas en la placa de 96 pozos, se estimularon con 1, 5, 10, 30, 50 y 100 ng/mL de extracto total soluble de adulto, extracto total soluble de LRN y antígenos purificados de LRN de *T. spiralis* durante 30 min a 37 °C. Como control negativo se utilizaron CCPR sin tratamiento y como control positivo CCPR en presencia de ICa a la concentración de 1 μ M. Los ensayos controles y experimentales se realizaron por triplicado. La placa se incubó a 37 °C por 30 min en CO₂ al 5%. Posteriormente, se determinó la cantidad de β -hexosaminidasa en las células y en los sobrenadantes.

7.10 Cuantificación de histamina

La cuantificación de histamina se determinó mediante un método fluorométrico, en el cual la histamina se une al compuesto o-ptaldialdehído en medio alcalino para formar un producto fluorescente (Siraganian, 1974).

La cuantificación se realizó tanto en pastillas como sobrenadantes. Las pastillas de CCPR se resuspendieron en 200 μL de HTB, se homogeneizaron y se hirvieron durante 10 min, luego se colocaron en hielo. A los tubos de sobrenadantes y pastillas se les agregaron 20 μL de ácido tricloroacético al 25%, los tubos se agitaron y se dejaron reposar por 10 min. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugaron a 5220 X g por 10 min en una microcentrífuga 5415C (Eppendorf). En una placa de Fluoro Nunc MaxiSorp de 96 pozos, se transfirieron 190 μL de cada tubo y se agregaron 20 μL de NaOH 4 N a cada pozo y se agitó lentamente por 5 min. Después se colocaron en cada pozo 50 μL de o-ptaldialdehído (Sigma[®]) en metanol grado espectrofotométrico (Sigma[®]) a una concentración de 1.3mg/mL y se agitó lentamente durante 4 min. Posteriormente, se les agregó 26 μL de HCl 3 N y se agitó nuevamente por 15 min. La lectura se realizó en un espectrofotómetro Fluoroskan Ascent FL (Labsystems), usando un juego de filtros de emisión (460 nm) y de excitación (355 nm). Los porcentajes de histamina liberada se calcularon de la siguiente manera:

$$\% \text{ de histamina liberada} = \frac{\text{D.O. del sobrenadante}}{\text{D.O. del sobrenadante} + \text{D.O. de la pastilla}} \times 100$$

7.11 Cuantificación de β -hexosaminidasa

La liberación de β -hexosaminidasa se cuantificó mediante la actividad de esta enzima sobre su sustrato, la actividad de esta enzima fue cuantificada por la liberación de p-nitrofenol, el cual es liberado del sustrato (Schwartz, 1979).

Una vez transcurrido el tiempo de estimulación se tomaron 20 μ L de los sobrenadantes, se retiró el sobrenadante y las pastillas se lisaron con tritón X-100 0.5% en HTB. Los 20 μ L de sobrenadantes y pastillas se colocaron en una placa de ELISA de 96 pozos (Costar) y se adicionaron 50 μ L de sustrato de la enzima, el p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida (Sigma®). La microplaca se incubó a 37 °C durante 90 min y la reacción se detuvo adicionando 150 μ L de glicina 0.2 M a pH 10.7. Las lecturas se realizaron a 405 nm en un lector de placas de ELISA marca Multiskan Ascent (LabSystems). El porcentaje de liberación de β -hexosaminidasa se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de } \beta\text{-hexosaminidasa liberada} = \frac{\text{D.O. del sobrenadante}}{\text{D.O. del sobrenadante} + \text{D.O. de la pastilla}} \times 100$$

8. RESULTADOS

8.1 Análisis electroforético del extracto total soluble de adulto de *Trichinella spiralis*

El extracto total soluble de adulto de *T. spiralis* obtenido de acuerdo con lo descrito en la sección de materiales y métodos, se analizó en geles de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS. En el gel se observan aproximadamente 34 bandas, con pesos moleculares de 13 a 138 kDa (Figura 13).

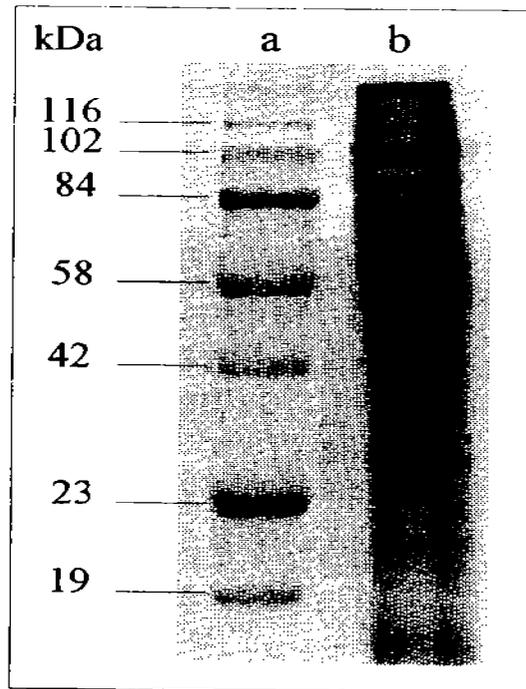


Figura 13. Análisis electroforético del extracto total soluble de adulto de *Trichinella spiralis*. Carril a: marcadores estándar de peso molecular; carril b: extracto total soluble de adulto.

8.2 Análisis electroforético del extracto total soluble y de los antígenos purificados de la larva recién nacida de *Trichinella spiralis*

El extracto total soluble obtenido de acuerdo con lo descrito en la sección de materiales y métodos, se analizaron en geles de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS. En el extracto total soluble de LRN de *T. spiralis* se observan 23 proteínas con pesos moleculares de 22 a 138 kDa (Figura 14, carril b). De la misma forma, los antígenos purificados de la LRN empleando el anticuerpo monoclonal CE-4 se analizaron en geles de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS. En la figura 14 carril c se muestran los antígenos purificados de la LRN de *T. spiralis*; se observan 10 proteínas con pesos moleculares de 104, 99, 95, 91, 80, 76, 74, 65, 39 y 36 kDa.

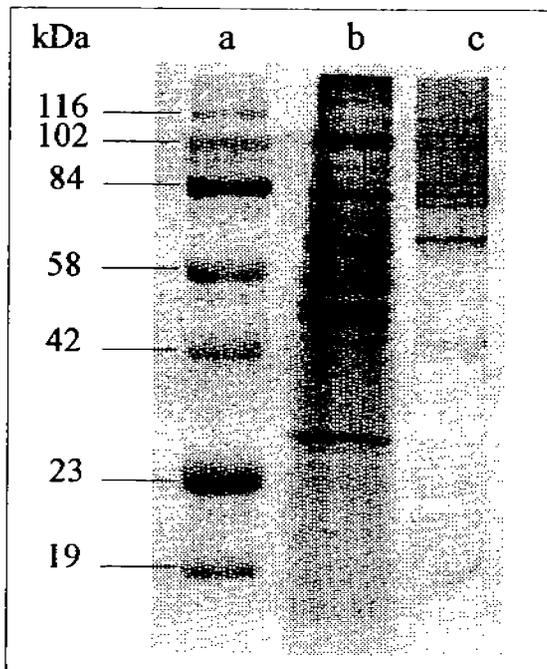


Figura 14. Análisis electroforético del extracto total soluble y de los antígenos purificados de la LRN de *Trichinella spiralis*. Carril a: marcadores estándar de peso molecular; carril b: extracto total soluble de LRN; carril c: antígenos purificados de LRN.

8.3 Determinación de presencia de endotoxina

La determinación de endotoxina en el extracto total soluble de adulto, extracto total soluble de LRN y antígenos purificados de LRN de *T. spiralis*, se realizó usando el kit de E-Toxate® (Sigma®). Los resultados obtenidos en esta prueba fueron menores de 0.03 UE/mL en las tres preparaciones antigénicas, dicho valor se considera como negativo para la presencia de endotoxina.

8.4 Obtención y purificación de células cebadas de peritoneo de rata

Para la obtención y purificación de las CCPR se emplearon gradientes de percoll (30%-80%). En promedio se obtuvieron 1.5×10^6 CCPR/rata, con alto grado de pureza (mayor a 98%) y viabilidad (más del 97%). Las CCPR que se obtuvieron con pureza y viabilidad menores a las señaladas no se usaron para los ensayos de activación, de la misma forma las CCPR que se veían degranuladas al microscopio no se emplearon para estos ensayos.

8.5 Cuantificación de histamina

El porcentaje de histamina liberada por las CCPR se determinó mediante un método fluorométrico, los resultados obtenidos se analizaron empleando la prueba *t de student* con un intervalo de confianza de 0.5 con el objetivo de establecer posibles diferencias estadísticas entre ellos.

