



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

CARRERA DE BIOLOGÍA

“Efecto de las nanopartículas de quitosano durante la inmunización de ratones con los productos de excreción y secreción de *Trichinella spiralis*”.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

Luis Daniel Valencia Saavedra

DIRECTOR DE TESIS:

D en IM Jorge Luis de la Rosa Arana



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO.

Abril, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO DE INMUNOPARASITOLOGIA DEL INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICOS, DE LA SECRETARIA DE SALUD, BAJO LA ASESORIA DEL DR. JORGE LUIS DE LA ROSA ARANA Y EN COLABORACIÓN CON EL LABORATORIO DE "TOXICOLOGÍA Y GENÉTICA" DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MULTIDISCIPLINARIA DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN DE LA UNAM, BAJO LA ASESORIA DEL DR. ROBERTO DÍAZ TORRES Y LA DRA. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA.

AGRADECIMIENTOS

Este logro lo comparto con los pilares más importantes de mi vida: mis papas, mis hermanas Viry y Dany (Fey, Naty y Luis) por su amor y cariño incondicional, por su apoyo y sus incontables consejos en las buenas y en las malas y durante mi camino en la formación profesional así como en el camino hacia una mejor persona; y además por enseñarme que todo es posible con trabajo, dedicación y perseverancia; pero sobre todo le agradezco a mamá y papá, los quiero mucho.

Para mí es un orgullo y me siento muy afortunado de ser universitario de la máxima casa de estudios en México: la UNAM, y es por ello que quiero reconocer y agradecer, tanto el gran trabajo así como el conocimiento compartido por los profesores de la carrera de Biología de la FES Iztacala en especial a aquellos que me contagiaron su gusto y su pasión en ésta profesión, sin mencionar que son extraordinarias personas, una de ellas es la Dra. Elvia Gallegos. Mi *alma matter*, es un lugar que se volvió como mi segunda casa y del que nunca olvidaré esos momentos de trabajo y de diversión, además de las incontables vivencias como en las prácticas de campo con mis amigos Ana, Alejandro, Manuel, Oscar, Juan Charly, Ana Karen, Edgar, Lalo, Edwin, Pedro, Sandra Castañeda y demás compañeros que me dio mucho gusto conocer y que por supuesto los recordaré.

EL InDRE fue una parte muy importante en la culminación de éste trayecto y estoy muy agradecido por haber formado parte del equipo de investigación del laboratorio de Inmunoparasitología, a cargo del Dr. Jorge Luis de la Rosa Arana, por sus innumerables enseñanzas, todo su apoyo y sus consejos que me sumergieron profundamente en el área de la parasitología. También quiero expresar mi agradecimiento a todos los integrantes de los laboratorios del departamento de Investigaciones Inmunológicas (INPA, ACOMO, LINE y LINA), del Bioterio del instituto así como al personal de los laboratorios de Enteroparásitos/Amibas de vida libre y Helmintos tisulares por todo su apoyo, sus consejos así como su amabilidad y

gran paciencia, pues me hicieron sentir a gusto durante mi estancia en el laboratorio; al igual que a mis amigos tesistas como Paco, Adri, Marydalia, David, Sandra, Ana, Paola, Jessi, Arge, Malú y Armando, a quienes estimo y aprecio mucho por hacer que esos largos días de trabajo fueran más ligeros y alegres, y de quienes aprendí mucho también.

También quiero agradecer al Dr. Roberto Torrez y a la Dra. Patricia Ramírez de la unidad de investigación de la FES-Cuautitlán por ayudarme en la elaboración de las famosas nanopartículas y por auxiliarme en todo lo que necesité.

Finalmente, alguien a quien también le quiero agradecer es a la Dra. Lupita, quien me acompañó en ésta última etapa y me enseñó a conocerme, ser paciente, reconocer mis objetivos y lo más importante, que éste logro es el inicio de un camino largo con muchos obstáculos y lo único que debo de hacer es confiar en mi trabajo y mi capacidad.

"Uno debe, de vez en cuando, intentar cosas que están más allá de su capacidad".

-Auguste Renoir

CONTENIDO

GLOSARIO DE ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 AGENTE ETIOLÓGICO	7
1.2 MORFOLOGÍA	11
1.3 CICLO DE VIDA DE <i>TRICHINELLA SPIRALIS</i>	16
1.4 EPIDEMIOLOGÍA	20
1.5 ENFERMEDAD	24
1.6 PREVENCIÓN Y CONTROL	28
1.7 INMUNOLOGÍA Y ANTÍGENOS	34
1.8 PERSPECTIVAS DE VACUNACIÓN	42
1.9 NANOPARTÍCULAS	45
2. JUSTIFICACIÓN	47
3. OBJETIVOS	48
4. DISEÑO EXPERIMENTAL	49
5. MATERIAL Y MÉTODOS	50
6. RESULTADOS	61
7. DISCUSIÓN	73
8. CONCLUSIONES	82
9. PERSPECTIVAS	82
10. REFERENCIAS	83

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

AF	adyuvante completo de Freund
AF/PBS	grupo experimental que recibió formulación del adyuvante completo de Freund/PBS
CHI	grupo experimental que recibió la formulación de nanopartículas de quitosano o chitosan
PI	días posteriores a la infección
ELISA	Enzyme-Linked-Immunesorbent Assay/ Ensayo Inmunoenzimático
GA	gusanos adultos de <i>T. spiralis</i>
Gp43	glicoproteína de peso molecular de 43 kilodaltones
gpo	grupo experimental
IgA	anticuerpo o inmunoglobulina A
IgE	anticuerpo o inmunoglobulina E
IgG	anticuerpo o inmunoglobulina G
IgG2a	anticuerpo o inmunoglobulina G2a
IFN- γ	interleucina interferón gamma
IL-4	interleucina 4
LM	estadio de larva muscular de <i>T. spiralis</i>
TH1	linfocitos T helper 1 (linfocitos T cooperadores 1)
TH2	linfocitos T helper 2 (linfocitos T cooperadores 2)
PBS	Phosphates Buffer Solution/ Solución amortiguadora de fosfatos
PES	antígeno o productos de excreción y secreción de la LM de <i>T. spiralis</i>
PES/D	formulación de nanopartículas de quitosano con PES dentro de ellas
PES/F	formulación de nanopartículas de quitosano con PES por fuera de ellas
PES/DF	formulación de nanopartículas de quitosano con PES por dentro y fuera de ellas
PES/AF	grupo experimental control (+) inmunizado con PES de LM de <i>T. spiralis</i> /AF

RESUMEN

Los antígenos de excreción y secreción (PES) de la larva muscular de *Trichinella spiralis* han sido estudiados ampliamente como estrategia de prevención y control de la triquinosis. Los PES han sido empleados junto con diferentes sustancias adyuvantes en experimentos de protección; sin embargo, la protección obtenida solo ha sido parcial y orientada a una respuesta inmune Th2. El quitosano se ha empleado recientemente en el desarrollo de vehículos nanoparticulares para la administración de fármacos. El objetivo de este trabajo fue determinar la influencia de las nanopartículas de quitosano en la inmunización oral de ratones con los productos de excreción y secreción de las larvas musculares de *T. spiralis*.

Se prepararon cuatro formulaciones de nanopartículas, la formulación uno se preparó solo con el quitosano (CHI), la formulación dos consistió en los antígenos (PES) dentro de las nanopartículas (PES/D), la tres con los PES fuera de las nanopartículas (PES/F), y la cuatro con los PES dentro y fuera (PES/DF). Las formulaciones se administraron a grupos de diez ratones durante 20 días por vía oral a una concentración de 1 ug/mL/día (grupos 3 al 6) y, un grupo adicional de ratones (grupo 2), recibió los PES por vía oral. Adicionalmente se inmunizaron ratones por vía parenteral: el grupo 7 (PES/AF) se inmunizó con adyuvante de Freund y PES a una concentración de 5 ug/mL, una vez por semana durante cuatro semanas, el grupo 9 solo se administró con adyuvante de Freund (AF) y el grupo 8 (PESp) solo con los PES. El grupo 1 (RS) no recibió tratamiento. Se determinó la cinética de anticuerpos séricos, coproanticuerpos y citocinas IL-4 e IFN-gamma. Al término del esquema de inmunización, los grupos se infectaron con 300 larvas musculares de *T. spiralis* y a los 7 días PI se recuperaron gusanos adultos, mientras que a los 45 días PI se recuperaron larvas musculares.

Los anticuerpos séricos solo se observaron en el grupo PES/AF. Se observó que con respecto al grupo RS, el CHI promueve una protección parcial (41%) en ausencia de los PES, la cual se incrementa en presencia de los PES: 52% en los grupos PES/D y PES/DF y 45% en el PES/F. La mayor protección se obtuvo con la formulación de nanopartículas PES/DF. El análisis de la respuesta inmune demostró un incremento en la producción de IFN-gamma sérico en el grupo CHI como en (+) PES/AF. No se observó incremento en la producción de IL-4 en ninguna de las formulaciones de las nanopartículas probadas.

La inmunización por vía oral con las nanopartículas de quitosano no estimuló la respuesta inmune humoral, por ende, dicho biopolímero no mostró capacidad adyuvante. Por otra parte, el quitosano estimuló la expulsión rápida de los gusanos adultos aún en ausencia de PES, y además, las nanopartículas mostraron ser un sistema transportador al ser administradas por vía oral.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias, por su frecuencia y duración son uno de los grupos de patologías infecciosas más prevalentes en el mundo, pues son causadas por organismos patógenos presentes en los animales o en los productos derivados de ellos. Por lo tanto, el riesgo que suponen para la salud es enormemente variable dependiendo del agente invasor y de la inmunidad del hospedador (Meslin *et al.*, 2000).

1.1 Agente etiológico

Los nemátodos del género *Trichinella* están ampliamente distribuidos en todo el mundo con excepción de la Antártica, en donde no hay registro del parásito; todos ellos tienen distinta distribución geográfica (cuadro 1) y se encuentran en un amplio rango de hospedadores, como lo son animales carnívoros, humanos y hospedadores accidentales (Bruschi, 2012; Pierres *et al.*, 2000; Pozio y Murrel, 2006). Dicho helminto, habita en el tejido muscular y es adquirido por la ingestión de carne cruda o productos de carne mal cocida que contienen a la larva encapsulada o larva muscular (LM) (Dupouy-Camet, 2000), de ésta manera, cuando los humanos fallan en el manejo apropiado de la carne de animales destinados al consumo o en su control, puede ocurrir la transmisión de alguna de las 12 especies de éste género (figura 1), como por ejemplo, *Trichinella spiralis* (Owen, 1835), entre los animales domésticos y silvestres (Pozio y Murrel, 2006).

Cualquier especie del género *Trichinella* es el agente etiológico de la enfermedad conocida como triquinelosis (anteriormente conocida como triquiniasis o triquinosis) la cual es una zoonosis transmitida por los alimentos y puede causar la muerte en casos severos (Dupouy-Camet, 2000; Pozio y Murrell, 2006). Los brotes de triquinelosis han sido regularmente reportados durante los dos siglos pasados y hay evidencia que sugiere que ésta enfermedad parasitaria puede ser emergente- reemergente en algunas partes del mundo (Dupouy-Camet, 2000). En varios estudios, las ratas, los perros y los gatos han sido encontrados infectados con *Trichinella* y pueden ser considerados un riesgo para la transmisión de la infección a los

cerdos u otros animales dirigidos al consumo humano (Ortega-Pierres *et al.*, 2000). Una vez que ocurre la infección en una población de cerdos domésticos, ésta puede ser perpetuada por varios años dentro del entorno vecino debido a los hábitos alimenticios carroñeros de éstos animales. Éste problema es exacerbado cuando los restos de cerdos infectados con el parásito en los mataderos son dispersados en el entorno local (Pozio *et al.*, 2009).

La historia moderna de la triquinelosis comienza en 1835, con el descubrimiento de la etapa larvaria del parásito en la infección humana por James Paget y Richard Owen en Londres, Inglaterra (Owen, 1835). Este último fue quien le asignó el nombre de *T. spiralis*. Sobre los siguientes 60 años, nuevas revelaciones en el ciclo de vida del parásito, la epidemiología y el diagnóstico clínico resultaron de las investigaciones llevadas a cabo en Alemania por Friedrich Zenker, Rudolf Virchow, Rudolf Leukart y otros (Pozio, 2006). Varios hallazgos importantes surgieron varios años después de su descubrimiento, pero el más importante desde el punto de vista de salud pública es el vínculo de la infección de *T. spiralis* con la enfermedad humana y la mortalidad, por F. Zenker en 1860. Éste identificó y demostró en una mujer fallecida que el origen de la infección por *T. spiralis* fue el cerdo y de ésta manera surgió la clara evidencia de la transmisión de dicho parásito de un animal al hombre (Nelson, 1988). De igual importancia, fue el reconocimiento de que *Trichinella* sp. fue primeramente un parásito de animales y que existió en ambos ciclos: el doméstico (puercos, roedores y mascotas) y en el ciclo silvestre (pumas, jabalíes, osos, etc) (Kozar, 1970). De ésta manera fue como el conocimiento científico determinó que *Trichinella* es un organismo patógeno para los humanos y animales, quienes se encuentran vulnerables en todo momento ante dicha infección.

Desde el momento del descubrimiento de *T. spiralis* hasta la mitad del siguiente siglo, fue comúnmente asumido que todos los casos de triquinelosis fueron causados por dicha especie, sin embargo, *T. spiralis* ha sido reconocida como el agente etiológico de la mayoría de las infecciones y muertes humanas alrededor del mundo y su patogenicidad es mayor que

las otras especies debido al elevado número de larvas recién nacidas (LRN) producidas por las hembras (Pozio *et al.*, 1992) y por la fuerte reacción inmune inducida en humanos respecto a los otros genotipos (Bruschi *et al.*, 1999; Pozio, 2005). Más de un siglo después, éste parásito había sido reportado en más de 100 diferentes hospedadores mamíferos infectados experimental o naturalmente y se creyó que era la única especie con baja especificidad de hospedadores y dispersión en todo el mundo por el intercambio de los cerdos domésticos. Sin embargo, en las recientes décadas, la aplicación de métodos bioquímicos y moleculares en conjunto con los biológicos experimentales se ha descrito la taxonomía así como las especies y genotipos del género *Trichinella* (Tabla 1):

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Trichinella spp.* (García, 2011).

Reino:	Animalia		
Subreino:	Eumetazoa		
Dominio:	Eukaryota		
Rama:	Protostomia		
Grado:	Bilateria		
Infrareino:	Ecdysozoa		
Superphylum:	Aschelminthes		
Phylum:	Nemathelminthes		
Clase:	Adenophorea		
Subclase:	Enoplia		
Orden:	Enoplida		
Suborden:	Trichinellina		
Superfamilia:	Trichuroidea		
Familia:	Trichinelloidea		
Género:	<i>Trichinella</i>		
Especie:	<i>Trichinella spiralis</i> (Owen, 1835).	<i>Trichinella</i> T8 (Pozio <i>et al.</i> , 1992)	<i>Trichinella patagoniensis</i> (genotipo T12) (krivokapich <i>et al.</i> , 2008).
	<i>Trichinella nativa</i> (Britov y Boev, 1972).	<i>Trichinella murrelli</i> (Pozio y la Rosa, 2002)	<i>Trichinella pseudospiralis</i> (Garkavi, 1972).
	<i>Trichinella</i> T6 (Pozio <i>et al.</i> , 1992).	<i>Trichinella</i> T9 (Nagano <i>et al.</i> , 1999)	<i>Trichinella papuae</i> (Pozio <i>et al.</i> , 1999).
	<i>Trichinella britovi</i> (Pozio <i>et al.</i> , 1992)	<i>Trichinella nelsoni</i> (Britov y Boev, 1972).	<i>Trichinella zimbabwensis</i> (Pozio <i>et al.</i> , 2002).

Los 12 genotipos reconocidos son agrupados en dos clados distintos caracterizados por la presencia o ausencia de una cápsula de colágena intramuscular. Así, un clado es representado por todas las

especies y taxa que se encapsulan después de la invasión del tejido muscular del hospedador (encapsuladas), y el otro en el que las larvas no se encapsulan después de invadir las células musculares de mamíferos, aves, e incluso algunos reptiles (no encapsulado) (Gottstein *et al.*, 2009). En el cuadro 1 se muestran las características epidemiológicas de las especies de *Trichinella*, todas patógenas para los humanos.

CUADRO 2. Características epidemiológicas de las especies y genotipos del género *Trichinella* (Gottstein *et al.*, 2009).

Especie o genotipo de <i>Trichinella</i>	Distribución Geográfica	Hospedadores	Principal fuente de Infección de los seres humanos	Resistencia de las larvas en músculos congelados
CLADO				
ENCAPSULADO				
<i>Trichinella spiralis</i>	Cosmopolita	Mamíferos silvestres y domésticos	Carne de cerdo y caballo	Sí, en músculos de caballo
<i>Trichinella nativa</i>	Zonas del Ártico y subártico de América, Asia y Europa	Carnívoros silvestres	Carne de morsa y oso	Sí, en músculos de carnívoros
<i>Trichinella T6</i>	Canadá, Alaska. Montañas Rocosas, Montes Apalaches en EUA	Carnívoros silvestres	Carne de carnívoros silvestres	Sí, en músculos de carnívoros
<i>Trichinella britovi</i>	Zonas templadas de Europa, Asia, Norte y Oeste de África	Mamíferos silvestres y rara vez en cerdo domestico	Carne de jabalí, cerdo, caballo, zorros y chacales	Sí, en músculos de caballo y carnívoros
<i>Trichinella T8</i>	Sudáfrica y Namibia	Carnívoros silvestres	No documentado	No
<i>Trichinella murrelli</i>	Estados Unidos de América y sur de Canadá	Carnívoros silvestres	Carne de oso y caballo	No
<i>Trichinella T9</i>	Japón	Carnívoros silvestres	No documentado	No
<i>Trichinella nelsoni</i>	Este y sur de África	Mamíferos silvestres	Jabalí y cerdo silvestre	No
<i>Trichinella T12</i>	Argentina	Pumas	No documentado	Desconocido

CUADRO 2 (continuación). Características epidemiológicas de las especies y genotipos del género *Trichinella*

CLADO NO ENCAPSULADO				
<i>Trichinella pseudospiralis</i>	Cosmopolita	Mamíferos silvestres, aves y cerdo domésticos.	Carne de cerdo	No
<i>Trichinella papuae</i>	Papúa Nueva Guinea y Tailandia	Cerdo silvestre y cocodrilos de agua salada	Carne de cerdo	No
<i>Trichinella zimbabwensis</i>	Zimbabwe, Mozambique, Etiopia, y Sudáfrica	Cocodrilos de granjas de África y varanos	No documentado	No

1.2 Morfología

Trichinella spiralis es un nematodo dioico y presenta tres estadios de desarrollo: el gusano adulto (GA) (hembra y macho), la larva recién nacida (LRN) y la larva muscular (LM), la cual presenta cinco estadios. La fase que se encuentra en músculo es la muda 1, mientras que de la muda 2 a la 5 se encuentran en el intestino. Incluso se ha denominado que la muda 5 corresponde a los pre-adultos.

1.2.1 Gusanos adultos

Los machos adultos miden de uno y medio a dos milímetros de longitud por 40 µm de diámetro, la extremidad anterior es más delgada que la posterior (figura 1); en ésta última región presentan dos apéndices copuladores lobulados sin espículas copulatrices y además un testículo que produce espermatozoides no flagelados de dos o tres cromosomas, de modo que esto determina el sexo de la descendencia (Capó *et al.*, 1996; De la Rosa y Gómez, 2004).

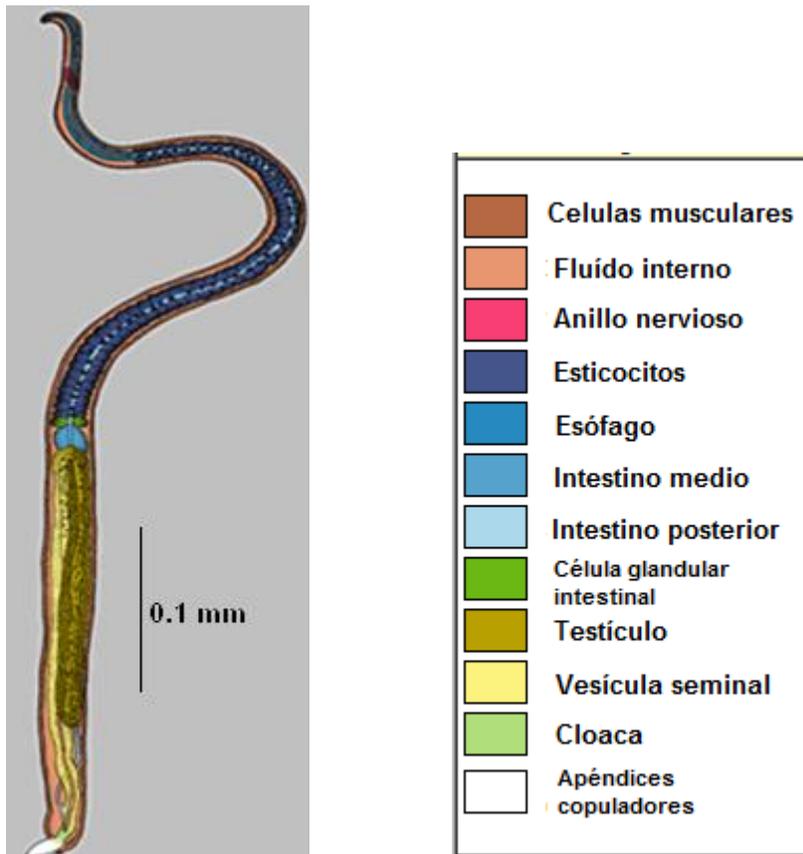


Figura 1. Macho adulto de *Trichinella spiralis*. El gusano adulto maduro se caracteriza por tener dos pares de papilas genitales, las cuales se observan de color blanco en la parte inferior de la figura (Villela, 1970).

Las hembras miden de tres a cuatro milímetros de longitud por 60 μm de diámetro y tienen el extremo posterior romo y redondeado, poseen un solo ovario que se localiza en la parte posterior y produce óvulos con tres cromosomas, luego sigue el útero y después la vulva, cerca de la mitad del esticosoma (figura 2). Por cada dos hembras hay un macho; y se ha estimado que cada hembra larvipone de 500 a 1500 larvas recién nacidas, esto lo hacen en una sola ocasión (Gottstein *et al.*, 2009).

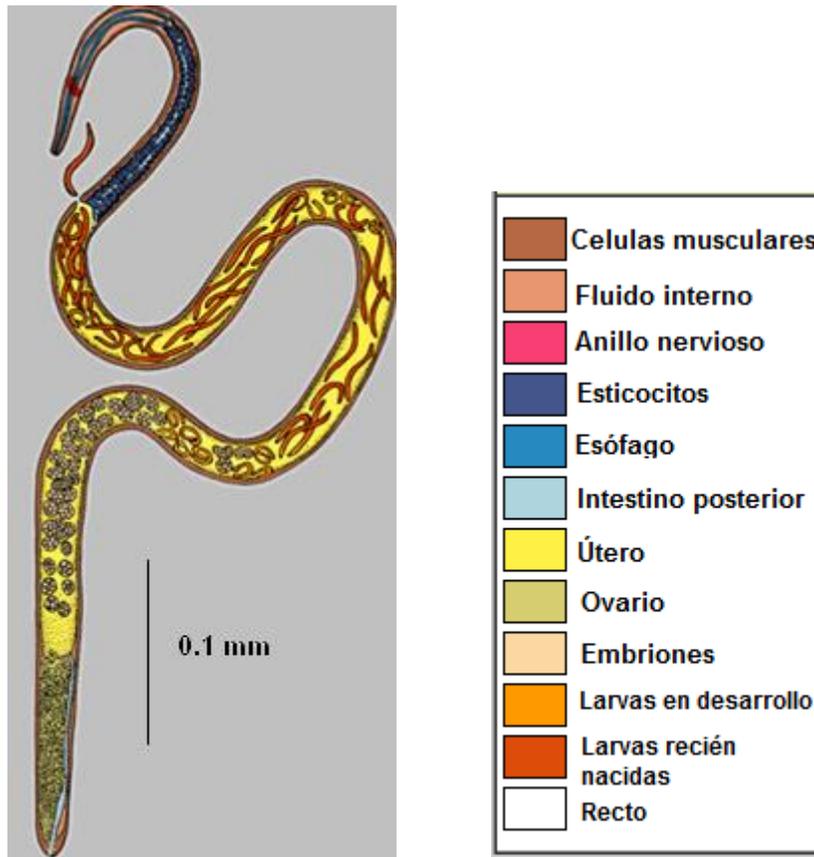


Figura 2. **Hembra adulta.** El gusano hembra puede diferenciarse del macho por tener el extremo posterior romo y redondeado. En la porción ventral, la vagina se extiende en la parte posterior hasta el útero, donde se observa que contiene en su porción anterior larvas y huevos; en la región posterior, detrás del útero y cerca de la abertura anal, se encuentra el ovario (Villela, 1970).

1.2.2 Larva recién nacida

Conocidas como larvas de primer estadio o juvenil uno (figura 3), miden 120 μm de longitud por siete micras de diámetro y tienen un conjunto de células, quizá germinales, pero no órganos; en ésta fase aún no se forma el esticosoma. Dicha etapa representa la fase de invasión al músculo. Éste estadio es el único del parásito que posee un estilete tipo cuchillo, localizado en su cavidad oral y lo usa para abrir un agujero en las células del hospedador; de

ésta forma, la larva atraviesa el epitelio del intestino delgado para transportarse por los vasos linfáticos o por el flujo sanguíneo y distribuirse en varios órganos, o sitios predilectos del cuerpo, principalmente los músculos altamente oxigenados (de la Rosa y Gómez, 2004; Dupouy-Camet, 2000).



Figura 3. **Larva recién nacida y gusanos adultos.** Se observan ejemplares de los estadios adultos macho y hembra y abundantes LRN de *T. spiralis*. Nótese los apéndices caudales lobulados en el macho y el menor tamaño de éste con respecto a las hembras (de la Rosa y Gómez, 2004).

1.2.3 Larva Muscular

También conocida como larva infectiva o juvenil dos, es la fase de desarrollo que se caracteriza por su importancia en la transmisión, la patogenia y el diagnóstico de la triquinelosis. Alcanzan a medir hasta un milímetro de longitud por 40 μm de diámetro y se encuentran en el músculo esquelético dentro de una cápsula de colágena (figura 4) de tipo IV y de tipo VI, denominada "célula nodriza" (de la Rosa y Gómez, 2004). Normalmente la LM se encuentra dentro de una cápsula, aunque en infecciones masivas se han encontrado dos o

tres LM en algunas células nodrizas (Ramírez-Melgar *et al.*, 2008); ésta se forma por la interacción de la LM con el miocito, es de forma ovalada y mide de 250 a 500 micras, cabe mencionar que tal estructura se encuentra rodeada de un plexo de vénulas formado por una acción génica provocada por el parásito, al parecer, éstas vénulas tienen la finalidad de eliminar los desechos metabólicos, así como de proveer nutrientes. Se ha argumentado que su función es la de proteger al helminto del ataque del sistema inmune del hospedador, así como brindarle crecimiento, desarrollo y mantenimiento del parásito durante su vida en ese nicho esencial (Despommier, 1998). El esófago consiste en una parte anterior pequeña y muscular, seguida de una parte posterior más ancha y glandular llamada esticosoma, integrada por esticocitos, los cuáles poseen gránulos secretores cuyos productos antigénicos se descargan hacia la luz del esófago y de ahí al exterior del parásito. El tubo digestivo se prolonga hasta el intestino de tipo tubular y culmina en una cloaca (de la Rosa y Gómez, 2004).

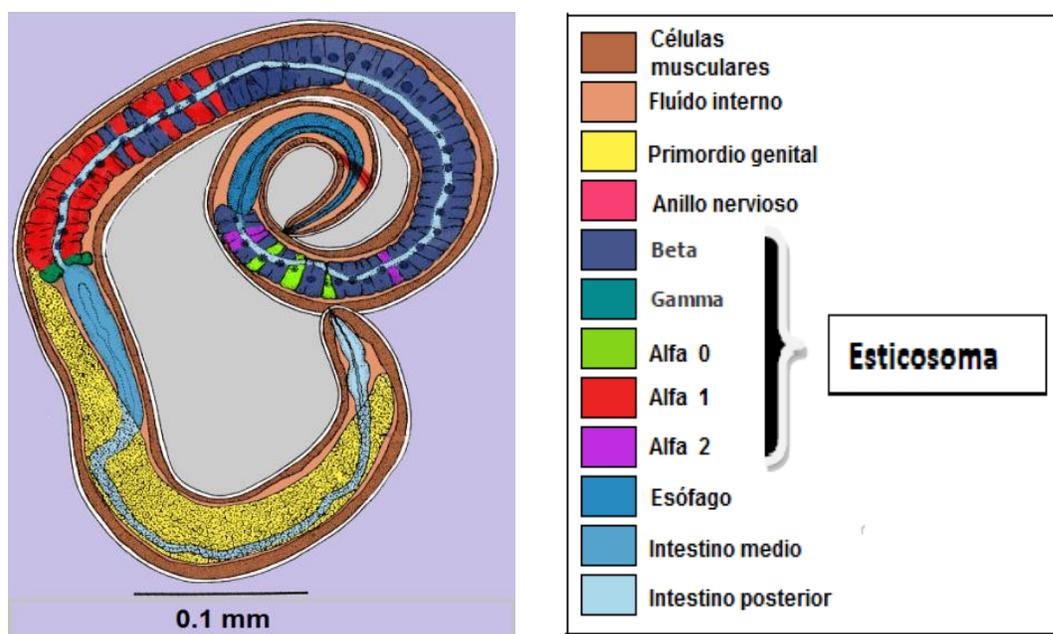


Figura 4. Larva muscular de *Trichinella spiralis*. Presenta cutícula, anillo nervioso, intestino, primordio genital y esófago, que está rodeado por una estructura glandular en su extremo posterior llamada esticosoma, la cual, está formada por un cordón compacto de células dispuestas linealmente llamadas

esticocitos (45 a 55 esticocitos), que ocupan la mitad de la región anterior de la larva y liberan los componentes de excreción/secreción del parásito, involucrados en la formación de la célula nodriza (Villela, 1970).

1.3 Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*

El amplio intervalo de las especies hospedadoras de *Trichinella* comprende gran cantidad de especies de mamíferos, sin embargo, el hecho de que algunos marsupiales, aves, y reptiles puedan estar infectados, sugiere que éste género podría haber estado asociado con dinosaurios carnívoros y antiguos mamíferos. Los homínidos podrían haber adquirido *Trichinella* cuando cambiaron el modo de vida y dejaron de habitar en los árboles para ocupar la sabana africana y volverse nómadas carnívoros. La domesticación de los cerdos hace 10,000 años aproximadamente en Asia creó un permanente reservorio de parásitos para los humanos, limitado por el uso del fuego (Dupouy-Camet, 2000).

Trichinella spiralis es un parásito intracelular y tiene un ciclo de vida directo (Figura 6), el cual presenta dos fases de desarrollo, una a nivel intestinal (fase entérica), y la otra en el tejido muscular (fase parenteral); en la primera el GA invade las células columnares epiteliales del intestino delgado o enterocitos, y en la segunda la LM invade a los miocitos del músculo esquelético estriado (Despommier, 1993). Los humanos, cerdos y caballos representan a los hospedadores definitivos más importantes desde el punto de vista veterinario. La transmisión del nemátodo comienza cuando un hospedador consume tejidos musculares crudos o mal cocidos que contengan al estadio juvenil 2 o LM (Bruschi y Murrell, 2001). Tras la ingesta, dicha larva es liberada de la cápsula de colágena y del tejido que la rodea por la acción de la pepsina y del ácido clorhídrico en el estómago y ésta es entonces llevada al intestino delgado. La epicutícula se vuelve parcialmente digerida y esto permite al parásito recibir señales del ambiente, y selecciona el sitio de infección en el intestino delgado (Capó *et al.*, 1996; Wright *et al.*, 1987) (figura 5).