Los resultados obtenidos en los ensayos de activación de CCPR empleando extracto total soluble de adulto de *T. spiralis* se muestran en la figura 15, éstos representan los valores promedio de 3 experimentos realizados por triplicado cada uno. En promedio el porcentaje de liberación de histamina obtenido para el control negativo (CCPR no estimuladas, liberación espontánea) fue de 7 y para el control positivo (CCPR estimuladas con ICa $1 \mu\text{M}$) el porcentaje de histamina liberada fue de 69%, mientras que

en las CCPR estimuladas con el extracto total soluble de adulto de *T. spiralis* a las concentraciones de 1, 5, 10, 50 y 100 ng/mL, el porcentaje de liberación de histamina fue de 38, 29, 39, 22 y 36 respectivamente. Todas las concentraciones ensayadas presentan diferencia significativa con respecto al control negativo y al control positivo. No existen diferencias estadísticamente significativas a las concentraciones de 1, 5, 10 y 100 ng/mL. La menor liberación de histamina fue obtenida a 50 ng/mL, la cual presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto a las demás concentraciones, excepto con la de 5 ng/mL.

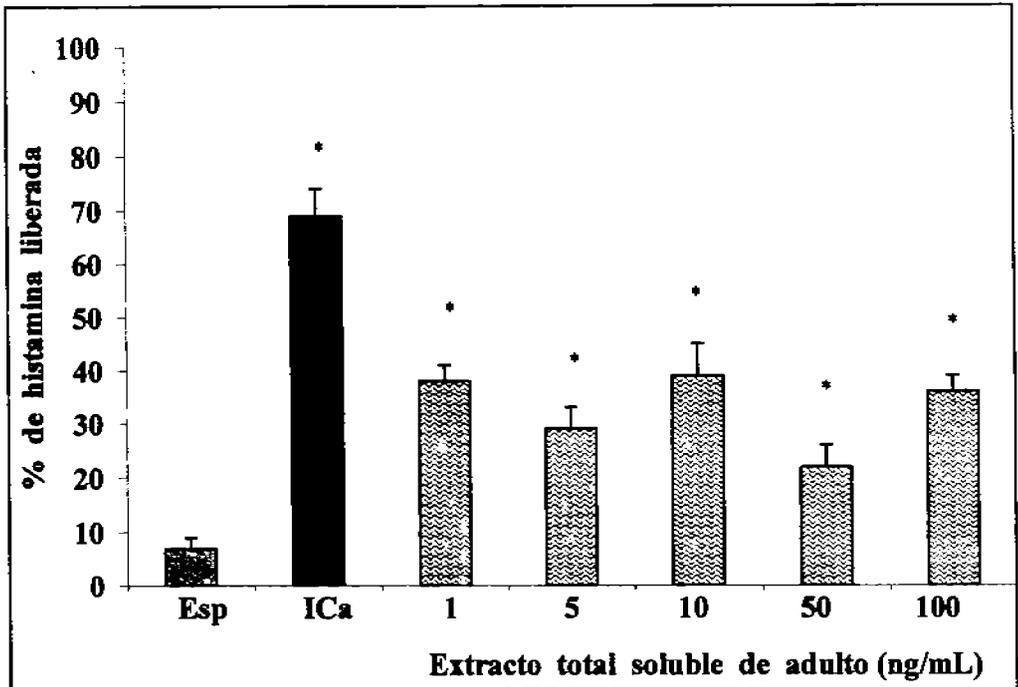


Figura 15. Determinación de los porcentajes de histamina liberada por CCPR activadas con extracto total soluble de adulto de *Trichinella spiralis*. Las CCPR se estimularon con extracto total soluble a las concentraciones indicadas. Como control positivo se incluyeron CCPR estimuladas con ICa (A23187) y como control negativo CCPR no estimuladas (Esp= espontánea). Los porcentajes de histamina liberada son el promedio \pm SD de tres experimentos independientes hechos por triplicado. * Diferencia estadística con respecto al control negativo ($P \leq 0.05$).

En la figura 16 se muestran los resultados de histamina liberada de CCPR estimuladas con extracto total soluble de LRN de *T. spiralis*. La liberación espontánea de histamina fue de 4 % y de 82% cuando se empleó el ICa. La histamina liberada de CCPR fue de 5% a la concentración de 100 ng/mL, para 10 ng/mL se obtuvo de 4%, mientras que a las concentraciones de 0.1, 0.5, 1, 5, 30 y 50 ng/mL el porcentaje obtenido fue de 3%. Sin embargo el análisis estadístico de los porcentajes de liberación obtenidos no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo; esto indica que las CCPR no liberaron histamina en presencia de extracto total soluble de LRN.

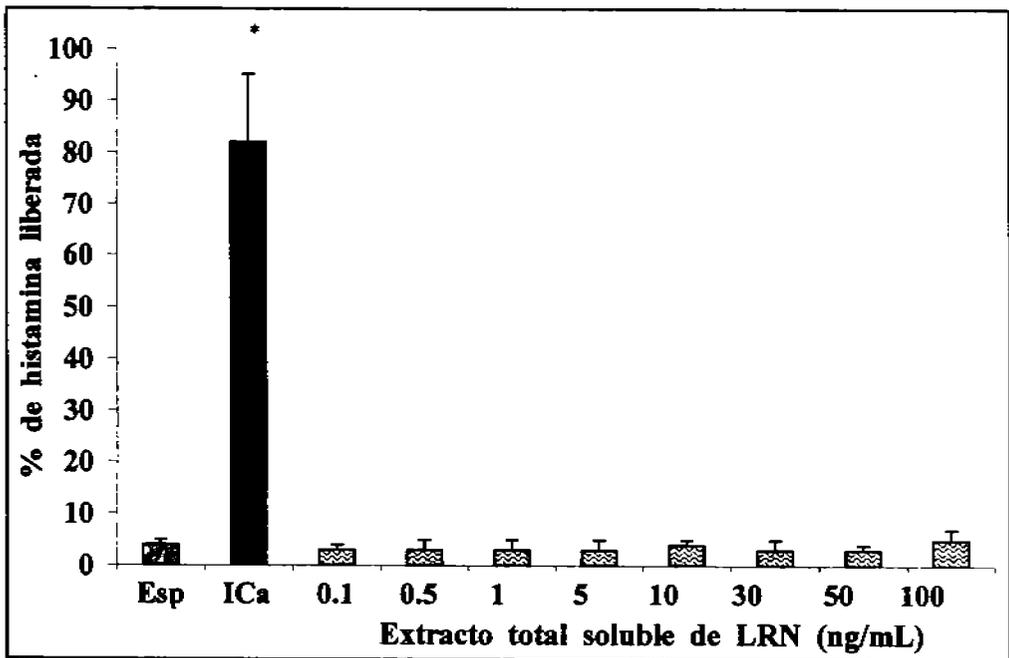


Figura 16. Determinación de los porcentajes de histamina liberada por CCPR activadas con extracto total soluble de LRN de *Trichinella spiralis*. Las CCPR se estimularon con el extracto total soluble a las concentraciones indicadas. Como control positivo se incluyeron CCPR estimuladas con ICa (A23187) y como control negativo CCPR no estimuladas (Esp= espontánea). Los porcentajes de histamina liberada son el promedio \pm SD de tres experimentos independientes hechos por triplicado. *Diferencia estadística con respecto al control negativo ($P \leq 0.05$).

Los resultados de porcentajes de histamina liberada de CCPR estimuladas con antígenos purificados de LRN de *T. spiralis*, se muestran en la figura 17. Se obtuvieron porcentajes de liberación de histamina de 3% y 80% para el control negativo y para el control positivo, respectivamente. En cuanto a las CCPR tratadas con antígenos purificados de LRN de *T. spiralis* a las concentraciones usadas, los resultados obtenidos son similares a los CCPR tratadas con extracto total soluble de LRN. De la misma manera los porcentajes de liberación de histamina obtenidos no muestran diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo.

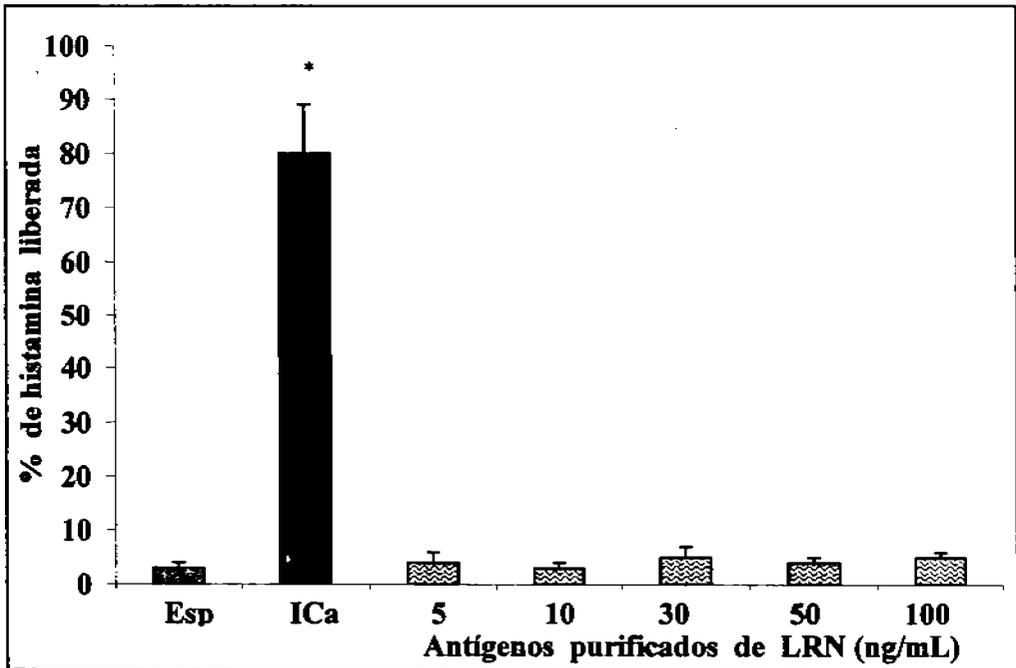


Figura 17. Determinación de los porcentajes de histamina liberada por CCPR activadas con antígenos purificados de LRN de *Trichinella spiralis*. Las CCPR se estimularon con los antígenos purificados a las concentraciones indicadas. Como control positivo se incluyeron CCPR estimuladas con ICa (A23187) y como control negativo CCPR no estimuladas (Esp= espontánea). Los porcentajes de histamina liberada son el promedio \pm SD de tres experimentos independientes hechos por triplicado. *Diferencia estadística con respecto al control negativo ($P \leq 0.05$).

8.6 Cuantificación de β -hexosaminidasa

Los porcentajes de liberación de β -hexosaminidasa en presencia de extracto total soluble de adulto de *T. spiralis*, se muestran en la figura 18. Para el control negativo y positivo se obtuvieron porcentajes de β -hexosaminidasa liberada de 6 y 30 respectivamente; y de 9, 7, 8, 8 y 9 % para las concentraciones de 1, 5, 10, 30, 50 y 100 ng/mL de extracto total soluble de adulto. No existen diferencias estadísticamente significativas entre el control negativo y los resultados obtenidos con el extracto total soluble de adulto, ni tampoco entre las diferentes concentraciones de extracto total soluble de adulto analizadas.

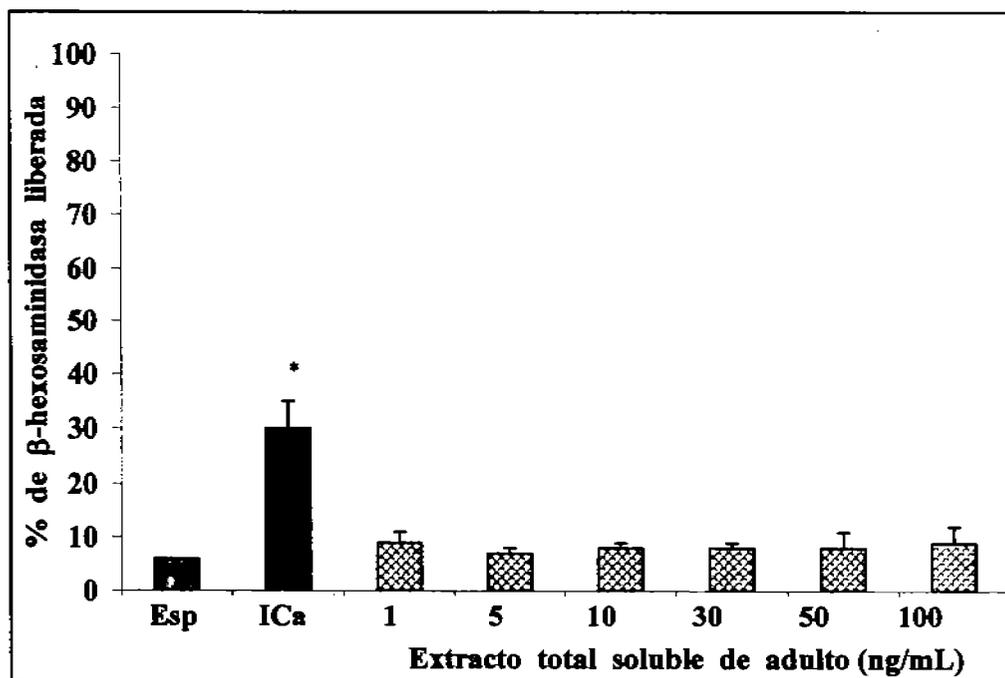


Figura 18. Determinación de los porcentajes de β -hexosaminidasa liberada por CCPR activadas con extracto total soluble de adulto de *Trichinella spiralis*. Las CCPR se estimularon con el extracto total soluble a las concentraciones indicadas. Como control positivo se incluyeron CCPR estimuladas con ICa (A23187) y como control negativo CCPR no estimuladas (Esp= espontánea). Los porcentajes de β -hexosaminidasa liberada son el promedio \pm SD de tres experimentos independientes hechos por triplicado. *Diferencia estadística con respecto al control negativo ($P < 0.05$).

En la figura 19 se muestran los resultados obtenidos sobre el porcentaje de liberación de β -hexosaminidasa de CCPR estimuladas con extracto total soluble de LRN de *T. spiralis*, en los ensayos se obtuvieron 8 y 45% de liberación de β -hexosaminidasa para el control negativo y positivo, respectivamente. Para el extracto total soluble de LRN a las concentraciones de 1, 5, 10, 30, 50 y 100 ng/mL se obtuvieron porcentajes de 8, 9, 8, 11, 12 y 12 respectivamente. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en estos resultados con respecto al control negativo, ni entre las distintas concentraciones de extracto total soluble de LRN analizadas.

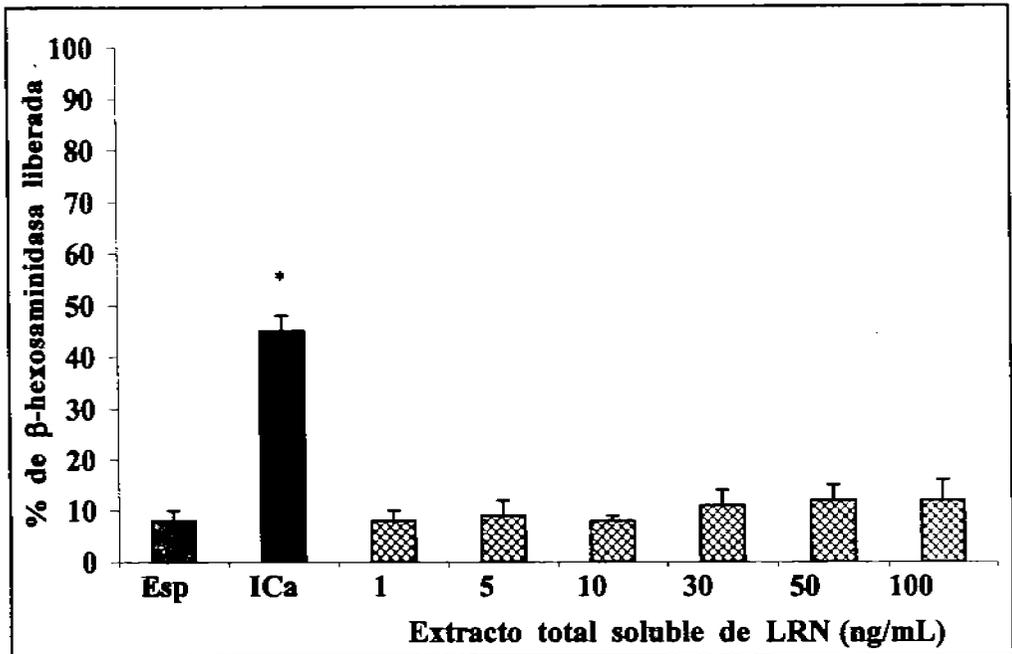


Figura 19. Determinación de los porcentajes de β -hexosaminidasa liberada por CCPR activadas con extracto total soluble de LRN de *Trichinella spiralis*. Las CCPR se estimularon con el extracto total soluble a las concentraciones indicadas. Como control positivo se incluyeron CCPR estimuladas con ICa (A23187) y como control negativo CCPR no estimuladas (Esp= espontánea). Los porcentajes de β -hexosaminidasa liberada son el promedio \pm SD de tres experimentos independientes hechos por triplicado. *Diferencia estadística con respecto al control negativo ($P \leq 0.05$).

Los resultados de porcentajes de liberación de β -hexosaminidasa de CCPR inducidos por la presencia de antígenos purificados de LRN de *T. spiralis* se muestran en la figura 20, para el control negativo se obtuvo un porcentaje de 8 y para el control positivo de 45; por otra parte en presencia de concentraciones de 1, 5, 10, 30, 50 y 100 ng/mL de antígenos purificados de LRN, se liberó 8, 7, 8, 7, 11 y 10% de β -hexosaminidasa. Estos resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control.