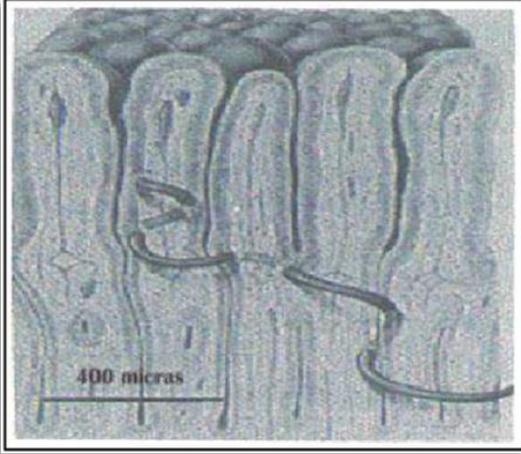


Figura. 5. Esquema del nicho intestinal de *T. spiralis*. Se observa la invasión de la LM a las células columnares del intestino delgado. Barra de escala= 400 μ . Despommier, 1978.

Posteriormente, las larvas mudan cuatro veces, se vuelven adultos sexualmente maduros (en aproximadamente 30 horas post-infección) y es entonces cuando penetra los enterocitos del yeyuno. Después de aproximadamente una semana posterior a la infección los gusanos hembras adultos que han sido previamente fecundadas liberan al primer estadio larvario o a las larvas recién nacidas (Bruschi, 2012; de la Rosa, 2012). La expulsión de los GA del intestino del hospedador es la expresión final de la inmunidad y ocurre varias semanas después de la infección, cuando es establecida la respuesta inmune intestinal y los mecanismos efectores inmunes afectan la viabilidad de los parásitos, resultando en la continua expulsión de gusanos adultos (Capó, 1996; Villela, 1970; Gottstein *et al.*, 2009). La LRN atraviesa la lámina propia para transportarse por los vasos linfáticos o por el flujo sanguíneo y se distribuye en varios órganos, incluyendo el miocardio, cerebro, pulmones, o sitios predilectos del cuerpo (principalmente los músculos altamente oxigenados como el diafragma, músculos maceteros, y la lengua), provocando daño en tejidos, incluso puede resultar en severas lesiones, particularmente cuando la larva migra al corazón o al cerebro (Bruschi y Murrel, 2001; Dupouy-Camet, 2000; Gottstein *et al.*, 2009). Por lo tanto, solo las LRN que invaden los miocitos o las fibras del músculo esquelético pueden sobrevivir (Bruschi, 2012). Cabe mencionar que la mayoría de las células mueren como resultado de la invasión por éste gusano, pero los miocitos del músculo esquelético son la única excepción (Villela, 1970). Después de que las LRN de *T. spiralis* invaden dichas células inducen la formación gradual de

una cápsula de colágena, conocida como célula nodriza. Una vez que se encapsulan, ahí mismo se desarrollan en la etapa infectiva o LM, sin que ocurra proceso de muda, entre el día 21 y el 30 post-infección (Bruschi, 2012; Gottstein *et al.*, 2009). El metabolismo anaerobio de la LM dentro de dicha célula le permite su supervivencia en carne extremadamente podrida. De esta manera, la temperatura ambiental y la humedad juegan un importante papel en la transmisión de *Trichinella* entre los organismos de vida silvestre (Pozio, 2000) y en los productos cárnicos (usualmente de cerdo que contiene viable a la LM) destinados al consumo humano (Medina-Lerena *et al.*, 2008). El complejo parásito-célula nodriza puede vivir, tanto, como el hospedador viva, aunque en la mayoría de casos no sucede así y es calcificado varios meses o algunos años después de su formación (Gottstein *et al.*, 2009).

En el caso de las especies del género *Trichinella* no encapsuladas, las larvas no inducen la formación de una cápsula de colágena. La infectividad larvaria puede ser conservada por varios años, dependiendo de la especie hospedadora. La larva parece no ser patógena para los hospedadores naturales (excluyendo al humano) a menos que una gran cantidad de larvas se instalen en los músculos (Bruschi, 2012). Con el fin de propagar el ciclo de vida de dicho parásito, éste último estado (LM) debe ser ingerido por otro animal mamífero. El comportamiento caníbal y carroñero es común entre la mayoría de carnívoros silvestres como los osos, jabalíes, morsas, etc., e incluso en animales sinantrópicos (como las roedores, mapaches, etc.), por lo que el comportamiento de los animales es de gran importancia para contribuir a perpetuar el ciclo de vida de éste nemátodo (Gottstein *et al.*, 2009; Pozio, 2000 y 2005).

También se han registrado brotes humanos en Europa, Asia, África, América (Kapel, 2000) ocasionados por distintas fuentes de infección de *Trichinella* como la carne de caballo (considerado un hospedador inusual), rata de campo, perros e incluso gatos, así como por el consumo de carne de algunos animales de caza deportiva infectados (como los ciervos),

permitiendo la coexistencia del ciclo de vida silvestre y doméstico del parásito (Figura 6) (Dupouy-Camet, 2000).

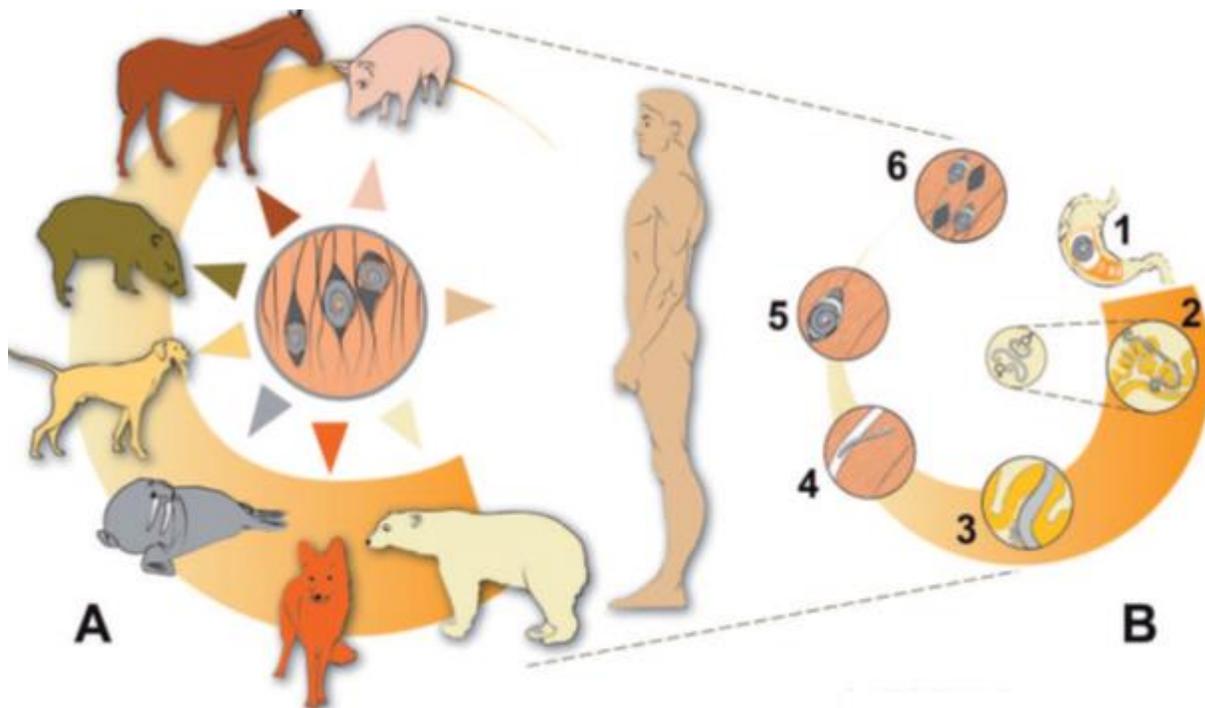


Figura 6. Ciclo de vida de *Trichinella sp.* (A) Los principales recursos de la infección por *Trichinella sp.* en humanos son los puercos, caballos, jabalíes, perros, morsas, zorros y osos, los cuales albergan en el músculo esquelético a las LM. Durante la fase enteral (B), el tejido muscular es digerido en el estómago, y las LM son liberadas (1); las LM penetran en la mucosa del intestino delgado y llegan a la fase adulta en las 48 horas post-infección (PI), dando lugar a machos y hembras adultos, los cuales se aparean (2); a partir del quinto día PI y hasta la segunda semana post-infección, las hembras liberan LRN las cuales se dirigen y viajan por los vasos linfáticos (3). En la fase parenteral, las LRN llegan al músculo estriado y penetran activamente en la célula muscular (4), la larva crece hasta desarrollarse como LM, originando de esta manera la fase infectiva (5) y, después de un período de tiempo (semanas, meses, o años) ocurre un proceso de calcificación (6) (Gottstein *et al.*, 2009.)

1.4 Epidemiología

Trichinella spiralis muestra una distribución cosmopolita, ya que ha sido introducida pasivamente en varias partes del mundo por cerdos domésticos y ratas sinantrópicas. El comercio de cerdos domésticos y la migración de ratas cafés (*Rattus norvegicus*) de Asia, podrían haber favorecido la dispersión de éste parásito en Europa y la colonización por europeos pudo haber sido responsable para su dispersión en norte, centro y el sur de América (Pozio, 1995); aunado a ello, los diferentes hábitos alimenticios, culturales, incluyendo el consumo de carne cruda o mal cocida de diferente origen animal, representan los principales factores que favorecen la infección humana en países en desarrollo y desarrollados, en donde la manipulación o preparación de los alimentos junto con las pobres condiciones sanitarias así como la falta de controles veterinarios puede facilitar la ocurrencia de la más importante zoonosis transmitida por los alimentos (Bruschi, 2012; Kappel, 2000; Murrell y Pozio, 2000;).

Epidemiológicamente la triquinelosis tiene zonas endémicas más o menos definidas con algunas áreas en donde la prevalencia es mayor. Generalmente, la enfermedad en el hombre se presenta como brotes bien definidos por el antecedente de ingestión de carne infestada (Bari *et al.*, 1990). Se ha estimado que cada año ocurren 10,000 casos de triquinelosis mundialmente (CDC, 2012) y cabe mencionar, que la mayoría de los reportes epidemiológicos y evaluaciones sobre éstos parásitos en animales domésticos y silvestres están relacionados con los brotes en humanos (Pozio, 2007).

Considerando todos los países del mundo, las infecciones por *T. spiralis* en animales domésticos (principalmente el cerdo) han sido documentadas en 43 países (21.9 %), mientras que las infecciones en la fauna silvestre han sido documentadas en 66 países (33.3 %) en animales como: jabalí (*Sus scrofa*), zorro (*Pseudalopex gracilis*), armadillo (*Chaetophractus villosus*), zarigüeya (*Didelphis albiventris*), capibara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), zorro gris (*Lycalopex gymnocercus*), castor (*Myocastor coypus*), zorrillo (*Conepatus chinga*) hurón

menor (*Galictis cuja*), gato silvestre (*Felis geoffroyi*) y puma (*Puma concolor*) y en animales sinantrópicos como la rata gris (*Rattus norvegicus*) y ratón (*Mus musculus*) (Bruschi, 2012; Ribicich *et al.*, 2010).

Por otra parte, la triquinelosis humana ha sido reportada en 55 países (27.8 %) del mundo (Pozio, 2007); también se han registrado brotes humanos en Asia y África ocasionados por distintas fuentes de infección de *Trichinella* como la rata de campo, perros e incluso gatos (Dupouy-Camet, 2000); por lo tanto, la triquinelosis sigue siendo una preocupación para trabajadores de la salud pública en todo el mundo, ya que ha sido reportada, incluso, en esquimales del Ártico de Canadá, pobladores de Thai y Laotian, viajeros de África, Turquía, Egipto, Asia, antigua Yugoslavia, México, Groenlandia y en agricultores de Argentina, Polonia, Croacia, Rusia, Rumania y China (Dupouy-Camet, 2000). Dicha parasitosis no solo es un problema de salud pública por la afección a los humanos, sino que también representa un problema económico en la producción animal porcina y la seguridad alimenticia (Gottstein *et al.*, 2009). Debido a la predominante importancia de la infección zoonótica, los principales esfuerzos en muchos países se han enfocado en el control o la eliminación de *Trichinella* de la cadena alimenticia. La figura 7 muestra la distribución geográfica de los taxos de *Trichinella* en el mundo.

Actualmente se sabe que la triquinelosis es frecuente donde el cerdo (doméstico o salvaje) es un componente importante en la dieta, por lo tanto, el más importante recurso de la infección humana en todo el mundo es el cerdo doméstico (Bruschi, 2002), pero, por ejemplo, en los países industrializados de Europa como Francia e Italia la carne de caballo (considerado un hospedador inusual) y de jabalíes han jugado un papel importante en los brotes durante las pasadas tres décadas. Aunque los bovinos podrían ser excepcionalmente infectados (Murrel, 1994), ellos nunca han sido involucrados en brotes. Cabe mencionar, que los recientes incrementos en la prevalencia e incidencia han sido observados en varias granjas en los países del noreste de Europa, la cual se ha considerado como zona epidémica

debido a que se presentan casos frecuentes. Tales incrementos han sido relacionados principalmente a una reducida eficacia de los controles veterinarios en la producción de animales susceptibles a la infección así como en la importación de carne de países donde la triquinelosis es endémica (Dupouy-Camet, 2000; Gottstein *et al.*, 2009). Esto representa un serio problema para el comercio de la carne dentro de la Unión Europea y para la exportación de cerdos a los países externos a la Unión Europea (Gottstein *et al.*, 2009).

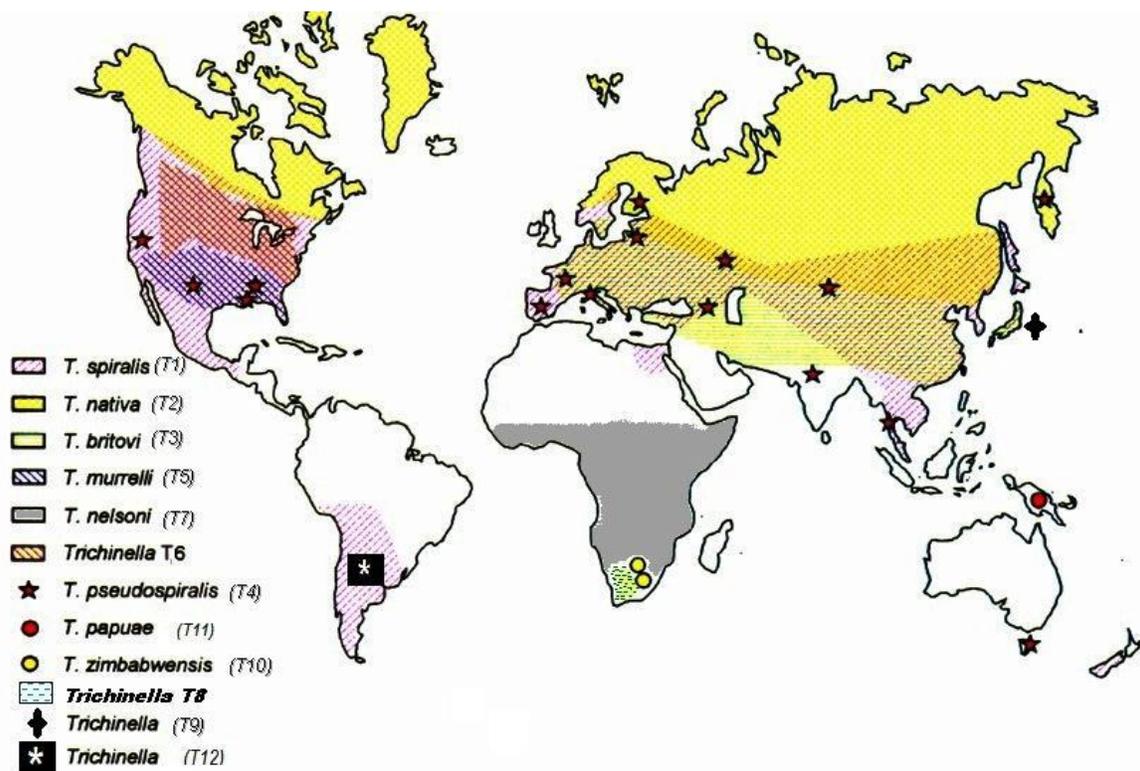


Figura. 7. Distribución del género *Trichinella* en el mundo. El mapa muestra la distribución mundial de los 12 tipos genéticos del género *Trichinella* (de la Rosa, 2012).

En centro y sudamérica el agente etiológico de los casos y brotes de las infecciones de *Trichinella* en humanos y animales que se ha documentado, ha sido *T. spiralis*, sin embargo, solo en unos cuantos casos había sido identificada apropiadamente la especie del parásito.

Dichos reportes se han registrado en varios estados de México así como en varias provincias de Argentina y en varias regiones de Chile, Bolivia, Uruguay y Venezuela (Ortega *et al.*, 2000).

En México, aunque no existen datos precisos sobre la prevalencia y distribución de ésta parasitosis, se ha documentado la aparición de casos y brotes epidemiológicos aislados en: humano, cerdo, caballo, rata, gato y perro en diferentes entidades federativas del territorio nacional (figura 8), prevaleciendo los estados de Zacatecas, Estado de México, Durango y Ciudad de México (de la Rosa y Beltrán, 1996; Ortega *et al.*, 2000). En las investigaciones de dichos reportes epidemiológicos identificaron, al igual que en varias partes de todo el mundo que los cerdos también son la fuente de infección humana más importante, como ocurre en varias localidades hoy en día, debido a que muchos de éstos animales se crían en traspatio alimentados con restos y cadáveres de roedores carroñeros (de la Rosa y Correa, 1996.; Quiroz y Landeros, 1988). De hecho, Martínez-Marañón (1985) sugirió que las costumbres de las poblaciones humanas favorecen la transmisión del helminto, ya que, por un lado se crean cotidianamente basureros dentro y fuera de los poblados en los que se depositan desechos alimenticios y de animales muertos y por otro, la red de carreteras en zonas rurales y forestales ha incrementado la tasa de mortalidad en animales silvestres y domésticos porque son arrollados por los automóviles que por ahí transitan; de esta manera los cadáveres quedan expuestos al consumo de animales que deambulan libremente como el perro, cerdo y algunos roedores.



Figura 8. Estados de la República Mexicana con brotes de triquinelosis humana y en otros animales reportados. Los estados con alta prevalencia (■) (más de 100 casos reportados desde 1895 a la fecha) incluyen Durango (1), Zacatecas (2), Estado de México (3), ciudad de México (4); Los estados con mediana prevalencia (■) (entre 50 y 99 casos reportados) son: Chihuahua (5), Jalisco (6), Michoacán (7); los estados con baja prevalencia (■) (menos de 10 casos reportados)son: Aguascalientes (8), Sonora (9), Hidalgo (10), Querétaro (11), Guerrero (12), Guanajuato (13), Veracruz (14) y Nuevo León (15), según lo compilado por Ortega *et al.*, 2000. Los Estados con casos reportados entre 2001 y 2002, con excepción de San Luis Potosí, para el cual se registró la presencia de anticuerpos (de la Rosa *et al.*, 1998) (■): Baja California Sur, Sinaloa, Tabasco y Chiapas (Secretaria de Salud, 2002).

1.5 Enfermedad

La triquinelosis es considerada una parasitosis emergente/reemergente en algunos países debido a las implicaciones médicas y veterinarias que se originan por su transmisión entre humanos y animales destinados al consumo humano, como los cerdos (principalmente) y

caballos (Bruschi y Murrell., 2002). Por lo tanto, sólo los humanos son clínicamente afectados (Gottstein *et al.*, 2009) y esto puede provocar una seria morbilidad y mortalidad (Mitreva y Jasmer., 2006); aunque, al igual que otras parasitosis, la gravedad del padecimiento depende de la carga parasitaria, por ende, puede ocasionar pérdidas económicas en horas trabajo-hombre así como en la pérdida de animales destinados al consumo humano (de la Rosa y Beltrán, 1996).

1.5.1 Triquinelosis en animales domésticos

La infección por *T. spiralis* usualmente sólo es subclínica en los animales domésticos, aunque también se puede encontrar entre animales silvestres y algunos sinantrópicos, por lo tanto, se transmite entre ambos ciclos biológicos (Mitreva y Jasmer, 2006; Murrel y Pozio, 2000; Roberts *et al.*, 1994) como resultado del inapropiado manejo de los humanos en la cría de los cerdos o cuando no existe adecuado control veterinario, pues generalmente se infectan al consumir restos de otros cerdos infectados, o por otras vías de transmisión de menor importancia epidemiológica: (1) consumo de ratas infectadas; (2) consumo de heces de cerdos que previamente habían consumido carne infectada (1-2 días); (3) consumo de animales sinantrópicos o silvestres infectados y (4) por la mordedura e ingesta de la cola de cerdos infectados. Aunque el principal problema de las granjas colectivas de cerdos que ha incrementado la prevalencia de la triquinelosis doméstica en los últimos años es la fragmentación de la cría de éstos en espacios pequeños y sin supervisión veterinaria, la falta de control de ratas, y el incremento en los vertederos de basura con restos de cerdos y de animales silvestres infectados con *Trichinella* (Pozio, 2000). Esta elevada prevalencia se debe a malas condiciones socioeconómicas y a la falta de educación para prevenir éstas enfermedades parasitarias.

1.5.2 En animales silvestres

Las especies silvestres del género *Trichinella* como la especie *T. spiralis*, en animales sinantrópicos, pueden ser mantenidos en vida silvestre por años, sin algún vínculo con el ambiente de los humanos. Sin embargo, el inadecuado comportamiento humano, por ejemplo, el uso de carne de animales de caza como alimento para animales domésticos, las pobres medidas sanitarias de las granjas donde los cerdos domésticos (y jabalíes) están en contacto con animales silvestres, así como los hábitos de los cazadores en donde utilizan los esqueletos de animales carnívoros como cebo para otros carnívoros, elevan el riesgo de que se infecten los cerdos domésticos. Éstos comportamientos riesgosos han establecido nuevos focos de triquinelosis doméstica, principalmente debido a *T. spiralis*, pero algunas veces también debido a *T. pseudospiralis* y *T. britovi*. Por lo tanto, el patrón de transmisión de *T. spiralis* en vida silvestre está fuertemente relacionado a su presencia actual o previa en el hábitat doméstico (por ejemplo: el área de distribución de dicho parásito consiste en regiones con cría de porcinos) (Appleyard *et al.*, 1998). En regiones donde la prevalencia de *Trichinella* en la vida silvestre es elevada, provoca que los animales puedan estar expuestos más de una vez durante toda su vida (Pozio *et al.*, 1997 y 1998).

1.5.3 Triquinelosis en humanos

La triquinelosis humana puede presentarse como una infección de grupo, como casos esporádicos o como el primer caso índice de un brote; porque puede tener varios grados de severidad, desde asintomática hasta letal y en algunos casos puede estar acompañada de diferentes manifestaciones clínicas que enmascaran la enfermedad y hacen que se confundan con otras infecciones de microorganismos como: dengue, fiebre tifoidea, brucelosis, leptospirosis, y todas aquellas que pasan por un síndrome febril y dolor muscular (Bruschi y Murrell, 2002).

Existen casos asintomáticos y otros con sintomatología tan leve que no permiten hacer el diagnóstico adecuado. Con respecto a la dosis de infección, la dosis mínima necesaria para causar triquinosis sintomática se estima que se encuentra en el intervalo que va de 70 a 150 larvas (Murrell y Bruschi, 1994). Por lo tanto, la gravedad de la triquinosis humana depende de la especie de *Trichinella*, del número de parásitos ingeridos, de su estado evolutivo y de la intensidad de cocción de la carne (Chávez–Ruvalcaba, 2006). Básicamente, el curso clínico de la infección por *T. spiralis* en el humano comprende dos síndromes correlacionados con las fases del ciclo vital: uno gastrointestinal (durante la fase enteral) y uno febril (durante la fase parenteral) (Capo y Despommier, 1996; de la Rosa, 2012).

Por lo general, los individuos que se infectan en un brote después de comer carne contaminada son asintomáticos, al igual que la mayoría de los pacientes infectados en casos esporádicos individuales, quienes experimentan diarrea temporal y náusea (Kociecka, 1993) relacionados a la penetración de la mucosa intestinal. De esta forma, la primera semana de la fase enteral en pacientes con una infección moderada a severa está asociada con: dolor abdominal, diarrea, vómito, malestar y fiebre de bajo grado, todos estos síntomas pueden variar en severidad y duración de sólo unos pocos días (Capó y Despommier, 1996; Murrell y Bruschi, 1994) incluso la diarrea puede extenderse hasta la fase parenteral y algunas veces la enteritis provoca la muerte (Bruschi y Murrell, 2001; de la Rosa *et al.*, 1995). Cuando hay la sospecha clínica de una triquinosis se debe averiguar el antecedente de ingestión de carne de cerdo infestada por *T. spiralis*, lo cuál es importante en zonas endémicas. Entre el momento de la ingestión de carne infestada y la aparición de síntomas transcurre generalmente de una a dos semanas PI (Botero y Restrepo, 1992), aunque algunas veces puede durar de dos a siete semanas, ya que las alteraciones intestinales se desarrollan en varias etapas de la invasión (de la Rosa y Correa, 1996; Kociecka, 2000).

De la segunda hasta la sexta semana PI, la fase enteral está aún presente, pero los síntomas que se correlacionan con la etapa intestinal se abaten (Capó y Despommier, 1996). Durante

la fase parenteral los signos y síntomas que se presentan, son debido a la migración de las LM así como a la invasión de las células musculares (Murrell y Bruschi, 1994), por ende, los músculos son los más afectados, incluido el miocardio (taquicardias en infección masiva), aunque también puede haber trastornos del sistema nervioso central, los pulmones (trastornos respiratorios en infección masiva), los riñones y la piel. El síndrome se caracteriza por edema facial o periorbital, mialgia, fiebre persistente, cefalea, hemorragias y petequias subconjuntivales, anorexia y dolor de cabeza. La invasión de las células musculares por las LRN causan síntomas que emiten a la polimiositis. Los músculos de la respiración, el habla, la masticación y la deglución pueden resultar afectados (debilidad muscular). La fiebre es por lo general, remitente, aumenta hasta los 39 °C o más, se mantiene elevada durante varios días y después cede gradualmente (de la Rosa y Correa, 1996; Gottstein *et al.*, 2009).

Por lo tanto, el periodo de incubación, depende de la severidad de la infección pero además se ha observado que en las formas más severas, el periodo de incubación generalmente es más corto. Específicamente cuando el tiempo de incubación es de una semana se trata de una triquinelosis grave, cuando es de dos semanas es moderadamente grave y en los casos de tres a cuatro semanas se habla de una triquinelosis subclínica o asintomática (Dupouy-Camet, 2000).

1.6 Prevención y control

Los enfoques tradicionales para la prevención y control incluyen las medidas adecuadas para la cría de cerdos (bajo estricto control veterinario y uso de forraje certificado), inspección de los cadáveres de cerdos en los mataderos, las medidas de procesamiento para inactivar parásitos y la educación a los consumidores en cuanto a los métodos apropiados del manejo de la carne, así como del riesgo de consumo de carne cruda, y también el control de todos los animales susceptibles (domésticos y silvestres por un método de digestión artificial estandarizado en el momento del sacrificio o después de la caza) los cuales han sido

aplicados exitosamente (Dupouy-Camet, 2000; Gajhadar y Gamble, 2000; Gottstein *et al.*, 2009).

1.6.1 Prevención y control: en animales

Aunque el ciclo doméstico puede ser erradicado con estrategias apropiadas, la presencia de *T. spiralis* entre los carnívoros silvestres representa un gran recurso de infección para los cerdos domésticos que viven en la misma área (Murrell y Pozio, 2000).

La única medida que puede ser implementada para reducir la prevalencia de la infección entre la vida silvestre es informar a los cazadores para evitar que abandonen los cadáveres de animales en el campo después de desollarlos o eliminarlos y desechar las entrañas apropiadamente, ya que, de no hacerlo, se incrementa la probabilidad de transmisión a nuevos hospedadores (Pozio, 2001; Pozio *et al.*, 2001).

En países donde la infección de los cerdos ha sido prácticamente eliminada y la triquinelosis humana es poco frecuente, los métodos alternativos para continuar con la seguridad de que los cerdos se encuentren libres de *Trichinella* están siendo considerados. Uno de estos enfoques es implementar y mejorar las buenas prácticas del manejo de las granjas (la mayoría de dichas prácticas están relacionadas a la higiene en general) las cuales reducen o eliminan el riesgo de exposición de los cerdos a *Trichinella* (Gajhadar y Gamble, 2000; Gottstein *et al.*, 2009; van Knapen, 2000).

1.6.2 Prevención y control: en humanos

En países donde la inspección de carne para *Trichinella* sp. no es obligatoria, otras estrategias son aplicadas para prevenir y reducir los riesgos de infección. En Estados Unidos, por ejemplo, se recomienda a los consumidores sobre el procedimiento para el manejo apropiado de la carne (por ejemplo, la cocción, la congelación y la adecuada preparación)

para matar cualquier *Trichinella* sp. presente, se recomienda cocinar la carne a una temperatura no inferior a los 71 °C al menos durante un minuto. También se exhorta a los consumidores a congelar la carne de cerdo ya sea a -30 °C por seis días, a -23 °C por 10 días o a -15 °C por 20 días, si la carne tiene un grosor menor a los 15 cm. Éstas temperaturas pueden no ser adecuadas, como en la carne de animales de caza silvestre infectada con especies como *T. nativa*, la cual es resistente a la congelación; por lo tanto, la adecuada preparación de la carne de cerdo para matar a *Trichinella* sp. es difícil de estandarizar. La producción comercial de los productos derivados de cerdo listos para su consumo es llevada a cabo bajo estricto control de las agencias reguladoras para brindar seguridad alimenticia (Bruschi y Murrel, 2001; Gottstein *et al.*, 2009).

En México, se han hecho considerables esfuerzos respecto a la protección de los consumidores a la exposición a *T. spiralis* en la carne de cerdo, los cuales incluyen una postura obligatoria en la inspección de cadáveres de cerdos y caballos en mataderos (NOM-194-SSA1-2004). Adicionalmente, las campañas de educación a los consumidores que muestran temperaturas apropiadas de cocción, han sido creadas para representar carne potencialmente infectada y se vuelva segura para su consumo, pero tales campañas son escasamente realizadas (Ortega-Pierres *et al.*, 2000). Sin embargo, en previos reportes se ha demostrado que la cepa Mexicana de *Trichinella* es resistente a congelación por no más de tres días (Medina-Lerena *et al.*, 2009).

El diagnóstico de la triquinelosis debería ser basado en tres criterios principales: (1) hallazgos clínicos (reconocimiento de los signos y síntomas de la triquinelosis); (2) hallazgos de laboratorio (parámetros de laboratorio no específicos, como: eosinofilia y enzimas musculares, detección de anticuerpos y/o detección de larvas en una biopsia muscular) así como (3) investigación epidemiológica (identificación del recurso y origen de la infección así como estudios de brotes) (Gottstein *et al.*, 2009). De ésta manera, sólo es posible llevarlo a cabo en el período de invasión muscular, cuando se presentan manifestaciones que pueden

orientar a un diagnóstico presuntivo que debe ser confirmado por el laboratorio (Ortega-Pierres, 1995). Para apoyar el diagnóstico clínico se han planteado métodos directos (demuestran la presencia de las larvas infectivas en el músculo esquelético) e indirectos (detectan anticuerpos específicos). En el caso del diagnóstico directo existen varias técnicas parasitológicas, como la triquinoscopia (compresión de un fragmento de músculo entre dos portaobjetos y su observación en el microscopio estereoscópico), también la digestión artificial del músculo (mediante una solución de pepsina y ácido clorhídrico) y los cortes histopatológicos (Au *et al.*, 1983), cabe mencionar, que el aislamiento del tejido muscular no se puede llevar a cabo antes de los 17 a los 21 días PI debido a que la larva no es resistente aún a la digestión (Brushy y Murrell, 2001).