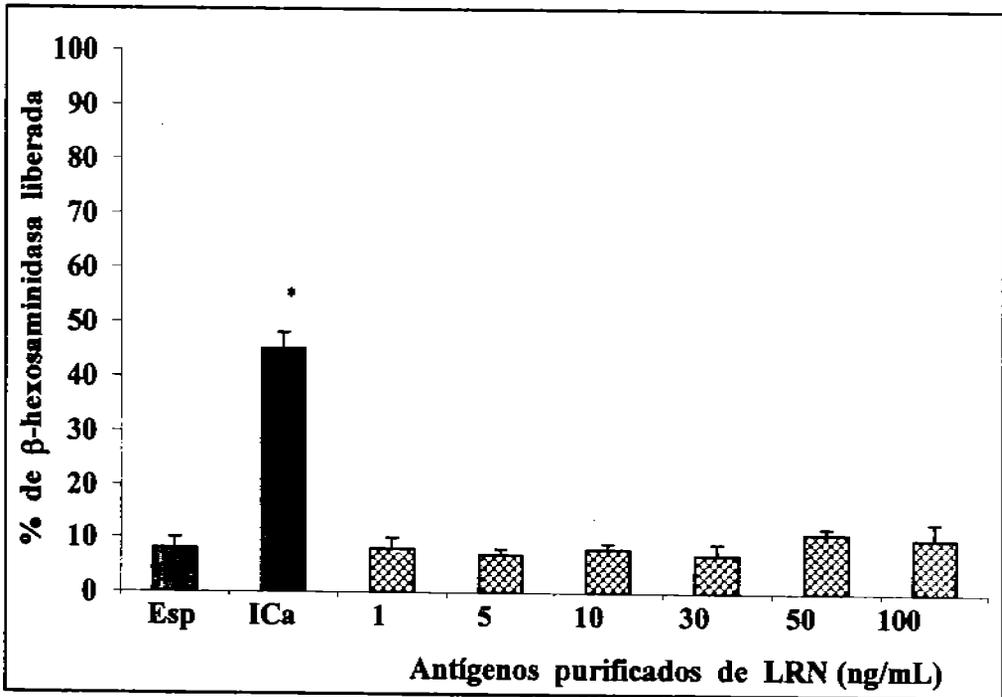


Figura 20. Determinación de los porcentajes de β -hexosaminidasa liberada por CCPR activadas con antígenos purificados de LRN de *Trichinella spiralis*. Las CCPR se estimularon con los antígenos purificados a las concentraciones indicadas. Como control positivo se incluyeron CCPR estimuladas con ICa (A23187) y como control negativo CCPR no estimuladas (Esp= espontánea). Los porcentajes de β -hexosaminidasa liberada son el promedio \pm SD de tres experimentos independientes hechos por triplicado. *Diferencia estadística con respecto al control negativo ($P \leq 0.05$).

9.- DISCUSIÓN

En infecciones producidas por *T. spiralis*, se ha sugerido que las CC son activadas provocando la liberación de una gran cantidad de moléculas contenidas en sus gránulos. Estos mediadores liberados por CC pueden participar en la inducción de mecanismos que son responsables de la expulsión del parásito. Esto puede ser por el incremento del peristaltismo, por el aumento de la permeabilidad vascular del intestino y por la elevación de la secreción de mucina (Ishikama, 1997; Vallance y cols., 1998; McDermott y cols., 2003). El incremento de la permeabilidad vascular de la mucosa del intestino puede permitir que moléculas de linfa y plasma tengan acceso al lumen intestinal, donde pueden dañar al parásito. Por otra parte también puede facilitar el paso de antígenos del parásito a través del epitelio intestinal, promoviendo el desarrollo de una respuesta inmune.

En 1997 Grecis demostró que las CC participan en el proceso de expulsión del adulto de *T. spiralis* de manera independiente de IgE. Sin embargo, en estos estudios no se identificaron antígenos del parásito que pudieran estar induciendo esta activación. Recientemente se han reportado estudios que indican que la activación directa de CC independiente de IgE puede ocurrir por interacción con bacterias gram negativas, antígenos bacterianos, así como con protozoarios y antígenos de estos y en ésta ocurre la liberación de histamina y/o TNF (Ben-Rashed y cols., 2003; Muñoz y cols., 2003; Malaviya y cols., 2004). Con respecto a *T. spiralis*, se ha demostrado que antígenos específicos de la LM de *T. spiralis* (TSL-1) son capaces de estimular a las CC mediante un mecanismo independiente de inmunoglobulinas. Como resultado de esta activación las CC liberan histamina, TNF, IL-4 y proteasas. En base a estos resultados se ha sugerido que las CC pueden participar en la regulación de la respuesta tipo Th2 que se observa durante la infección con *T. spiralis*, a través de la producción de IL-4 y también

en la enteropatía mediante la liberación de TNF- α . Estos datos apoyan el hecho de que las CC puedan participar en la respuesta inmune innata contra *T. spiralis* en la fase temprana de la infección (Arizmendi y cols., 1997; Niborski y cols., 2004).

Sin embargo, recientemente se demostró que en una infección experimental con *T. spiralis* en ratones deficientes en IgE, la ausencia de esta inmunoglobulina no afectó la hiperplasia de CC pero se recuperó mayor cantidad de adultos en comparación con ratones normales, sugiriéndose que la IgE promueve la expulsión del parásito (Gurish y cols., 2004).

Es muy importante señalar o enfatizar que en infecciones experimentales con *T. spiralis* se ha observado que existe una correlación entre la cantidad de histamina presente en tejido intestinal y la expulsión del parásito (Hegazy., 1998). De acuerdo a esto se sabe que la histamina participa en varias acciones fisiológicas: influencia la motilidad intestinal, el transporte de electrolitos y la permeabilidad microvascular; además de que disminuye la fecundidad de las hembras adultas de *T. spiralis* (Konturek y Siebers, 1980; Mortillaro y cols., 1981; Cooke y cols., 1984; Stewart y cols., 1985). En este trabajo por primera vez demostramos la liberación de histamina de CCPR estimuladas por antígenos de la fase adulta del parásito, la cual como se mencionó anteriormente puede influenciar la inducción de mecanismos que participan en la expulsión del adulto de *T. spiralis*.

Uno de los aspectos que llama la atención en los resultados obtenidos en este trabajo es el hecho de que las CCPR activadas con antígenos del adulto de *T. spiralis* liberaron histamina pero no β -hexosaminidasa. En este contexto, se ha reportado que existen varios patrones de liberación de moléculas contenidas en los gránulos de las CC. Así, por ejemplo, se sabe que la liberación de serotonina ocurre sin histamina y sin degranulación

(Kops y cols., 1990), que la toxina A de *Clostridium difficile* no induce la liberación de histamina de CCPR pero si la liberación de TNF- α . Así mismo se ha reportado que la toxina de *C. difficile* causa una liberación significativa de TNF- α , mientras que la toxina del cólera aumenta la producción de IL-6 en CC, pero inhibe la producción de TNF- α (Leal-Berumen y cols., 1996; Calderon y cols., 1998). Por otro lado, se ha observado que el lipopolisacárido de enterobacterias induce una expresión considerable de IL-6 en CC, pero previo a esto no hubo degranulación ni liberación de histamina (Leal-Berumen y cols., 1994).

En cuanto a la liberación de histamina y β -hexosaminidasa por las CC en estímulos dependientes de IgE, se ha reportado que se liberan de la CC en paralelo después de su activación pero una pequeña cantidad de la enzima se localiza en lisosomas secundarios que no son secretados con un estímulo convencional (Schwartz y cols., 1979). Sin embargo, los resultados obtenidos con antígenos de adulto de *T. spiralis* muestran que la liberación de β -hexosaminidasa por CC no ocurrió conjuntamente con la de histamina, y coinciden con reportes empleando estímulos no inmunológicos, sugiriéndose que la liberación de estos compuestos se lleva a cabo por mecanismos diferentes (Xiong y Rodgers., 1997; Alexandrakis y cols., 2003).

Respecto a lo anterior, se sabe que la liberación de moléculas de las CC se lleva a cabo mediante exocitosis, sin embargo Dvorak (1992) identificó una nueva forma de secreción de moléculas en las CC y la denominó "degranulación gradual". Este modo de secreción ha sido descrita en CC, basófilos, y eosinófilos, y en este proceso donde hay movilización y liberación de moléculas no se ha implicado la secreción total del contenido de los gránulos de la célula (proceso característico de la exocitosis), además de que se retiene la membrana de los gránulos adentro del citoplasma en forma de una

cámara vacía. Este proceso depende más bien del intercambio de pequeñas vesículas. En diversos estudios *in vivo* se ha reportado que la secreción de histamina de CC se produce mediante degranulación gradual (Dvorak y cols., 1995; Dvorak y Morgan, 1997), y es posible que este mismo fenómeno pueda ocurrir con las CCPR activadas con antígenos del adulto de *T. spiralis*, lo cual podría explicar porque sólo se liberó histamina y no β -hexosaminidasa.

Por lo tanto, la liberación de moléculas proinflamatorias de las CC, depende de la naturaleza y potencia del estímulo, por lo que sería muy interesante investigar el mecanismo por el cual se induce la activación de CCPR por el extracto total soluble de adulto de *T. spiralis*.

En este trabajo también tuvimos interés en determinar si antígenos totales y/o purificados de LRN de *T. spiralis* podrían a su vez activar directamente a las CC, teniendo en cuenta que en los tejidos a través de los que migran, se encuentran presentes las CC.

Para ello se empleó un anticuerpo monoclonal dirigido contra la LRN que al emplearlo en cromatografía de afinidad se purificaron alrededor de 10 antígenos, probablemente el epitopo que reconoce este anticuerpo monoclonal sea un carbohidrato. A este respecto existen evidencias de que el carbohidrato tivelosa presente en los componentes TSL-1 de la LM es el epitopo responsable de la inmunodominancia de estos antígenos (Wisnewski y cols., 1993; Appleton y Romaris, 2001). Además se ha descrito que los anticuerpos dirigidos contra antígenos de superficie de la LRN presentes en sueros de individuos con triquinosis crónica, reconocen determinantes antigénicos de los productos de E/S de la LM, los cuales son glicoproteínas (Venturiello y cols., 2000). Sin embargo, se ha descrito que la reactividad cruzada entre productos de E/S de la LM y la superficie de la LRN, es un fenómeno dado principalmente por epitopos proteícos (Malmassari y cols., 2003).