En cuanto a los métodos de diagnóstico indirectos, las técnicas inmunológicas han sido de gran valor para confirmar la parasitosis. El Inmunodiagnóstico se basa en la búsqueda de anticuerpos específicos en muestras de suero, usando extractos totales o antígenos purificados de la LM o larva infectiva. Actualmente, el Ensayo Inmuno-enzimático (ELISA), Inmuno-electrotransferencia (IET) o Western blot (WB), son las técnicas de diagnóstico que se usan con mayor frecuencia. Por su versatilidad, el ELISA se ha empleado para evaluar la presencia de anticuerpos en sueros provenientes de casos clínicos y de estudios epidemiológicos, teniendo una sensibilidad y especificidad entre el 76 y 94 %, respectivamente, pero existe un nuevo ELISA de placa fina el cuál presenta una especificidad y sensibilidad del 91% para ambos parámetros. Sin embargo, la desventaja reside en la imposibilidad de discriminar entre una exposición actual o pasada ya que animales inmunológicamente positivos generadores de una alta respuesta inmune pueden terminar la infección expulsando a los GA del intestino evitando así el asentamiento de la LM (García, 2011; van Knapen *et al.*, 2000). Aunque el empleo de extractos crudos le dan a esta técnica una alta sensibilidad, existe la posibilidad de que haya algunas reacciones cruzadas con otros parásitos (Au *et al.*, 1983); estas reacciones disminuyen cuando se emplean antígenos de

excreción y secreción de la LM; además, se ha propuesto que para establecer el inmunodiagnóstico certero es necesario utilizar dichos antígenos o los que contengan un epítipo de D-tivelosa (Ortega-Pierres *et al.*, 1996). Otra técnica que se apoya en la reactividad contra dichos antígenos de *T. spiralis* es el WB, la cual puede ser una técnica confirmatoria en el diagnóstico (de la Rosa, 2000; Gómez-Priego *et al.*, 2000), ya que presenta una mayor especificidad con respecto a un ELISA; debido a que los sueros de pacientes con triquinelosis reconocen un patrón antigénico característico cuando se confrontan con los productos de excreción y secreción de la LM. La utilización de este inmunoensayo para determinar la presencia de anticuerpos contra *T. spiralis* se convierte en un indicador de gran valor para identificar la enfermedad en grupos de riesgo, considerando que el suero de pacientes con triquinelosis y el de animales infectados reconoce un triplete de antígenos (45, 49 y 55 kDa) que se considera de valor diagnóstico (figura 9) (Tinoco-Velázquez *et al.*, 2002), cuya presencia o ausencia es utilizada muchas veces en la confirmación de los resultados obtenidos por ELISA.

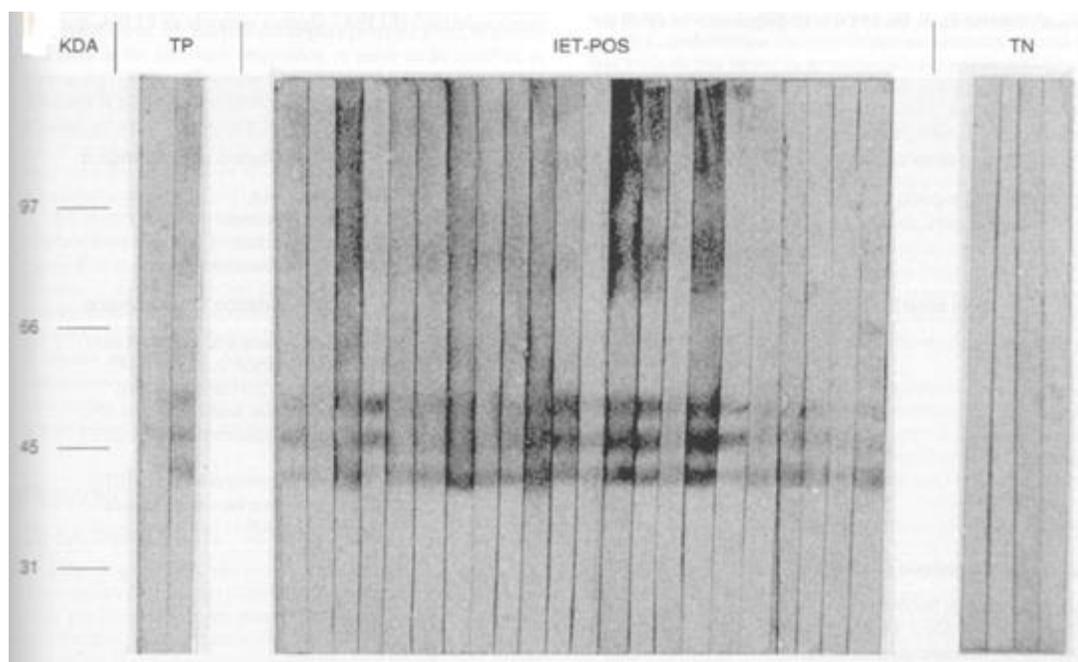


Figura 9. Inmunodiagnóstico de Trichinellosis. análisis por WB de sueros de pacientes y secreciones de los PES de las LM de *T. spiralis*. A la izquierda se muestran dos tiras de

nitrocelulosa que indican el suero testigo positivo (TP), en el centro 22 sueros de humanos (IET-POS) y a la derecha cuatro sueros testigo negativos (TN). No obstante que el patrón es homogéneo, la intensidad de la respuesta no es igual para todas las muestras (de la Rosa y Gómez, 2004).

Los métodos directos e indirectos nombrados sirven para identificar al agente de la infección como el género *Trichinella* sp. pero para identificar especies o genotipos se utiliza la técnica de PCR o sus variantes PCR – tiempo real y PCR multiplex, que detecta el ADN del parásito con una sensibilidad de 0.001 lpg (larvas por gramo). La identificación de diferentes genotipos permite hacer la distinción entre el ciclo de vida silvestre y sinantrópico. La limitante de éstas técnicas es el alto costo del equipamiento y de los reactivos. La causa de falsos positivos se relaciona con las condiciones de asepsia necesarias para evitar la contaminación con ADN no específico. La detección de ADN de LRN puede identificarse a los tres días PI en ratones infectados con 300 LM de *T. spiralis*, demostrando la posibilidad de realizar un diagnóstico temprano con esta técnica (Caballero y Jiménez, 2001). Factores como especificidad, comodidad, sencillez, disponibilidad comercial y costo deben de tomarse en cuenta al elegir la técnica diagnóstica.

En cuanto a los principales hallazgos del laboratorio utilizados para el diagnóstico son, por ejemplo, la eosinofilia, la cual comienza a los 10 días PI y luego remite en los siguientes tres meses. Las enzimas del músculo, creatinina cinasa (CPK) y lactato deshidrogenasa se elevan en un 75 a 90 % de los casos, pero no se correlacionan con la severidad de la enfermedad, sin embargo, existe una correlación entre los niveles de dichos factores que ha sido observada en los pacientes de triquinelosis, y sugiere que el daño muscular puede ser mediado por éstos granulocitos. En cambio, la hipoalbuminemia es un marcador de triquinelosis severa (Bruschi y Murrel, 2001; de la Rosa, 2012).

El objetivo del tratamiento en una infección incipiente es limitar la invasión de los tejidos por las LRN, pero cuando ya ocurrió, entonces se pretende disminuir las lesiones tisulares, causa de las principales manifestaciones clínicas. El mebendazol y el tiabendazol son los mejores

fármacos para tratar la miositis relacionadas con la triquinelosis ocasionada por *T. spiralis*; el segundo induce efectos colaterales indeseables en el 30 % de los pacientes, pero el primero es efectivo cuando el parásito ya está encapsulado (de la Rosa *et al.*, 2007); y además es uno de los antihelmínticos más eficaces del grupo imidazol y se aplica ampliamente en la medicina y en la ciencia veterinaria para el tratamiento contra la triquinelosis por *T. spiralis*.

1.7 Inmunología y antígenos

La respuesta inmune celular contra *T. spiralis* se ha estudiado básicamente en ratones y se manifiesta a través de la activación de linfocitos T cooperadores (CD4), TH2. Los linfocitos TH2 liberan interleucinas que intervienen en la activación de linfocitos B para la producción de anticuerpos y en la reacción inflamatoria. Los linfocitos TH2 producen interleucinas (IL) como IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-10 que regulan la reacción inflamatoria intestinal. La IL-5 es importante en la producción de eosinófilos, que inducen eosinofilia en el hospedador infectado; en el humano aparece en una fase temprana de la infección, antes del desarrollo de signos y síntomas clínicos, aumentando entre la segunda y quinta semana post-infección. La IL-4 ayuda la producción de IgE, ambas son elementos característicos en las infecciones parasitarias (Bruschi *et al.*, 2008).

1.7.1 Respuesta inmune intestinal

En general, la respuesta inmune protectora del hospedador que se desarrolla seguida a la infección por varios de los parásitos nemátodos que habitan en el tejido intestinal, como lo es *T. spiralis*, está mediada por los linfocitos T con fenotipo CD4+, los cuales se generan en los primeros días de infección en la mucosa intestinal (Korenaga *et al.*, 1998) para luego migrar a los nódulos mesentéricos y a las placas de Peyer (Bell, 1998), donde tienen diferentes acciones en la respuesta inflamatoria o en la respuesta mediada por anticuerpos.

Los macrófagos reconocen el antígeno del gusano adulto, pero son incapaces de migrar hacia el sitio de estimulación antigénico, probablemente por la presencia de factores

inhibidores de macrófagos, lo cual hace que se genere una respuesta celular de perfil TH2, debido al perfil de citocinas producidas, por lo que se activa de manera alterna a los macrófagos; activados de ésta forma, dichas células parecen tener funciones anti-inflamatorias (Kolodziej-Sobocinska *et al.*, 2006). Por lo tanto, durante los primeros días de infección se ha observado un incremento en la producción de citocinas características de la respuesta tipo TH2 y una disminución en las del tipo 0 y 1 (Ramaswamy, 1996). Las primeras mencionadas como IL-4 e IL-13, tienen acción importante en la respuesta protectora (Urban *et al.*, 2000); ya que activan a las células B para la producción de IgE, y estimulan su reclutamiento y transporte hacia el intestino (Ramaswamy *et al.*, 1994). Estas interleucinas también se han asociado a la inducción de la hiperplasia de mastocitos y células caliciformes, así como la liberación de sus moléculas efectoras en el lumen intestinal (Grencis *et al.*, 1991). También, IL-5 asociada a IL-9 e IgE hacen que los mastocitos y granulocitos liberen gránulos ocasionando una respuesta alérgica (Afzali *et al.*, 2009), lo que culmina en una respuesta inflamatoria contra el parásito, como se observa en la figura 10.

Se ha demostrado que (bajo la influencia de las citocinas de tipo TH2) una vez que las células caliciformes secretan moco, promueven la inmovilización del parásito durante la infección. Aunque es evidente que dicha barrera de moco no previene el establecimiento de la infección. Sin embargo, una mucina secretada por las células caliciformes (que no se encuentra normalmente en el intestino) identificada como Muc5Ac media la protección contribuyendo a la expulsión del parásito en una infección primaria, ya que, según estudios, similar al caso de *Trichuris muris*, en donde se utilizaron ratones deficientes de Mu5Ac, mostraron deficiencias en su capacidad para expulsar eficientemente a los gusanos de *T. spiralis*. Sin embargo, el mecanismo por el cual Mu5Ac media la protección aún es desconocido en su totalidad, pero puede operar directamente en el parásito (Hasnain *et al.*, 2011).

También se ha demostrado que, la inmunidad tipo TH2 (IL-4/IL-13) suscitada por la infección, activa una cascada de señalización para la transcripción de la molécula Stat6, la cual influye en la expulsión del parásito (khan *et al.*, 2001a), en la hiperplasia de las mastocitos y células caliciformes y para regular la activación y/o expresión de muchos genes responsables de IL-4, así como la producción de citocinas e IgE, a través de un receptor común: el receptor alfa IL-4 (IL-4R α) (Knight *et al.*, 2008). Para comprobar éste hallazgo, ratones deficientes de IL-4R α en células del musculo liso intestinal y STAT6 infectados con *T. spiralis* no incrementaron el número de células caliciformes y fallaron en la expulsión de los parásitos (Khan *et al.*, 2001a; Knight *et al.*, 2008).

Recientes datos han indicado que células linfoides (ILC2s) como las células NK pueden presentar antígeno a las T CD4+ a través del complejo principal de histocompatibilidad clase dos (class-II MHC) de manera restringida y soporta la visión de que la capacidad de ILC2s para mediar la expulsión de los gusanos se basa en la presencia de células T CD4+ para mantener la óptima función de ILC2s. También, recientes trabajos sugieren que las ILC2s sirven para aumentar la respuesta de células TH2 CD4+ y así la inducción de la respuesta adaptativa. Por lo tanto, una característica de ILC2s es su capacidad para producir niveles sustanciales de citocinas tipo TH2, incluyendo IL-13, IL-5, e IL-9 (Saenz *et al.*, 2010). De ésta forma, se ha demostrado que durante la fase intestinal de la infección, la respuesta TH1 es suprimida.

La finalidad de la inmunidad protectora a nivel intestinal es crear un ambiente hostil y poco propicio para los parásitos adultos en el intestino delgado y así lograr su eliminación ó expulsión (Afzali *et al.*, 2009) por lo que hay un incremento de la permeabilidad y contractibilidad del músculo liso, generando abruptos movimientos peristálticos. Sin embargo, en este caso, la inmunidad solo puede abatir el número de LRN que migran hacia el torrente sanguíneo tratando de expulsar lo más rápido posible a los gusanos adultos de *T. spiralis* (Korenaga *et al.*, 1998).

Se ha reportado que el mecanismo que media la expulsión de *T. spiralis* es dirigido contra la LM y el GA que están en contacto con el hospedador en la etapa intestinal de la infección (Bell y McGregor, 1979). Se sugiere que ésta respuesta es causada por las moléculas secretadas por la LM del parásito, conocidos como los antígenos TSL-1, los cuales pueden estar involucrados en éste proceso debido a dos cosas: a su elevada inmunogenicidad (Bolás y Corral, 2006; Yépez-Mulia *et al.*, 2007) conferida por el carbohidrato tivelosa y debido a que son liberados en el epitelio intestinal y los anticuerpos contra éstos antígenos inhiben la invasión epitelial (McVay *et al.*, 1998). En conclusión el antígeno de excreción-secreción, ayuda a la LM a penetrar el epitelio intestinal, así como el desarrollo a parásito adulto y la formación de la célula nodriza (inmunomodulador) (Takahashi, 1997).

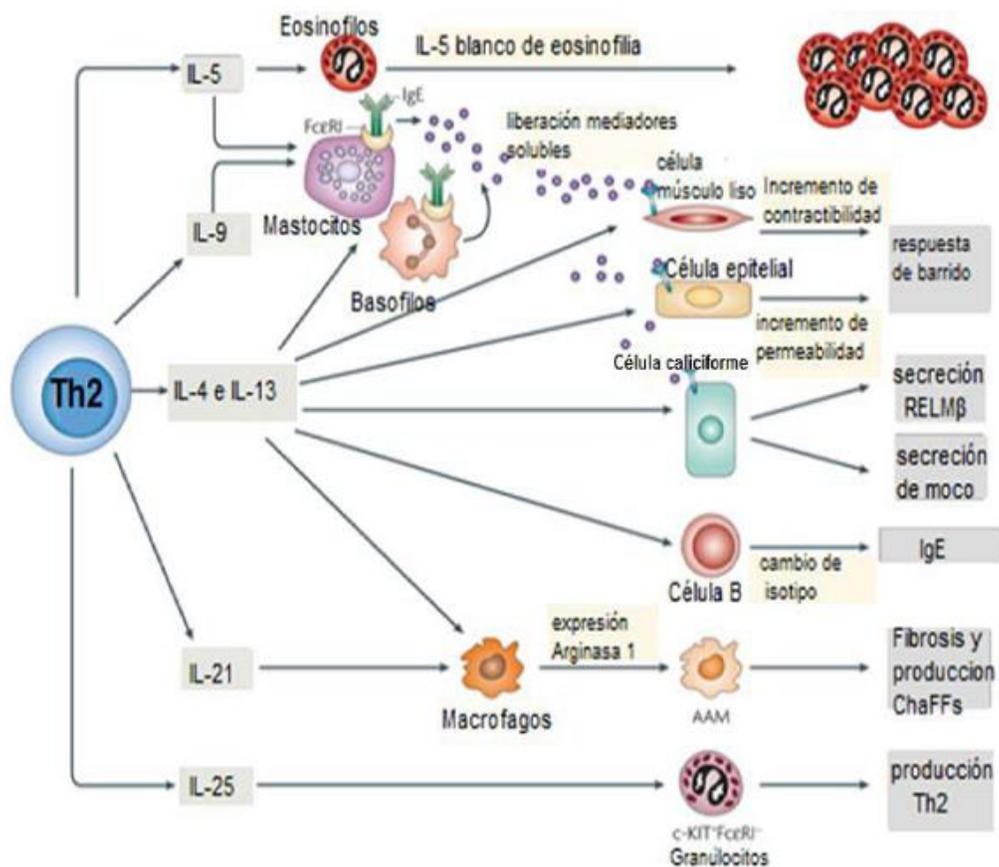


Figura 10. Funciones de las células Th2 durante la infección helmíntica. La respuesta inmune desarrollada durante la infección con muchos parásitos nematodos que habitan el tracto intestinal se caracteriza por un incremento de las citocinas producidas por células Th2, incluyendo interleucinas (IL); IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, y más tarde IL-21, IL-25, IL-31, e IL-33, las

cuales potencian el desarrollo de respuestas Th2. Asimismo, hay activación de linfocitos CD4+, granulocitos, mastocitos y macrófagos (Patel *et al.*, 2009).

1.7.2 Respuesta inmune muscular

Mientras que la inmunidad en la fase intestinal de la infección por *T. spiralis* ha sido ampliamente estudiada, la inmunidad durante la fase muscular ha recibido considerablemente menor atención.

Los parásitos encapsulados en las fibras musculares inducen una respuesta inflamatoria muy fuerte, la cuál es la responsable de la miositis típica que afecta a los pacientes durante la fase parenteral de la infección (Li y Ko, 2001). La resistencia de ésta etapa infectiva del parásito (LM) en el tejido muscular es parcialmente dependiente de células T CD4+ tipo TH2 que regulan los niveles de citocinas como la IL-5, que explica la eosinofilia tisular, la cuál rodea a los parásitos encapsulados; así como la IL-10 y TGF- β , las cuales controlan el nivel de la inflamación alrededor de la célula nodriza modificada por el parásito (Fabre *et al.*, 2009); Beiting *et al.*, 2007). También las células B manejan una potente y persistente respuesta durante la infección muscular (Fabre *et al.*, 2009).

La eosinofilia tisular se encuentra regulada por diferentes quimiocinas que actúan sobre el receptor CCR3, el cuál es altamente expresado en los eosinófilos del ser humano y del ratón. El CCR3 regula la quimotaxis y la adhesión de los eosinófilos, por lo tanto, estos granulocitos se reclutan en la mucosa del yeyuno alrededor del parásito, mientras que en el músculo esquelético se reclutan alrededor de la LM encapsulada (Gurish *et al.*, 2002).

Similar a un granuloma, el infiltrado que rodea a una célula nodriza individual es rico en macrófagos (Beiting *et al.*, 2004), pero también hay numerosos linfocitos CD4+ T, pocos CD8+ T, y también algunos linfocitos B. Los macrófagos son también observados en el citoplasma de la célula nodriza (Karmanska *et al.*, 1997) y pueden ser detectados con

anticuerpos específicos para CD11b (Beiting y Appleton, 2009, observaciones no publicadas).

Como resultado de la activación de TH1, los macrófagos pueden producir NOS2 (iNOS) la cual transforma L-arginina en óxido nítrico (NO), responsable del daño al parásito. El bloqueo de ésta enzima con inhibidores específicos genera una mejor supervivencia de la larva. En ratones genéticamente modificados, no sólo por la función del gen de la peroxidasa de eosinófilos (PHIL mice) sino también por la IL-10 (ratón con doble deficiencia IL-10-/-/PHIL), se observó una dramática reducción en la carga larvaria (93 %) comparada con los ratones deficientes únicamente de IL-10 (IL-10-/-). Además, cuando éstos animales fueron tratados con el inhibidor NOS2, en ambos grupos de ratones, las células de los nódulos linfáticos produjeron menor cantidad de NO en los cultivos y paralelamente incrementó la supervivencia de las larvas. Estos resultados muestran que la LM es dañada por una respuesta inmune tipo TH1, la cual parece ser regulada negativamente por los eosinófilos (figura 11). Ésta población de células, por lo tanto, puede jugar un papel inicial de efector o regulador en las funciones; por lo que se podría especular que el parásito induce eosinofilia para protegerse propiamente (Fabre *et al.*, 2009).

En cuanto a la respuesta humoral, se sabe que los anticuerpos específicos contra el parásito IgG1, IgG2 e IgE incrementan significativamente durante la infección muscular crónica, aunque la IgG1 domina durante toda la etapa crónica de la infección (Almond y Parkhouse, 1986). Una de las principales funciones de la IgE es la inicialización de la respuesta alérgica, la cual tiende a ser dañina para el propio hospedador; también se ha descrito que los anticuerpos específicos IgE y los niveles de IgE total, no necesariamente se encuentran incrementados en pacientes con triquinelosis (Au *et al.*, 1983).

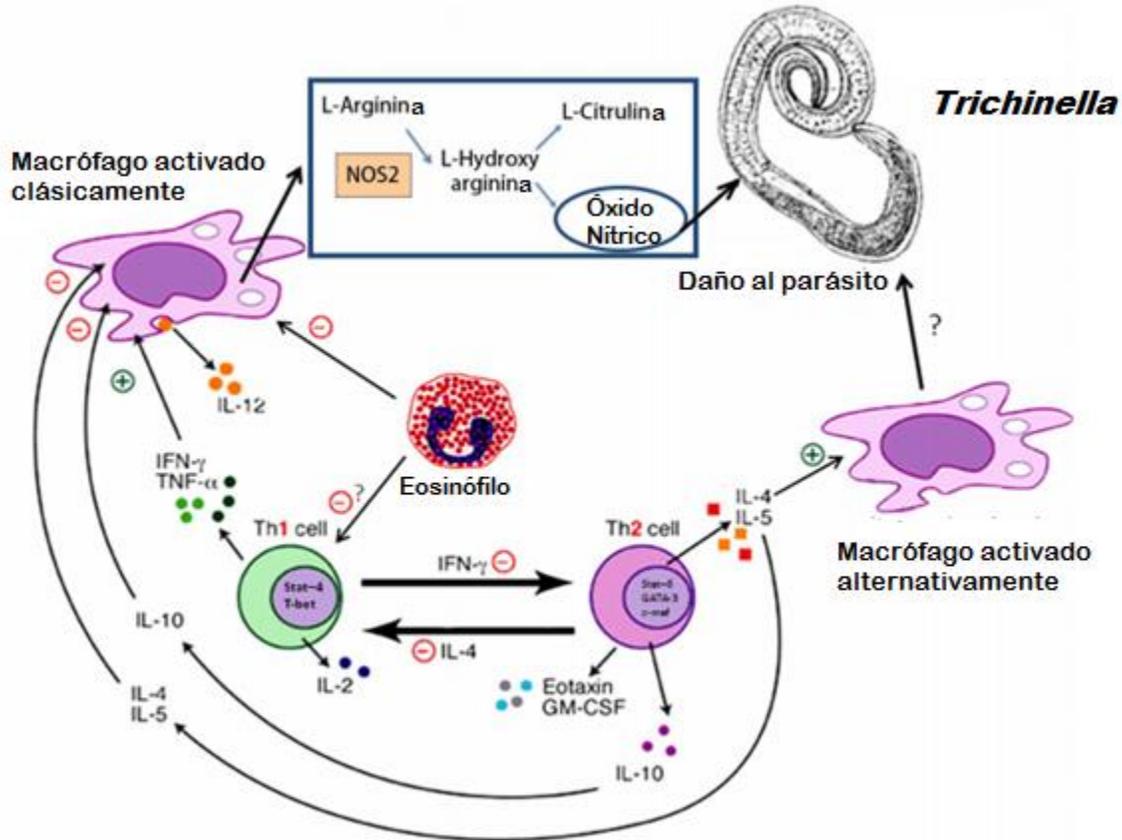


Figura 11.- *Trichinella spiralis* induce en su hospedador una diferenciación de células TH2 que inhiben la activación celular TH1 y suprime a los macrófagos activados clásicamente por la acción de IL-4, IL-5 e IL-10. En particular las citocinas TH2 como IL-4 e IL-13 actúan como suficientes estimuladores para la diferenciación de los macrófagos activados alternativamente cuyos efectos en el parásito, protegidos por la célula nodriza no son bien conocidos aún. En el modelo experimental murino manipulado genéticamente, la ausencia de eosinófilos puede influenciar a través de los diferentes mecanismos como resultado de la activación y promoción de TH1 y la consecuente activación clásica de los macrófagos. Estas células y los neutrófilos producen Óxido Nítrico por la enzima NOS2 (iNOS) y de ésta forma se provoca daño al parásito e influye en la transmisión al siguiente hospedador. Vía estimuladora (+), vía inhibitoria (-), (Fabre *et al.*, 2009).

1.7.3 Antígenos de *T. spiralis*

El estudio de los antígenos de *Trichinella* es importante no solo para la implementación de las herramientas diagnósticas y la propuesta de candidatos vacunales, sino también por el estudio de la inmunobiología en la relación hospedador-parásito. Los antígenos de *Trichinella*

han sido inmunolocalizados en todos los estadios de desarrollo del parásito (Dea-Ayuela y Bolas-Fernández, 1999). Una de las clasificaciones que se ha hecho de éstos antígenos se basa en el momento en que son reconocidos por el hospedador durante el ciclo de vida de *Trichinella*. (1) Antígenos de respuesta rápida o del grupo I y que comprenden estructuras internas, éstos antígenos son detectados desde la primera-segunda semana PI. (2) Antígenos de respuesta tardía o del grupo II, presentes sobre la superficie de la LM y en el esticosoma, éstos son detectados a partir de la tercera-cuarta semana PI (Bolas y Corral., 2006). Los antígenos de superficie representan el blanco principal de los anticuerpos mediante procesos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Venturiello *et al.*, 2000; Takahashi, 1997).

1.7.4 Productos de excreción y secreción (PES) de la larva muscular de *T. spiralis*

Trichinella, como cualquier otro nematodo de la clase *Adenophorea*, posee un órgano excretor denominado esticosoma donde las células o esticocitos, se distinguen en cinco tipos diferentes de acuerdo a su morfología ultraestructural (Despommier, 1998; Silberstein y Despommier, 1984). Los diferentes antígenos de la LM fueron clasificados en ocho grupos (los grupos de la larva de *Trichinella spiralis*), TSL-1 al TSL-8. Durante el ciclo de vida de este parásito, los componentes que producen una respuesta inmune protectora, así como su uso en el diagnóstico de humanos y animales infectados con *Trichinella*, los hacen de interés particular para los científicos (Yépez-Mulia *et al.*, 2007). De acuerdo con esto, las glicoproteínas referidas como TSL-1 han sido ampliamente estudiadas y estos antígenos han demostrado que participan en la inducción de la respuesta inmune clave que protege al hospedador de la subsecuente infección con *T. spiralis*. Tales proteínas antigénicas TSL-1 (45-100 kDa) son abundantes tanto en la superficie de la cutícula del parásito como liberadas en los productos de excreción y secreción (PES) por la LM en el epitelio intestinal y también cuando dicho estadio habita en las células musculares, sugiriendo un papel funcional en el parasitismo (Ortega-Pierres *et al.*, 1995; Yépez-Mulia *et al.*, 2007). Muchas de estas proteínas

están glicosiladas con la beta-tielosa, la cual se presenta únicamente en el género *Trichinella* (Ellis *et al.*, 1997). Los PES también son producidos por los gusanos adultos (Despommier, 1998) y se considera que estos son antígenos de respuesta tardía (Bolas y Corral, 2006).

1.7.5 Antígenos somáticos

Estos antígenos somáticos que pertenecen al grupo I o de respuesta rápida, han sido los menos estudiados ya que su valor diagnóstico es reducido por la reacción cruzada con muchos antígenos presentes en otros parásitos. Sin embargo, considerando que se producen anticuerpos rápidamente contra estos antígenos (dentro de las dos SPI), su estudio no debería ser menos apreciado en la relación hospedador-parásito (Takahashi, 1997). Un epítipo ampliamente caracterizado y que se distribuye en las estructuras internas, tanto de la LM como del gusano adulto es la fosforilcolina. Esta molécula se encuentra presente en muchos nemátodos (Dzik, 2006) y es la responsable de las reacciones cruzadas que se observan en los procesos de diagnóstico inmunoenzimático.

1.8 Perspectivas de vacunación

Se han llevado a cabo varios intentos para inducir protección contra la infección por *Trichinella* con resultados prometedores, pero hasta el momento no hay una vacuna disponible. Se han empleado desde LM vivas, atenuadas por radiación o congeladas, con las cuales se ha obtenido una protección parcial en ratones, ratas o cerdos infectados de manera experimental; sin embargo, esta estrategia en estudios de campo no ha tenido resultados exitosos (Bruschi, 2002). Los estudios actuales sobre protección abordan el efecto de los antígenos obtenidos de los diferentes estadios de desarrollo del parásito, ya sean somáticos o metabólicos.

La respuesta inmune ante la infección por *T. spiralis* ha sido estudiada en ratas previamente inmunizadas, cuyo resultado se conoce como expulsión rápida de las larvas, la cual es mediada por anticuerpos (McVay *et al.*, 1998), pero también se ha demostrado que las crías de ratas amamantadas por una rata infectada por *Trichinella* también expresan la rápida

expulsión (Appleton y McGregor, 1984); ya que se ha reportado que los anticuerpos IgG1 en suero de dicha rata infectada son protectores para las crías (Appleton y McGregor, 1987). También se ha demostrado que mAb de rata específicos contra los PES de la LM de las subclases IgG1 e IgG2c fueron fuertemente protectores, por lo tanto, tienen la capacidad para lograr una expulsión rápida tanto como del 94 % de una infección de reto en las crías lactantes como presas de una previa inmunización pasiva (Appleton *et al.*, 1988).

Se ha demostrado que los anticuerpos protectores son específicos para un epítipo carbohidrato (tivelosa), el cual está presente en las glicoproteínas mostradas en la superficie del parásito así como en los PES (colectivamente llamados antígenos TSL-1) (Ellis *et al.*, 1997). Por lo que previos estudios han reportado evidencia de que los anticuerpos específicos contra glicanos median la expulsión por interferencia directa con el parásito en el epitelio intestinal (ManWarren *et al.*, 1997). Esto sugiere que las glicoproteínas blanco u objetivo, pueden mediar la invasión o facilitar la migración del parásito en el epitelio, un ejemplo de esto fue reportado por Appleton *et al.* (1998) en ratas neonatales lactantes, en las que emplearon anticuerpos monoclonales específicos contra tivelosa, los cuales regulan la expulsión de la larva del epitelio intestinal, y también en un ensayo *in vitro* de invasión de células epiteliales, las proteínas de superficie en las larvas vivientes (LM) de *T. spiralis* fueron biotiniladas para distinguirlas de los PES. Las larvas fueron biotiniladas y no biotiniladas y además cocultivadas con Avidina, anticuerpos específicos contra biotina y mAb anti-tivelosa. Las larvas Biotiniladas cultivadas con Avidina o anticuerpos específicos contra biotina invadieron las células caninas de riñón Madin-Darby (MDCK) tanto, como las larvas biotiniladas cultivadas con medio únicamente. Los mAb anti-tivelosa fueron altamente protectores en éste ensayo, sin embargo, la biotinilización de la superficie de las larvas obstaculizó la capacidad de los mAb anti-tivelosa para prevenir la invasión de las células epiteliales. Esto fue correlacionado con una reducción en la unión de los anticuerpos anti-tivelosa con la superficie biotinilada de las larvas. Estos resultados indican que la unión de los anticuerpos a las glicoproteínas de superficie contribuye a la protección contra la invasión de

dicho parásito, pero, esa sola unión no es suficiente para la protección. Estos hallazgos soportan la idea de que la protección es efectuada por el vínculo entre los PES y los antígenos de superficie de la LM.

La respuesta inmune mucosa actúa como la primera barrera de defensa contra *T. spiralis*, por lo que Inaba *et al* (2003) evaluaron el papel del anticuerpo IgA en la expulsión de *Trichinella* del intestino, a partir de un mAb IgA (HUSM-Tb1) producido de las células de los nódulos linfáticos mesentéricos (MLN) de ratones vacunados con LM de *T. britovi* irradiadas. HUSM-Tb1 formó inmunoprecipitados en la superficie de LM vivas, también, por inmunohistoquímica reaccionó con los esticositos y antígenos de la superficie cuticular, pero no reaccionó con los tejidos del estadio GA ni de LRN. Además, la inyección intraperitoneal de ratones BALB/c con éste mAb cinco horas antes de la infección de reto, proporcionó un elevado nivel de protección (más del 95 %) contra la infección de *T. britovi*, cuando se le dio a los ratones dos mg de IgA específico por 20 g de peso (a cada animal). El mismo tratamiento produjo un efecto similar en ratones SCID carentes de células B y T funcionales, indicando que no se requiere de un factor sinérgico con las células T para lograr éste efecto. Por lo que se concluyó que la respuesta humoral IgA de mucosa, cuando es adecuadamente inducida, puede impedir el establecimiento del parásito *Trichinella* en el intestino del ratón. Además, algunos estudios han mostrado que la región intestinal de animales infectados produjeron anticuerpos específicos contra *T. spiralis*, y la IgA mucosa media la inmunidad protectora (Pei Liu *et al.*, 2015).