Cuando las CCPR fueron estimuladas con el extracto total soluble y/o antígenos purificados de la LRN, no se detectó liberación de histamina ni de β -hexosaminidasa, sugiriendo que probablemente no sean fundamentales en la respuesta hacia esta fase de desarrollo de *T. spiralis*. Existen amplias evidencias que indican que los eosinófilos y otras células como neutrófilos y monocitos son los principales efectores que participan en la destrucción de la LRN mediante un mecanismo de ADCC (Ortega-Pierres y cols., 1984; Venturiello y cols., 1993; Venturiello y cols., 1995; Moskwa, 1999). Por otro lado, en infecciones con *T. spiralis* el tiempo de exposición de la LRN a las CC durante su desplazamiento del intestino delgado al músculo esquelético es relativamente corto (Wang y Bell, 1986), por lo que la interacción de este estadio con CC podría ser menor, en contraste con los adultos de *T. spiralis* que permanecen en el intestino delgado de roedores durante 1 a 3 semanas. Así, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que las CC no son estimuladas en cuanto a la liberación de histamina y β -hexosaminidasa por los antígenos de LRN de *T. spiralis*.

Los resultados obtenidos en este trabajo aportan información importante de la participación de las CC en una respuesta inmune innata dirigida contra el organismo adulto de *T. spiralis*. Es probable que la activación de CC por antígenos del adulto junto con la demostrada recientemente por antígenos de la LM sean responsables de los mecanismos que derivan en la expulsión del parásito adulto.

Considerando estas observaciones resulta muy importante definir que componentes del parásito adulto son los responsables de la activación de CC. Estos al igual que los antígenos de la LM pueden ser candidatos para emplearlos en el desarrollo de estrategias inmunoproliféricas para el control de esta parasitosis.

10.- CONCLUSIONES

- 1) Las CCPR no sensibilizadas estimuladas *in vitro* con el extracto total soluble de adulto de *T. spiralis* liberan histamina pero no β -hexosaminidasa mediante un mecanismo independiente de IgE.
- 2) La activación directa de CC por antígenos de adulto de *T. spiralis* puede contribuir en los mecanismos de respuesta inmune innata inducida por la infección con este parásito.
- 3) El extracto total soluble de LRN y los antígenos purificados de LRN de *T. spiralis* no inducen la liberación de histamina ni de β -hexosaminidasa de CCPR por un mecanismo independiente de IgE.

11. BIBLIOGRAFIA

1. Abbas A. K. y Lichtman A. H. 2004. Inmunología celular y molecular. 5ta. Ed. Elsevier. España. pp. 325-326.
2. Abraham S. N. and Malaviya R. 1997. Mast cells in infection and immunity. *Infect. Immun.* 65: 3501-3508.
3. Alexandrakis M., Letourneau R., Kempuraj D., Kandere-Grzybowska K., Huang M., Chistodoulou S., Boucher W., Seretakis D. and Theoharides T. C. 2003. Flavones inhibit proliferation and increase mediator content in human leukemic mast cells (HMC-1). *Eur. J. Haematol.* 71: 448-454.
4. Álvarez-Chacón R., Riega-Carnero R. E., García-Rosales J. J., Wong-Chío M. y Cob-Sosa C. E. 1992. Triquinosis en el niño. Informe de 8 casos. *Bol. Med. Hosp. Infan. Méx.* 49: 286-290.
5. Appleton J. A., Bell R. G., Homan W. and Van Knapen F. 1991. Consensus on *Trichinella spiralis* antigens and antibodies. *Parasitol. Today.* 7: 190-192.
6. Appleton J. A. and Romaris F. 2001. A pivotal role for glycans at the interface between *Trichinella spiralis* and its host. *Vet. Parasitol.* 101: 249-260.
7. Arizmendi N., Casas O., Yépez-Mulia L., Cedillo R., Ortega-Pierres M. G., Muñoz O., Befus D. and Enciso-Moreno J. A. 1997. Activation of mast cells by *Trichinella spiralis* antigens through an IgE independent mechanism. *Trichinellosis Proceedings of the 9th International Conference on Trichinellosis.* Mexico City. pp. 397-403.
8. 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: S114-116.
9. Arok M., Ross E. A., Lai-Kuen R., Averlant G., Gao Z., and Abraham S. N. 1998. Phagocytic and tumor necrosis factor α response of human mast cells following exposure to gram negative and gram positive bacteria. *Infect. Immun.* 66: 6030-6034.
10. Befus A. D. 1994. Inflammation: mast cells. *Handbook of mucosal immunology.* Academic Press, Inc. New York. pp: 307-314.
11. Befus A. D. 1996. Mast cell heterogeneity and functions in mucosal defenses and pathogenesis. In: *Essentials of mucosal immunology.* (Kagnoff M. and Kiyono H., Ed.), Academic Press, Inc. New York. pp: 341-354.
12. Bell R. G. and McGregor D. D. 1979. *Trichinella spiralis*: role of different life cycle phases in induction, maintenance, and expression of rapid expulsion in rats. *Exp. Parasitol.* 48: 51-60.
13. Bell R. G., Wang C. H. and Ogden R. W. 1985. *Trichinella spiralis*: nonspecific resistance and immunity to newborn larvae in inbred mice. *Exp. Parasitol.* 60: 101-110.

14. Ben-Rashed M., Ingram G. A. and Pentreath V. W. 2003. Mast cells, histamine and the pathogenesis of intestinal damage in experimental *Trypanosoma brucei brucei* infections. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 97: 803-809.
15. Calderon G. M., Torres-Lopez J., Lin T. J., Chavez B., Hernandez 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: 2755-2761.
16. Campbell W.C. 1983. Historical introduction. *Trichinella* and trichinosis. In: W. C. Campbell (Ed.), Plenum Press, New York and London, pp 1-30.
17. Capo V. and Despommier D. D. 1996. Clinical Aspects of Infection with *Trichinella* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 9: 47-54.
18. Chapa-Ruiz M. R. Gonzalez-Pantaleon D., Morales-Galan A., Contreras-Ramos A., Salinas-Tobon M. R. and Martinez-Zamora R. 2001. A follow-up study of the human class and subclass antibody response developed against adult stage of *Trichinella spiralis*. *Parasite.* 8: S163-S167.
19. Cooke H. J., Nemeth P. R. and Wood J. D. 1984. Histamine action on guinea pig ileal mucosa. *Am. J. Physiol.* 246: G372-G377.
20. Dennis D. T., Despommier D. D. and Davis N. 1970. Infectivity of the newborn larvae of *Trichinella spiralis* in the rat. *J. Parasitol.* 56: 974-977.
21. Despommier D. D. 1983. Biology. *Trichinella* and trichinosis. In: W. C. Campbell (Ed.), Plenum Press, New York and London, pp. 75-151.
22. Despommier D. D. 1990. *Trichinella spiralis*: the worm that would be virus. *Parasitol Today.* 6: 193-196.
23. Despommier D. D., Gwadz R. W., Hotez P. J. and Knirsch C. A. 2000. Parasitic Diseases. Fourth Edition. Apple Trees Productions LLC. New York. pp. 125-132.
24. Dupouy-Camet J. 2000. Trichinellosis: a worldwide zoonosis. *Vet. Parasitol.* 93: 191-200.
25. 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: 169-271.
26. Dvorak A. M., Morgan E. S., Monahan-Earley R. A., Estrella P., Schleimer R. P. Weller P. F., Tepper R. I. Lichtenstein L. M. and Galli S. J. 1995. Analysis of mast cell activation using diamine oxidase-gold enzyme-affinity ultrastructural cytochemistry. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107: 87-89.
27. Dvorak A. M. and Morgan E. S. 1997. Diamine oxidase-gold enzyme-affinity ultrastructural demonstration that human gut mucosal mast cells secrete histamine by piecemeal degranulation in vivo. *J. Allergy Clin. Immunol.* 99: 812-820.

28. Féger 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.* 23: 151-158.
29. Frandji P., Tkaczyk C., Oskeritzian B., David B., Desaymard C. and Mecheri S. 1996. Exogenous and endogenous antigens are differentially presented by mast cells to CD4+ T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 26: 2517-2528.
30. Gaboury J. P., Johnston B., Niu X. F. and Kubes P. 1995. Mechanisms underlying acute mast-cell-induced leucocyte rolling and adhesion in vivo. *J. Immunol.* 154: 804-813.
31. Gabryel P., Gustowska L. and Blotna-Filipiak M. 1995. The unique and specific transformation of muscle cell infected with *Trichinella spiralis*. *Basic. Appl. Myol.* 5: 231-238.
32. Galli S. J. 1993. New concepts about the mast cell. *N. Engl. J. Med.* 328: 257-265.
33. Garside P., Grecnis R. K. and Mowat A. M. 1992. T lymphocyte dependent enteropathy in murine *Trichinella spiralis* infection. *Parasite Immunol.* 14: 217-225.
34. Godfraind C., Louahed J., Faulkner H., Vink A., Warnier G., Grecnis R. and Renaud J. C. 1998. Intraepithelial infiltration by mast cells with both connective tissue-type and mucosal-type characteristics in gut, trachea, and kidneys of IL-9 transgenic mice *J. Immunol.* 160: 3989-3996.
35. Gonzalez-Robles A., Chavez-Munguia B., Sanchez San-Martin R., Muñiz E. and Ortega-Pierres G. 1989. *Trichinella spiralis*: ultrastructure of the body wall of newborn and muscle larvae. *Archiv. Invest. Méd. (Méx).* 20: 301-308.
36. Grecnis R. K. 1997. Th2-mediated host protective immunity to intestinal nematode infections. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 352: 1377-1384.
37. 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: 1139-1145.
38. Gutiérrez Q. M., Martínez-Barbabosa I., Alonso G. T., Fernández P. A. M., Ruiz G. L. A. y García Y. Y. 2000. Reactividad serológica a cinco antígenos de parásitos en adolescentes escolares. *Rev. Mex. Patol. Clin.* 47: 32-37.
39. Hassanain M. A., Hassanain N. A. and El-Mogazy F. M. 2004. Identification of immunoreactive proteins of *Trichinella spiralis* adult and adult excretory/secretory (E/S) antigens in sera of human and animals. *J. Egypt Soc. Parasitol.* 34: 281-295.
40. Hegazy I. H. 1998. Functional correlation between histamine metabolism and worm expulsion in *Trichinella spiralis*. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 28: 247-256.
41. 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*. *Gastroenterology.* 113: 542-549.

42. Jasmer D. P. 1990. *Trichinella spiralis*: altered expression of muscle proteins in trichinosis. *Exp. Parasitol.* 70: 452-465.
43. Jasmer D. P. 1993. *Trichinella spiralis*-infected skeletal muscle cells arrest in G2/M and cease muscle gene expression. *J. Cell. Biol.* 21: 785-793.
44. Jungery M., Clark N. W. T. and Parkhouse R. M. E. 1983. A major change in surface antigens during the maturation of newborn larvae of *Trichinella spiralis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 7: 101-109.
45. Kapeller-Adler R. 1965. Histamine catabolism in vitro and in vivo. *Fed. Proc.* 24: 757-765.
46. Knight P.A., Wright S. H., Lawrence C. E., Paterson Y. Y. 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: 1849-1856.
47. Kocięcka W., Gustowska L. and Błotna-Filipiak M. 1985. Evaluation of jejunal mucosa biopsy in patients with giardiasis, taeniarhynchosis and trichinellosis. In: *Proceedings of the Xth European Congress of Pathology, on Pathology Research and Practice 18/3.* Athens, Greece, pp 285-286.
48. Kocięcka W. 2000. Trichinellosis: human disease, diagnosis and treatment. *Vet. Parasitol.* 93: 365-383.
49. Konturek S. J. and Siebers R. 1980. Role of histamine H1- and H2-receptors in myoelectric activity of small bowel in dog. *Am J. Physiol.* 238: G50-G56.
50. Kops S. K., Theoharides T. C., Cronin C. T., Kashgarian M. G. and Askenase P. W. 1990. Ultrastructural characteristics of rat peritoneal mast cells undergoing differential release of serotonin without histamine and without degranulation. *Cell. Tissue Res.* 262: 415-424.
51. Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
52. 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: 2672-2684.
53. 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: 4229-4234.
54. 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: 155-165.
55. Leal-Berumen I., Conlon P. and Marshall J. S. 1994. IL-6 production by rat peritoneal mast cells is not necessarily preceded by histamine release and can be induced by bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 152: 5468-5476.

56. Leal-Berumen I., Snider D. P., Barajas-Lopez C. and Marshall J. S. 1996. Cholera toxin increases IL-6 synthesis and decreases TNF-alpha production by rat peritoneal mast cell. *J. Immunol.* 156: 316-321.
57. Lee T. D. G. and Befus D. 1989. Effects of rat and human intestinal lamina propria cells on viability and muscle establishment of *Trichinella spiralis* newborn larvae. *J. Parasitol.* 75: 124-128.
58. Lee T. D. J., Shanahan F., Miller H., Bienenstock J. and Befus A. D. 1985. Intestinal mucosal mast cell: isolation from rat lamina propia and purification using unit gravity velocity sedimentation. *Immunol.* 55: 721-728.
59. Levine N. D. 1980. Introduction to the nematode. In nematode parasites of domestic animals and of man. 2nd. ed. (Ed N. D. Levine). Minneapolis. Burgess Publishing Company. pp 1-55.
60. Lowry, O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
61. Lukacs N. W., Strieter R. M., Chensue S. W. and Kunkel S. L. 1996. Activation and regulation of chemokines in allergy airway inflammation. *J. Leukocyte Biol.* 59: 13-17.
62. Mahannop P., Setasuban P., Morakote N., Tapchaisri P. and Chaicumpa W. 1995. Immunodiagnosis of human trichinellosis and identification of specific antigen for *Trichinella spiralis*. *Int. J. Parasitol.* 25: 87-94.
63. Maizels R. M. and Holland M. J. 1998. Parasite immunity: pathways for expelling intestinal helminths. *Curr. Biol.* 8: R711-R714.
64. Malaviya R. and Abraham S. N. 1998. Clinical implications of mast cell-bacteria interaction. *J. Mol. Med.* 76: 617-623.
65. Malaviya R. E., Ikeda T., Ross E. and Abraham S. N. 1996a. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- α . *Nature.* 381: 77-80.
66. Malaviya R. E., Twesten N. J., Ross E. A., Abraham S. N. and Pfeifer J. D. 1996b. Mast cells process bacterial Ags through a phagocytic route for class I MHC presentation to T cells. *J. Immunol.* 156: 1490-1496.
67. Malaviya R., Ikeda T. Abraham S. N. and Malaviya R. 2004. Contribution of mast cells to bacterial clearance and their proliferation during experimental cystitis induced by type 1 fimbriated *E. coli*. *Immunol. Lett.* 91: 103-111.
68. Malmassari S. L., Costantino S. N., Iacono R. F. and Venturiello S. M. 2003. Human serum antibodies against shared antigens of different stages of *Trichinella spiralis*: relevance of glycan and protein epitopes. *Parasitol. Res.* 91: 94-99.
69. Marti H. P. and Murrell K. D. 1986. *Trichinella spiralis*: antifecundity and antinewborn larvae immunity in swine. *Exp. Parasitol.* 62: 370 -375.

70. Martínez-Barbabosa I., Gutiérrez Q. M., Romero-Cabello R., Fernández P. A. M., Vázquez T. O., Pérez L. M. J. y Gutiérrez C. E. M. 2000. Inmunoepidemiología de la triquinosis. *Rev. Méx. Patol. Clin.* 47: 156-161.
71. Matossian R. M., Salti I. and Stephan E. 1977. Variation in serum immunoglobulin levels in acute trichinosis. *J. Helminthol.* 51: 1-4.
72. Mayrhofer G. 1984. Physiology of the intestinal immune system. In: Local immune responses in gut. Newby T. J., Stokes (Eds.). CRC Press Inc. Florida EE. UU. pp. 143-180.
73. McDermott J. R., Bartram R. E., Knight P. A., Miller H. R. P., Garrod D. R. and Grecnis R. K. 2003. Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric nematode infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 7761-7766.
74. Miller H. R. P. 1984. The protective mucosal response against gastrointestinal nematodes in ruminants and laboratory animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 6: 167-259.
75. Moqbel R, Wakelin D., MacDonald A. J., King S. J., Grecnis R. K. and Kay A. B. 1987. Release of leukotrienes during rapid expulsion of *Trichinella spiralis* from immune rats. *Immunol.* 60: 425-430.
76. Morakote N., Sukhavat K., Khamboonruang C., Siriprasert V., Suphawitayanukul S. and Thamasonthi W. 1992. Persistence of IgG, IgM, and IgE antibodies in human trichinosis. *Trop. Med. Parasitol.* 43: 167-169.
77. Mortillaro N. A., Granger D. N., Kvietys P. R. Rutili G. and Taylor A. E. 1981. Effects of histamine and histamine antagonists on intestinal capillary permeability. *Am. J. Physiol.* 240: G381-G386.
78. Moskwa B. 1999. *Trichinella spiralis*: in vitro cytotoxicity of peritoneal cells against synchronous newborn larvae of different age. *Parasitol. Res.* 85: 59-63.
79. Muñoz S., Hernández-Pando R., Abraham S. N. and Enciso J. A. 2003. Mast cell activation by *Mycobacterium tuberculosis*: mediator release and role of CD48. *J. Immunol.* 170: 5590-5596.
80. Negrão-Corrêa 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: 4037-4044.
81. Negrão-Corrêa D., Adams L. S., and Bell R. G. 1997. The dynamics of IgE production during *Trichinella spiralis* infection in rats. Quantitative significance of transport to the intestinal versus serum. *Trichinellosis Proceedings of the 9th International Conference on Trichinellosis.* Mexico City. 363-367.
82. Niborski V., Vallée I., Fonseca-Linán 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-4 and TNF through an Ig-independent pathway. *Exp. Parasitol.* 108: 101-108.