En distintos estudios de protección contra *Trichinella*, se han empleado los antígenos con diferentes sustancias adyuvantes. Aunque, cabe mencionar que la inmunización oral que se logra estimular ha sido ineficaz sin adyuvantes (Robinson *et al.*, 1995). Sin embargo, la vacunación intranasal ha resultado más efectiva y requiere pequeñas dosis de vacunación (McGuire, 2002). Los antígenos proteínicos solubles dados solos para inmunizar por vía nasal pueden no inducir una respuesta efectiva, pero la inmunidad es aumentada por el uso de la

subunidad B de la toxina del cólera (CTB) (Holmgren *et al.*, 1994). Por ejemplo, McGuire *et al.*, en 2002, inmunizaron ratones por vía intranasal con el péptido Gp43 de *Trichinella* junto con la toxina B del cólera como adyuvante; esto indujo inmunidad protectora contra la infección por *T. spiralis* acompañada por la secreción de IgG1 específica de antígeno así como IgA mucosa y respuesta de citocinas de perfil TH2 como IL-5. De esta forma, la inmunización intranasal generó una respuesta mediada tipo TH2 para la inmunidad contra dicho parásito.

En la última década, otra estrategia de vacunación probada por Dea- Ayuela *et al.*, (2006) ha sido la administración oral de antígenos de LM de *T. spiralis* con microcápsulas de un copolímero de ácido metacrílico (Eudragit L100), resultando en la estimulación de IFN-gamma y en la inhibición de la producción de IL-4 en bazo y en nódulos linfáticos mesentéricos de ratones BALB/c. La vacunación oral incremento la cantidad de IgG1 e IgA, así como la respuesta de IgA específica de antígeno en los nódulos linfáticos mesentéricos. Estos resultados hipotetizan una respuesta concurrente Th1/Th2 local y sistémica que es protectora y que al mismo tiempo ayuda a balancear la respuesta Th2 ocasionada por las infecciones helmínticas.

1.9 Nanopartículas

Hoy día comienzan a utilizarse de modo habitual técnicas experimentales que permiten fabricar, caracterizar y manipular nanopartículas. Éstas constituyen en la actualidad un área de intensa investigación científica, ya que tienen la capacidad de suministrar una amplia gama de compuestos por periodos de tiempo sostenido como sistemas de liberación de fármacos, por lo tanto, tienen un enorme potencial para el desarrollo de vacunas orales ante cualquier enfermedad infecciosa (Llabot *et al.*, 2008). Algunos aspectos que se consideran al utilizar sistemas de liberación de fármacos son: que los acarreadores poliméricos deberían ser económicos, fáciles de sintetizar y de caracterizar, biocompatibles, biodegradables, no inmunogénicos, no tóxicos y solubles en agua (Illum *et al.*, 2001). Por lo tanto, un buen acarreador juega un papel significativo en resolver éstos problemas. El quitosano es un

polisacárido biocompatible catiónico construido por unidades repetidas o monómeros de N-acetil-D-glucosamina y glucosamina, derivado de la desacetilación parcial de la quitina, un polisacárido natural extraído del exoesqueleto de escarabajos y de los crustáceos, aunque también se encuentra en algunos microorganismos como levaduras y hongos (Illum *et al.*, 2001; Porporatto *et al.*, 2005). Éste biopolímero ha sido administrado tanto a animales de laboratorio como a los humanos por varias rutas sin mostrar efectos tóxicos, por ejemplo como fibra dietética, sin daño alguno (Porporatto *et al.*, 2009; Walsh *et al.*, 2013). Distintos estudios han demostrado que las micro y nanopartículas de quitosano pueden ser obtenidas fácilmente, por lo que ha sido estudiado como un polímero mucoadhesivo y eficiente transportador de fármacos, químicos anti-cancerígenos, proteínas y lo hace por distintas vías de administración incluyendo: oral, nasal, intravenosa y ocular, además, se ha reportado que aumenta la absorción de los péptidos y proteínas administrados por las vías oral (van der Lubben *et al.*, 2003) y nasal (Baudner *et al.*, 2003), (JunJieWang *et al.*, 2011; Thanou *et al.*, 2001), por lo tanto representa una nueva generación de sistemas para la liberación de antígenos (Porporatto *et al.*, 2005; Thanou *et al.*, 2001).

Una importante característica de las nanopartículas de quitosano es que son partículas coloides solidas de 10 a 1000 nm que atrapan a la molécula bioactiva. En comparación con las partículas del tamaño de las micras, las nanopartículas tienen fuerte motilidad debido a su pequeño tamaño y pueden entrar a las células fácilmente para acumularse en el sitio de la lesión u objetivo, o también a través de las uniones estrechas epiteliales (JunJieWang *et al.*, 2011; Llabot *et al.*, 2008).

Coadministrado con antígenos protéicos, el quitosano modifica el consumo y la distribución del antígeno, y también aumenta la liberación de citocinas reguladoras asociadas a la estimulación específica de antígeno después del consumo (Porporatto *et al.*, 2004). Los antígenos coadministrados o encapsulados con el polisacárido generan una mejor respuesta inmune humoral sistémica y mucosal, aunque el mecanismo está pobremente entendido

(Porporatto *et al.*, 2005; van der Lubben *et al.*, 2003). Sin embargo, en algunos estudios se ha demostrado que la administración oral del quitosano junto con proteínas, promueve la inducción de tolerancia hacia el antígeno. Aunque también se ha reportado en estudios previos sobre el comportamiento del quitosano en la mucosa intestinal que induce mayormente el incremento de citocinas inmunoregulatoras/supresoras como IL-4, IL-10 y TGF- β disminuyendo los niveles de otras citocinas inflamatorias (Porporatto *et al.*, 2004 y 2005).

2. JUSTIFICACIÓN

Los estudios actuales sobre protección en la infección por *T. spiralis* abordan el efecto de los antígenos obtenidos de los diferentes estadios de desarrollo del parásito, sin embargo, en distintos estudios se han utilizado los antígenos de excreción y secreción de la LM, solos y en asociación con diferentes adyuvantes. También se han llevado a cabo varios intentos para inducir protección contra la infección por *Trichinella*, con resultados prometedores, pero hasta el momento no hay una vacuna disponible porque hay protección parcial y una respuesta inmune polarizada hacia Th2. Por lo tanto, el quitosano al presentar características de un polímero natural, carecer de alergenicidad, es biodegradable, con propiedad adyuvante, es mucoadhesivo y también tiene la capacidad de transportar y liberar fármacos o proteínas de manera controlada, así como de favorecer la absorción de proteínas a través del epitelio, (Dina Nath *et al.*, 2010; Porporatto *et al.*, 2005). Todas estas características lo hacen un candidato prometedor como acarreador de antígenos, es por ello que queremos conocer el efecto de dichas nanopartículas al transportar los PES de la LM de *T. spiralis* al intestino de ratones, cuando son administradas por vía oral. Ya que, si se transportan y liberan dichos antígenos del parásito en el intestino delgado, lograremos estimular la respuesta inmune humoral y posteriormente, al llevar a cabo una infección de reto, estará la respuesta inmune esperando a la LM de dicho nemátodo para su expulsión, pues se conoce que el bloqueo de

los PES inhibe la penetración de la LM a los enterocitos del intestino, evitando así que el nemátodo continúe con su ciclo de vida (Appleton *et al.*, 1988).

Por las razones arriba mencionadas, el presente estudio consistió en evaluar el efecto adyuvante de las nanopartículas de quitosano durante la inmunización de ratones con los productos de excreción y secreción de la LM de *T. spiralis*, pues se sabe que dichas nanopartículas se adhieren y absorben al epitelio intestinal y, de esta forma, determinar por medio de la respuesta inmune los niveles de anticuerpos y citocinas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad adyuvante de las nanopartículas de quitosano durante la inmunización de ratones con los productos de excreción y secreción de *Trichinella spiralis*.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Propagar la cepa MSUS/ME/92/CM-92 de *T. spiralis* en ratas Wistar y obtener los productos de excreción y secreción de la LM.
- 2.- Preparar formulaciones de nanopartículas con los productos de excreción y secreción de la LM de *T. spiralis* para la inmunización por vía oral de ratones CD1.
- 3.- Inmunizar y evaluar la producción de anticuerpos séricos (IgG).
- 4.- Posteriormente realizar Infección de reto con LM de *T. spiralis* y evaluar el porcentaje de protección (GA) a los siete días PI, así como la carga larvaria a los 45 días PI.
- 5.- Determinar los niveles de IgA en suero, heces y lavados intestinales.
- 6.- Evaluar los niveles de las citocinas séricas IL-4 e INF- γ .

4. DISEÑO EXPERIMENTAL

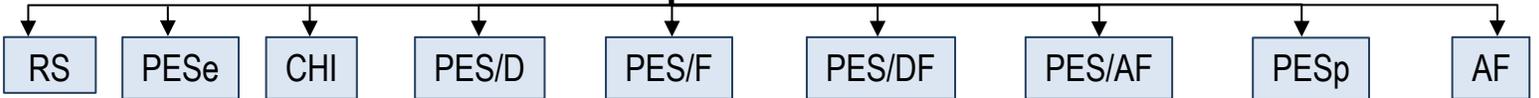
A)

ratas infectadas con
Trichinella spiralis
MSUS/ME/92/CM-92

Obtención de los productos de
excreción y secreción (PES)

nanoparticulas de
quitosano

Imunización (cuatro semanas)



Muestras sanguíneas

Infección experimental con LM de *T. spiralis*

Siete días PI

Evaluar carga parasitaria

45 días PI

Evaluar respuesta inmune

gusanos adultos
(GA)

larva muscular
(LM)

IgG/IgA

IL-4/IFN- γ

B)

RS	Ratones sanos, control negativo (-)
PESe	Productos de excreción y secreción por vía enteral.
CHI	Nanopartículas de Quitosano (sin antígeno) por vía oral.
PES/D	Nanopartículas con Productos de excreción y secreción por dentro.
PES/F	Nanopartículas con Productos de excreción y secreción por fuera.
PES/DF	Nanopartículas con Productos de excreción y secreción por fuera y dentro.
PES/AF	Productos de excreción y secreción con Adyuvante de Freund por vía intraperitoneal (+)
PESp	Productos de excreción y secreción por vía intraperitoneal (+)
AF	Adyuvante de Freund por vía intraperitoneal

Figura 12. Esquema del diseño experimental (A) y la descripción de los grupos experimentales (B); los cuatro grupos que recibieron las formulaciones de nanopartículas fue por vía oral.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 **Mantenimiento de *Trichinella spiralis*.** La cepa MSUS/ME/92/CM-92 de *T. spiralis* se propagó por infección oral con 7,000 larvas musculares, í. e., 23 larvas por gramo de peso, equivalente a una infección masiva en ratas Wistar de sexo indistinto, de ocho semanas de edad y 250 gramos de peso. Los animales se albergaron por 45 días (es decir, una vez terminado el ciclo biológico del parásito) en jaulas de plástico de 37.5 cm x 21.5 cm x 18.5 cm con aserrín estéril y se alimentaron *ad libitum* con agua y alimento condensado, ambos estériles en el Bioterio del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), de la Secretaria de Salud (de la Rosa, 2012). Todos los procesos realizados en la metodología de trabajo fueron efectuados según la NOM-062-ZOO-1999 "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio".

5.2 **Digestión artificial para la obtención de las LM de *T. spiralis*.** Los animales se sacrificaron con vapores de éter. Se retiró la piel, las vísceras y la cabeza, pero se colectaron los músculos maseteros, el diafragma y la lengua. El canal se lavó con agua de la llave para eliminar los residuos de sangre, luego se seccionó en fragmentos de 0.3 cm³ y cada gramo de carne se mezcló con 0.1 g de pepsina, 0.1 ml de HCl con una pureza de 38 % y 10 ml de agua destilada. La mezcla se agitó de manera continua durante 4 horas a 37 °C. Al término, la

solución de digestión se vertió a través de una gasa colocada en la boca de un embudo de precipitación. Después de 20 minutos se colectaron las LM de *T. spiralis* sedimentadas. Las larvas se lavaron cuatro veces con una solución de PBS al 0.01 M con NaCl 0.015 M pH 7.2; para descartar el sobrenadante, se centrifugo a 2500 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. Con una pipeta Pasteur se extrajo el excedente de tejido o detritos. Finalmente, las larvas se sometieron a un gradiente trifásico de dextrosa (20, 40 y 80 %), para limpiarlas de los restos de tejido. Las larvas se obtuvieron entre las fases de 20 y 40 %, luego se repitieron los lavados con PBS para eliminar el exceso de dextrosa. Finalmente las larvas se resuspendieron en 5 ml de PBS. Para conocer el número de parásitos obtenidos, el tubo que las contenía se agito de manera manual fuertemente por 10 segundos y se tomaron 0.005 ml de la mitad del líquido contenido; este proceso se repitió en tres ocasiones diferentes. Las gotas se colocaron en un portaobjetos y se observaron a 10x en un microscopio óptico. Se contó el número de larvas por gota y se obtuvo un promedio, luego para conocer el número total de larvas se hizo una interpolación hacia el volumen donde se encontraban el resto de las larvas (de la Rosa, 2012; Ramírez-Melgar *et al.*, 2007).

5.3 Obtención de los productos de excreción y secreción de *T. spiralis*. Una vez que las LM se obtuvieron se hicieron cinco lavados con PBS estéril que contenía una mezcla de antibióticos (500 U/ml de penicilina, 500 µg/ml de estreptomicina y 1.25 µg/ml de Anfotericina B, los lavados se hicieron agitando el tubo fuertemente por 10 segundos y luego centrifugando a 2500 rpm durante tres minutos a temperatura ambiente; el sobrenadante se descartó en cada ocasión. Después se hicieron dos lavados con medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco; NY, USA) que contenía 2 g/l de bicarbonato de sodio, 2 g/l de HEPES y una mezcla de antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 0.25 µg/ml de Anfotericina B, ajustando el pH a 7.2. Las LM se cultivaron en cajas para cultivo de 50 ml (Corning; NY, USA) a 37 °C en una atmosfera de 95 % de aire y 5 % de CO₂ durante 48 horas en una proporción de 10,000 larvas por cada 0.200 ml de medio. El cultivo se revisó

diariamente en un microscopio invertido para verificar que no existiese contaminación; cada 48 horas el medio de cultivo se recuperó según virara de naranja a ámbar y se sustituyó con medio de cultivo nuevo. La recuperación del medio se realizó dos o tres veces dependiendo de la motilidad de las larvas. Posteriormente, al medio recuperado se le determinó la concentración de proteínas por el método colorimétrico de Bradford (Bio-Rad; CA, USA). Además, a cada 0.85 ml de sobrenadante de cultivo se le adicionaron 0.050 ml de TPCK (1 mg/ml en metanol), 0.050 ml de TLCK (1 mg/ml en agua), 0.040 ml de PHMB (0.04 % en NaOH 2N), 0.006 ml de PMSF (0.06 % en Isopropanol) y 0.004 ml de EDTA (1M) como inhibidores enzimáticos y el antígeno se almacenó a -20 °C hasta su uso (de la Rosa, 2012; Tinoco-Velázquez *et al.*, 2002).

5.4 Preparación de las nanopartículas. Se prepararon cuatro distintas formulaciones de nanopartículas de quitosano y PES de *T. spiralis*, las cuales consistieron como se indica en el cuadro tres, y en el cuadro cuatro se muestran totalmente los nueve grupos experimentales. El método empleado para la fabricación de las nanopartículas en el presente experimento fue por gelación iónica y para ello se empleó 0.3 g de quitosano (CHITOSAN from shrimp shells, ≥75% desacetilado, SIGMA, Saint Louis MO, USA), 0.1 g de Tripolifosfato (TPP de SIGMA ALDRICH, USA) los cuales se solubilizan cada uno en 120 ml de ácido acético glacial al 1 %. También se empleó 0.025 g de estabilizante Pluronic- F68 o Poloxamer F-68 (SIGMA, Saint Louis MO, USA) para cada una de las cuatro formulaciones, cuyo volumen final fué de 35 ml cada una. Posteriormente se emplearon cuatro matraces de 80 ml que se colocaron en cada uno de los cuatro agitadores magnéticos para su preparación de forma simultánea ya que el proceso requiere agitación constante (sin burbujas) para cada una de las formulaciones (figura 13). El orden en el que se colocaron los reactivos dependió de la formulación a preparar, como se muestra en el cuadro 2. Durante la preparación de las nanopartículas transcurrieron 15 minutos entre cada uno de los reactivos que se agregaron para cada una de las formulaciones, como se observa.