83. Nuñez G. G., Costantino S. N. and Venturiello S. M. 2003. Immunoparasitological parameters of the intestinal phase of trichinellosis in rats. *Parasitol.* 126: 321-325.
84. Ortega-Pierres G., Mackenzie C. D. and Parkhouse R. M. E. 1984. Protection against *Trichinella spiralis* induced by a monoclonal antibody that promotes killing of newborn larvae by granulocytes. *Parasite immunol.* 6 : 275-284.
85. Ortega Pierres M. G., Almond N. W. and Parkhouse R. M. 1987. Identification of biochemically defined antigens of *Trichinella spiralis* in host immunity and in diagnosis. *Wiad. Parazytol.* 33: 423-452.
86. Ortega-Pierres G., Muñiz E., Coral V. R., and Parkhouse R. M. E. 1989. Protection against *Trichinella spiralis* induced by purified stage-specific surface antigens of infective larvae. *Parasitol. Res.* 75: 563-567.
87. Ortega-Pierres G., Yépez-Mulia L., Homan W., Gamble H. R., Lim P.L., Takahashi Y., Wassom D. L. and Appleton J. A. 1996. Workshop on a detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: a platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. *Parasite Immunol.* 18: 273-284.
88. Ortega-Pierres M. G., Arriaga C. and Yépez-Mulia L. 2000. Epidemiology of trichinellosis in Mexico, Central and South America. *Vet. Parasitol.* 93: 201-225.
89. Parkhouse R. M. E. 1984. Immunopurification. *Brit. Med. Bull.* 40: 297-301.
90. Pawloski Z. S. 1983. Intestinal parasitic infections as a public health problem. *Parasitol.* 25:141-150.
91. Philipp M., Parkhouse R. M. E. and Ogilvie B. M. 1980. Changing proteins on the surface of a parasitic nematode. *Nature.* 287: 538-540.
92. Philipp M., Taylor P.M., Parkhouse R. M. E. and Ogilvie B. M. 1981. Immune response to stage-specific surface antigens of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *J. Exp. Med.* 154: 210-215.
93. Ramaswamy K., Negrao-Correa D. and Bell R. 1996. Local intestinal immune responses to infections with *Trichinella spiralis*. *J. Immunol.* 156: 4328-4337.
94. Romagnani S. 1992. Induction of Th1 and Th2 responses: a key role for the 'natural' immune response?. *Immunol. Today.* 13: 379-381.
95. Rothwell T. L. W. 1989. Immune expulsion of parasitic nematodes from the alimentary tract. *Int. J. Parasitol.* 19: 139-168.
96. Ruitenbergh E. J. and Buys J. 1986. Eosinophils and mononuclear cells as effector cells in a *Trichinella spiralis* infection. *Wiad. Parazytol.* 32: 219-231.
97. Schwartz L. B., Austen K. F. and Wasserman S. I. 1979. Immunologic release of beta-hexosaminidase and beta-glucuronidase from purified rat serosal mast cells. *J. Immunol.* 123: 1445-1450.

98. Siraganian R. P. 1974. An automated continuous-flow system for the extraction and fluorometric analysis of histamine. *Anal. Biochem.* 57: 383-394.
99. Stewart G. L. and Giannini S. H. 1982. *Sarcocystis*, *Trypanosoma*, *Toxoplasma*, *Brugia*, *Ancylostoma*, and *Trichinella* spp.: a review of the intracellular parasites of striated muscle. *Exp. Parasitol.* 53: 406-447.
100. Stewart G. L., Kramar G. W., Charniga L. and Kramar M. 1985. The effects of histamine and an antihistamine on *Trichinella spiralis* and on trichinous enteritis in the host. *Int. J. Parasitol.* 15: 327-332.
101. Tuohy M., Lammas D. A., Wakelin D., Huntley J. F., Newlands G. F. J. and Miller H. R. P. 1990. Functional correlations between mucosal mast cell activity and immunity to *Trichinella spiralis* in high and low responder mice. *Parasite Immunol.* 12: 675-685.
102. Uvnas B., Aberg C.-H. and Bergendorff A. 1970. Storage of histamine in mast cell. Evidence for ionic binding of histamine to protein carboxyls in the granule heparin protein complex. *Acta Physiol. Scand.* 336: 1-26.
103. Vallance B. A. and Collins S. M. 1998. The effect of nematode infection upon smooth muscle function. *Parasite Immunol.* 20: 249-253.
104. Vallance B. A., Blennerhassett P. A., Deng Y., Matthaei K. I., Young I. G. and Collins S. M. 1999. IL-5 contributes to worm expulsion and muscle hypercontractility in a primary *T. spiralis* infection. *Am. J. Physiol.* 277: G400-G408.
105. Van Knapen F., Franchimont J. H., Verdonk A. R., Stumpf J. and Undeutsch K. 1982. Detection of specific immunoglobulins (IgG, IgM, IgA, IgE) and total IgE levels in human trichinosis by means of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Am J. Trop. Med. Hyg.* 31: 973-976.
106. Venturiello S. M., Giambartolomei G. H. and Costantino S. N. 1993. Immune killing of newborn *Trichinella* larvae by human leucocytes. *Parasite Immunol.* 15: 559-564.
107. Venturiello S. M., Giambartolomei G. H. and Costantino S. N. 1995. Immune cytotoxic activity of human eosinophils against *Trichinella spiralis* newborn larvae. *Parasite Immunol.* 17: 555-559.
108. Venturiello S. M., Costantino S. N., Malmassari S. L., Ben G.J. M. and Nuñez G. G. 1997. Antibodies to newborn larvae of *T. spiralis* in acute and chronic human trichinellosis. *Trichinellosis Proceedings of the 9th International Conference on Trichinellosis*. México City. pp. 325-331.
109. Venturiello S. M., Malmassari S. L., Costantino S. N. and Nuñez G. G. 2000. Cytotoxicity-blocking antibodies in human chronic trichinellosis. *Parasitol. Res.* 86: 762-767.
110. Wakelin D. and Donachie A. 1983. Genetic control of eosinophilia. Mouse strain variation in response to antigens of parasite origin. *Clin Exp Immunol.* 51:239-46.

111. Wang C. H. and Bell R. G. 1986. *Trichinella spiralis*: newborn larval migration route in rats reexamined. *Exp. Parasitol.* 61: 76-85.
112. Wang C. H. and Bell R. G. 1992. Characterization of cellular and molecular immune effectors against *Trichinella spiralis* newborn larvae in vivo. *Cell. Mol. Biol.* 38: 311-325.
113. Wang C. H. 1997. Study of biological properties of *Trichinella spiralis* newborn larvae and the antiparasitic mucosal immunity of the host. *Front. Biosci.* 2: d317-330.
114. Wang C. H. 1998. Characterization of kinetics of anti-*Trichinella spiralis* newborn larvae immunity in rats. *Front. Biosci.* 3: a38-46.
115. Wasserman S. I. 1989. Mast cell-mediated inflammation in asthma. *Ann. Allergy.* 63: 546-550.
116. Wershil B. K., Murakami T. and Galli S. J. 1988. Mast cell-dependent amplification of an immunologically nonspecific inflammatory response. Mast cells are required for the full expression of cutaneous acute inflammation induced by phorbol 12-myristate 13 acetate. *J. Immunol.* 140: 2356-2360.
117. Wisnewski N., McNeil M., Grieve R. B. and Wassom D. L. 1993. Characterization of novel fucosyl and tyvelosyl-containing glycolconjugates from *Trichinella spiralis* muscle stage larvae. *Mol. Bioch. Parasitol.* 61: 25-35.
118. 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 rat. *Nature.* 312: 450-452.
119. Wu Z., Nagano I., Pozio E. and Takahashi Y. 1999. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RLFP) for the identification of *Trichinella* isolates. *Parasitol.* 118: 211-218.
120. Xiong S. and Rodgers K. 1997. Effects of malathion metabolites on degranulation of and mediator release by human and rat basophilic cells. *J. Toxicol. Environ. Health.* 51: 159-175.
121. Yépez-Mulia L. and Ortega-Pierres M. G. 1994. Aspectos actuales sobre el diagnóstico de la triquinelosis. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 36: 127-138.
122. Yépez-Mulia L., Arriaga C., Peña M. A., Gual F. and Ortega-Pierres G. 1997. Trichinellosis in wild mammals kept in a Mexico City zoo. Trichinellosis *Proceedings of the 9th International Conference on Trichinellosis*. Mexico City. pp. 559-565.
123. Yépez-Mulia L., Arriaga C., Viveros N., Adame A., Benitez E. and Ortega-Pierres M. G. 1999. Detection of *Trichinella* infection in slaughter horses by ELISA and western blot analysis. *Vet. Parasitol.* 81: 57-68.

Direcciones electrónicas

<http://ist-socrates.berkeley.edu/~jmp/EstherWeb/mechanisms.html>

12. ANEXOS

12.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Ácido clorhídrico 3 N

Ácido clorhídrico (HCl) (J. T. Baker) 12.44 mL
 Aforar a 50 mL con H₂O bidestilada.

Ácido tricloroacético al 25%

Ácido tricloroacético (Cl₃CCOOH) (J. T. Baker) 1 g
 Disolver y aforar a 2 mL en H₂O bidestilada.

Acrilamida-bisacrilamida (30%-0.8%)

Acrilamida (C₃H₅NO) (Bio-Rad) 30.0 g
 N,N'- Metilén-bis-acrilamida (C₇H₁₀N₂O₂) (Bio-Rad) 0.8 g
 Disolver y aforar a 100 mL con H₂O desionizada.

Amortiguador álcali-strip pH 11.3

Dietilamina ((C₂H₅)₂NH) (Sigma[®]) 5.15 mL
 Deoxicolato de sodio (C₂₄H₃₉O₄Na) (Sigma[®]) 20.0 g
 Disolver en 900 mL de H₂O desionizada, ajustar pH 11.5 y aforar a 1 L.

Amortiguador de columna pH 8.3

Tris-HCl (NH₂C(CH₂OH)₃HCl) (J. T. Baker) 3.16 g
 Deoxicolato de sodio (C₂₄H₃₉O₄Na) (Sigma[®]) 5.0 g
 Disolver en 900 mL de agua desionizada, ajustar a pH 8.3 y aforar a 1 L.

Amortiguador de fosfatos (10X)

Cloruro de sodio (NaCl) (J. T. Baker) 80.0 g
 Cloruro de potasio (KCl) (J. T. Baker) 2.0 g
 Fosfato de sodio dibásico heptahidratado
 (Na₂ HPO₄ 7 H₂O) (J. T. Baker) 21.7 g
 Fosfato de potasio monobásico (K HPO₄) (J. T. Baker) 2.0 g
 Disolver en 800 mL de H₂O bidestilada, ajustar a pH 7.2 y aforar a 1 L.

Amortiguador Hepes-Tyrode

HEPES ($C_8H_{13}N_2O_4S$) (Sigma [®])	1.43 g
Cloruro de sodio (NaCl) (J. T. Baker)	4.0 g
D-glucosa ($C_6H_{12}O_6$) (Sigma [®])	0.5 g
Cloruro de potasio (KCl) (J. T. Baker)	0.1 g
Cloruro de calcio ($CaCl_2$) (J. T. Baker)	0.074 g
Albumina sérica bovina (Sigma [®])	0.5 g
Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) (J. T. Baker)	0.03 g
Disolver en 400 mL de H_2O desionizada, ajustar a pH 7.3 y aforar a 500 mL.	

Amortiguador pre-strip pH 9.3

Glicina ($H_2NCH_2CO_2H$) (Bio-Rad)	3.75 g
Deoxicolato de sodio ($C_{24}H_{39}O_4Na$) (Sigma [®])	20.0 g
Disolver en 900 mL de H_2O desionizada, ajustar a pH 9.3 y aforar a 1 L.	

Amortiguador tris-glicina 250 mM pH 8.3

Glicina ($H_2NCH_2CO_2H$) (Bio-Rad)	18.8 g
Tris-base ($NH_2C(CH_2OH)_3$) (J. T. Baker)	3.02 g
Disolver en 900 mL de H_2O desionizada, adicionar 10 mL de SDS al 10 %.	
Ajustar a pH 8.3, aforar a 1 L con H_2O desionizada.	

Carbonato de Na al 2% en NaOH 0.1 N

Carbonato de sodio (Na_2CO_3) (J. T. Baker)	3.0 g
Disolver en 140 mL de NaOH 0.1N y aforar a 150 mL.	

Deoxicolato de sodio al 20 %

Deoxicolato de sodio ($C_{24}H_{39}O_4Na$) (Sigma [®])	0.2 g
Disolver en 1 mL de Tris-HCl 10 mM pH 8.13 estéril.	

Gelatina al 0.5 % en PBS

Gelatina (Sigma [®])	0.5 g
Disolver en 100 mL de H_2O bidestilada.	

Glicina 0.2M pH 10.7

Glicina ($H_2NCH_2CO_2H$) (Bio-Rad)	1.501 g
Disolver en 90 mL de H_2O bidestilada, ajustar a pH 10.7 y aforar a 100 mL.	

Gradiente de percoll	30%	80%
RPMI	14 mL	6 mL
Percoll isotónico	3.2 mL	12.8 mL
Hidróxido de sodio 4 N		
Hidróxido de sodio (NaOH) (J. T. Baker)		8.105 g
Disolver y aforar a 50 mL con H ₂ O bidestilada.		
Inhibidores de proteasas (10X)		
N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (C ₁₇ H ₁₈ ClNO ₃ S) (Sigma [®])		5.0 mg
Disolver en 10 mL de metanol.		
N-α-p-tosil-L-lisina clorometil cetona (C ₁₄ H ₂₁ ClN ₂ O ₃ S) (Sigma [®])		5.0 mg
Disolver en 10 mL de H ₂ O bidestilada estéril.		
Fluoruro de fenil metil sulfonilo (C ₇ H ₇ SO ₂ F) (Sigma [®])		17.4 mg
Disolver en 10 mL de isopropanol.		
Ionóforo de calcio A23187 1 μM		
Ionóforo de calcio (C ₂₉ H ₃₇ N ₃ O ₆) (Sigma [®])		1.0 mg
Dimetil-sulfóxido estéril (CH ₃) ₂ SO) (Sigma [®])		3.82 mL
La concentración obtenida es de 500 μM, alicuotar y mantener a -20 ° C.		
Metanol-ácido acético (30%-10%)		
Metanol (CH ₃ OH) (J. T. Baker)		300 mL
Ácido acético glacial (CH ₃ COOH) (J. T. Baker)		100 mL
Mezclar y aforar con H ₂ O bidestilada a 1 L.		
O-ptaldialdehído-metanol espectrofotométrico		
o-ptaldialdehído (C ₆ H ₄ (COH) ₂) (Sigma [®])		10.4 mg
Disolver en 8 mL de metanol grado espectrofotométrico (Sigma [®]).		
PBS adicionado con antibióticos		
Penicilina G sódica 10 000 U/mL (GIBCO BRL [®])		5.0 mL
Sulfato de estreptomicina 10 000 μg/mL (GIBCO BRL [®])		5.0 mL
Anfotericina B 250 μg/mL (GIBCO BRL [®])		5.0 mL
PBS		485 mL

Pepsina-HCl al 1%

Pepsina (Sigma [®])	10.0 g
Ácido clorhídrico concentrado (HCl) (J. T. Baker)	10.0 mL
Disolver y aforar a 1 L de H ₂ O bidestilada.	

Percoll isotónico

Percoll (Sigma [®])	20.0 mL
Solución salina balanceada de Hanks (10 X) (In Vitro)	1.84 mL
HEPES 1 M (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S) (GIBCO BRL [®])	0.2 mL
HCl 1 N	2 gotas

Persulfato de amonio al 10 %

Persulfato de amonio ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈) (Sigma [®])	30.0 mg
Disolver en 300 µL de H ₂ O desionizada.	

P-nitrofenil-N- acetil-β-D-glucosaminida

Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄) (J. T. Baker)	2.507 g
Disolver en 35 mL de H ₂ O bidestilada, ajustar a pH 4.5. A 30 mL de la solución anterior, añadir 45 mL de H ₂ O bidestilada y disolver 100 mg de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminida (C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₈) (Sigma [®]).	

RPMI

RPMI 1640, con L-glutamina (GIBCO BRL [®])	10.4 g
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃) (J. T. Baker)	2.0 g
Disolver en 1 L de H ₂ O bidestilada. Ajustar a pH 7.2 y esterilizar por membrana de nitrocelulosa de .22 µ.	

RPMI adicionado con antibióticos y SFB al 5%

Medio RPMI (GIBCO BRL [®])	92 mL
Penicilina G sódica 10 000 U/mL (GIBCO BRL [®])	1.0 mL
Sulfato de estreptomicina 10 000 µg/mL (GIBCO BRL [®])	1.0 mL
Anfotericina B 250 µg/mL (GIBCO BRL [®])	1.0 mL
Suero fetal bovino (GIBCO BRL [®])	5.0 mL

SDS al 20%

Dodecil sulfato de sodio (CH ₃ (CH ₂) ₁₁ OSO ₃ Na) (Bio-Rad)	20.0 g
Disolver en 100 mL de H ₂ O desionizada.	

Sulfato de cobre al 0.5%

Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Sigma[®]) 0.5 g
 Disolver en 90 mL de H_2O bidestilada y aforar a 100 mL.

Tartrato de Na y K al 2 %

Tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Sigma[®]) 0.2 g
 Disolver en 9 mL de H_2O bidestilada, y aforar a 10 mL.

Tris- HCl 1 M pH 6.8

Tris-HCl ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3 \text{HCl}$) (J. T. Baker) 1.23 g
 Tris-Base ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) (J. T. Baker) 5.13 g
 Disolver en 40 mL de H_2O desionizada, ajustar pH a 6.8 y aforar a 50 mL.

Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

Tris- HCl ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3 \text{HCl}$) (J. T. Baker) 7.02 g
 Tris-Base ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) (J. T. Baker) 0.67 g
 Disolver en 40 mL de H_2O desionizada, ajustar pH a 8.8 y aforar a 50 mL.

Tris-HCl 20 mM pH 8.13

Tris-HCl ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3 \text{HCl}$) (J. T. Baker) 0.3152 g
 Disolver en 90 mL de H_2O bidestilada, ajustar pH a 8.13 y aforar a 100 mL

Triton X-100 0.5%

Triton X-100 (Sigma[®]) 0.5 mL
 Aforar y disolver a 100 mL en HTB.