Cuadro 2. Preparación de Nanopartículas. Formulaciones para inmunizar por vía oral a los ratones y el orden en el que se agregan los reactivos para su preparación. **PES/D:** Nanopartículas con Productos de excreción y secreción por dentro; **PES/F:** Productos de excreción y secreción por fuera; **PES/DF:** Productos de excreción y secreción por fuera y dentro; **CHI:** Nanopartículas de Quitosano.

Formulaciones de las Nanopartículas				
Orden de los reactivos	PES/D	PES/F	PES/DF	CHI
Primero (15 min)	13.5 ml CHI 7 ml PES	13.5 ml CHI	13.5 ml CHI 3.5 ml PES	17 ml CHI
Segundo (15 min)	13.5 ml TPP	13.5 ml TPP	13.5 ml TPP	17 ml TPP
Tercero (15 min)	0.025 g Pluronic	0.025 g Pluronic	0.025 g Pluronic	0.025 g Pluronic
Cuarto (15 min)		7 ml PES		



Figura 13. Formulaciones de nanopartículas en donde se observa su preparación simultánea con cuatro sistemas montados individualmente y para ello se utilizaron termo-agitadores y cuatro vasos de precipitado.

5.5 ELISA (indirecto) para la evaluación de nanopartículas. Para éste ensayo se sensibilizaron los pozos de la placa de poliestireno (Costar Corning; NY, USA) con cada una de las formulaciones de las nanopartículas, y para comparar, también se sensibilizaron otros pozos

con PES de LM de *T. spiralis* diluidos a 5 µg/ml en amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.6 durante 18 horas a 4 °C. El antígeno se descartó y los pozos se lavaron tres veces con 0.300 ml de PBS adicionado con tween 20 al 0.05 % (PBS-T) en un lavador de placas de ELISA (Thermo scientific, Wash-well) y luego se bloquearon durante 1 hora a 37 °C con 0.250 ml de Albúmina Sérica Bovina al 1 % en PBS-T. Se probaron sueros hiperinmunes de ratón (-) y (+) contra dicho parásito diluidos 1:250 (en PBS-T) directo en el pozo, para cada una de las formulaciones de nanopartículas y también para los controles sensibilizados con los PES. Posteriormente se utilizó un conjugado anti-ratón IgG acoplado con peroxidasa diluido 1:1000 (Sigma Aldrich; USA) en PBS-T; se colocaron 0.050 ml por cada pozo. La reacción se puso en evidencia con 0.050 ml/pozo de una solución de cromógeno preparada con 10 ml de una solución de citrato de sodio (5 ml) 0.1 M y ácido cítrico (5 ml) 0.1 M, 0.004 g de orto fenilendiamina (Sigma Aldrich) y 0.004 ml de H₂O₂ al 30 % y la reacción se detuvo agregando a cada pozo 0.050 ml de H₂SO₄ 1N. La placa se leyó a 492 nm en un lector para ELISA (Thermo scientific, Multiskan FC) (de la Rosa, 2012).

5.6 Esquema de inmunización y sangrado. Para llevar a cabo las inmunizaciones se destinaron 90 ratones hembra de la cepa CD1, de seis a ocho semanas de edad y con un peso promedio de 30 g. Se formaron nueve grupos, cada uno con diez ratones. Los grupos tres (CHI), cuatro (PES/D), cinco (PES/F), y seis (PES/DF), recibieron por vía oral las cuatro formulaciones de nanopartículas, manejando una concentración de 1 µg/ml de los PES en un volumen total de 200 µl al día durante 20 días, (ver cuadro 3). El grupo siete (PES/AF) se inmunizó con una combinación de PES de *T. spiralis* (100 µg/ml) y adyuvante de Freund (AF) a una concentración de 5 µg/ml con una dosis semanal durante cuatro semanas como control positivo, al igual que el ocho y nueve, los cuales se inmunizaron únicamente con PES por vía intramuscular y AF (con PBS o solución amortiguadora), respectivamente, manejando la misma concentración que el grupo siete, para ello se emplearon jeringas de insulina (1 ml) y se les administro un volumen total de 0.1 ml a cada ratón vía intraperitoneal. Finalmente, el

grupo dos (PESe) al igual que el ocho recibió únicamente los PES a la misma concentración pero por vía enteral u oral. Además un grupo adicional no se inmunizó (uno), el cuál fue nuestro grupo control negativo (RS). Además todos los animales se sangraron semanalmente de manera retro-orbital para obtener el suero. Esto se hizo antes de comenzar la inmunización (muestra basal) y posteriormente se realizó cada semana durante las cuatro de la inmunización para la cinética de anticuerpos (IgG e IgA) así como para interleucinas (IFN- γ e IL-4). Los sueros se almacenaron en tubos para micro-centrífuga de dos ml a -20 °C hasta su utilización (de la Rosa, 2012).

Cuadro 3.- Descripción de los tratamientos que recibieron cada uno de los grupos experimentales.

No.	Grupo	Descripción
1	RS	Ratones sanos, control negativo (-)
2	PESe	Productos de excreción y secreción por vía oral o enteral.
3	CHI	Nanopartículas de quitosano (sin antígeno) por vía oral.
4	PES/D	Nanopartículas con productos de excreción y secreción por dentro (por vía oral).
5	PES/F	Nanopartículas con productos de excreción y secreción por fuera (por vía oral).
6	PES/DF	Nanopartículas con productos de excreción y secreción por fuera y dentro (por vía oral).
7	PES/AF	Productos de excreción y secreción con adyuvante de Freund por vía intraperitoneal (+)
8	PESp	Productos de excreción y secreción por vía intraperitoneal (+)
9	AF	Adyuvante de Freund por vía intraperitoneal

5.7 Infección Experimental. Después de las cuatro semanas de inmunización, en la quinta semana se evaluó la cinética de anticuerpos séricos IgG y se realizó la infección de reto de todos los grupos con 300 LM de *T. spiralis* cada ratón (Dea-Ayuela *et al.*, 2006).

5.8 ELISA indirecto para evaluar IgG. Los pozos de placas para ELISA (Costar Corning; NY, USA) se sensibilizaron durante 18 horas a 4 °C con 0.050 ml/pozo con los productos de excreción y secreción de la LM diluidos a 5 μ g/ml en amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.6. El antígeno se descartó y los pozos se lavaron tres veces con 0.300 ml de PBS adicionado con tween 20 al 0.05 % (PBS-T) en un lavador de placas Thermo scientific, Wash-well.

Después se bloquearon durante 1 hora a 37 °C con 0.250 ml de albúmina sérica bovina al 1 % en PBS-T. Los sueros se diluyeron 1:250 en PBS-T y se colocaron directo en el pozo, incubando a 37 °C por 60 minutos. La reacción antígeno-anticuerpo se reveló con un conjugado contra IgG de ratón acoplado con peroxidasa (Sigma Aldrich; MO, USA) diluido 1:1,000 en PBS-T, colocando 0.050 ml por pozo, e incubando a 37 °C por 60 minutos. La reacción se puso en evidencia con 0.050 ml/pozo de una solución de cromógeno preparada con 10 ml de una solución de citrato de sodio (5 ml) 0.1M y ácido cítrico (5 ml) 0.1 M, 0.004 g de orto fenilendiamina (Sigma Aldrich) y 0.004 ml de H₂O₂ al 30 % y la reacción se detuvo agregando a cada pozo 0.050 ml de H₂SO₄ 1N. La placa se leyó a 492 nm en un lector para ELISA (Thermo scientific, Multiskan FC).

5.9 Protección contra los GA de *T. spiralis* posterior a la inmunización con las nanopartículas.

Para evaluar la carga parasitaria, a los siete días PI (post-infección) se sacrificaron a cinco ratones de cada grupo experimental con vapores de éter y se utilizó la dislocación cervical; finalmente se obtuvo el intestino delgado completo, se colocó sobre una caja de Petri y se lavó con 2 ml de SSF 10 % (para la obtención de un sobrenadante que se filtró y se centrifugó a 5000 rpm durante cinco minutos y se almacenaron a -20 °C hasta su posterior evaluación contra IgA), después, se cortó todo el intestino delgado (de cada ratón) en fragmentos longitudinales de dos centímetros (Dennis *et al.*, 1970) y luego se abrieron para colocarlos en pequeños coladores y éstos a su vez en cajas de Petri con PBS en agitación constante durante tres horas en una incubadora a 37 °C (Ver fig. 14). Una vez que transcurrió éste tiempo se retiraron los coladores para buscar y contar los GA expulsados (de cada ratón) en la caja con ayuda de un microscopio invertido a 4x (ver figura 14 y 15).



Figura 14. Obtención de los gusanos adultos (GA) de *T. spiralis* al día 7 P.I. Se observa los fragmentos del intestino delgado de cada ratón sobre los coladores y estos a su vez en tapas de cajas de Petri con un poco de PBS (como se describe anteriormente) para estimular la salida de los GA y su posterior conteo.



Figura 15. Gusanos Adultos (GA) de *T. spiralis*. Macho (A) y hembra (B) obtenidos del intestino delgado de ratones al día 7 PI observados en un microscopio invertido a 4x para su conteo.

5.10 Evaluación de la carga parasitaria muscular (obtención de LM de *T. spiralis*). Al día 45 post-infección (o a la semana 11 posterior al esquema de inmunización) se sacrificó a los animales restantes (cinco) de cada grupo experimental para evaluar de forma individual la cantidad de LM que se encapsularon en los músculos como parte de su ciclo de vida (fase parenteral). Para ello se realizó la digestión artificial convencional, en donde se utilizó el diafragma, lengua y músculos maseteros (de cada ratón).

5.11 ELISA comercial para evaluar IFN- γ en sueros de ratones. Se empleó un equipo comercial de ELISA para INF- γ anti-ratón (Mouse IFN γ ELISA Kit, Thermo Scientific), el cual incluía una placa de 96 pozos previamente sensibilizada con el anticuerpo de captura contra IFN- γ , por lo tanto se agregaron directamente las muestras de suero a evaluar (50 μ l/pozo) y el estándar de la curva patrón (con éstas concentraciones 3000, 1000, 333, 111, 37, y 0 pg/ml), las cuales se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente, sin lavar, se agregó el anticuerpo de detección biotinilado (50 μ l/pozo) y se incubó una hora. Después se lavó la placa (0.300 ml/ pozo) tres veces con un buffer de lavado 30X (incluido en el kit) en un lavador de placas Thermo scientific Wash-well, después se agregó la solución de Streptavidina-HRP (100 μ l/pozo) y se incubo por 30 min. Enseguida se lavó la placa por última ocasión tres veces y se agregó la solución del sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina o TMB (100 μ l/pozo) y se dejó virar en la obscuridad durante 30 minutos hasta observar que la placa viro de rosa a azul. Por último se detuvo la reacción agregando la solución de paro (H₂SO₄ 1N) con 100 μ l/pozo con la cual se tornó amarilla la placa y se leyó la absorbancia en un lector de ELISA (Thermo Scientific, Multiskan FC) a 450 nm. Para representar los datos se realizó una regresión lineal para conocer la concentración de ésta interleucina en pg/ml en cada muestra evaluada.

5.12 ELISA comercial para evaluar IL-4 en sueros de ratones. Se utilizó un equipo comercial para ELISA (BD BIOSCIENCES, set mouse IL-4) Se sensibilizó una placa de 96 pozos NUNC

(Thermo Scientific) durante 18 horas a 4 °C con 0.050 ml/pozo del anticuerpo monoclonal de captura diluido (1:250) en Buffer de Carbonatos 0.1 M pH 9.5. Se lavaron los pozos tres veces con 0.300 ml PBS-T 0.05 % con un lavador de placas para ELISA Thermo scientific Wash-well. Se bloquearon los pozos con el diluyente de ensayo (0.200 ml) y se incubó una hora a temperatura ambiente. Se lavó tres veces, y se agregaron las muestras de suero, sin diluirse (0.080 ml) así como la curva estándar que iba de .07 a 10 pg/ml, se dejó incubar dos horas a temperatura ambiente. Después se lavó cinco veces y se agregó el anticuerpo de detección biotinilado anti-mouse IL-4, diluido 1:500 en el ensayo diluyente y luego a éste se le agregó el conjugado Streptavidina-HRP (peroxidasa) diluido 1:250 en el anticuerpo biotinilado, y se agregaron 0.100 ml/pozo. Se incubó una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó siete veces y se agregó 0.100 ml/pozo de la solución de sustrato (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina o TMB) y se incubó 30 minutos. A temperatura ambiente en la oscuridad. Transcurrido ese tiempo y cuando se observó que las muestras positivas y la curva estándar se tornó de un color rosa a azul, se detuvo la reacción con solución de paro (0.050 ml/pozo), empleándose H₂SO₄ o ácido sulfúrico 1 M y por último se leyó la placa cinco minutos después en un lector de ELISA (Thermo Scientific, Multiskan FC) a 450 nm. Para representar los datos se realizó una regresión lineal para conocer la concentración de ésta interleucina en pg/ml de cada muestra evaluada.

5.13 ELISA indirecto para evaluar IgA en suero/heces y lavados intestinales (LI) de ratones. Se sensibilizó una placa para ELISA (Thermo Scientific, Nunc) durante 18 horas a 4 °C con 0.050 ml/pozo con los PES de la LM de *T. spiralis* diluidos a 5 µg/ml en amortiguador de Carbonatos 0.1 M pH 9.6. El antígeno se descartó y los pozos se lavaron tres veces con 0.300 ml de PBS adicionado con tween 20 al 0.05 % (PBS-T) con un lavador de placas (Thermo Scientific, Wash-well) y luego se bloquearon durante 1 hora a 37 °C con 0.250 ml de albúmina sérica bovina al 1 % en PBS-T. Los sueros, sobrenadantes de heces y lavados intestinales se diluyeron 1:250 en PBS-T y se colocaron directo en el pozo, incubando a 37 °C

por 60 minutos. La reacción antígeno-anticuerpo se reveló con un conjugado IgA anti-ratón, hecho en rata con isotipo IgG sin peroxidasa (Sigma Aldrich; MO, USA) diluido 1:1,000, colocando 0.050 ml por pozo, e incubando a 37 °C por 60 minutos. Posteriormente se lavó nuevamente y se agregó un conjugado IgG anti-rata (0.050 ml/pozo), con otra incubación a 37 °C de 60 minutos. La reacción se puso en evidencia con 0.050 ml/pozo de una solución de cromógeno preparada con una solución de citrato de sodio (5 ml) 0.1M pH 5 y ácido cítrico (5 ml) 0.1 M pH= 5, 0.004 g de orto fenilendiamina (Sigma Aldrich) y 0.004 ml de H₂O₂ al 30 % y la reacción se detuvo agregando a cada pozo 0.050 ml de H₂SO₄ 1N. La absorbancia se leyó a 492 nm en un lector para ELISA (Thermo Scientific, Multiskan FC).

5.14 Análisis Estadístico.

Los resultados fueron expresados como valores promedio (\pm) desviación estándar (S.D.) para cada grupo de ratones.

5.14.1 Análisis de Varianza (ANOVA) de un factor.

Tal como se conoce hoy día, el análisis de varianza es una técnica estadística que permite analizar datos provenientes de un experimento aleatorio comparativo. El objetivo central de un diseño experimental es la comparación de dos o más tratamientos, cada uno de los cuales representa una población, como es usual en experimentos comparativos.

Este tipo de análisis se utiliza cuando el investigador le interesa evaluar el efecto de un solo factor (con varios tratamientos o niveles) sobre una determinada variable de respuesta (o dependiente). El análisis de la varianza permite contrastar la hipótesis nula de que las medias de K poblaciones ($K > 2$) son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que dos de las poblaciones difieren de las demás en cuanto a su valor esperado (Remington, 2003). Este contraste es fundamental en el análisis de resultados experimentales, en los que interesa

comparar los resultados de K 'tratamientos' o 'factores' con respecto a la variable dependiente o de interés.

De forma resumida, sirve para determinar si las medias de (dos o más poblaciones) los diferentes tratamientos o grupos experimentales muestran diferencias significativas o por el contrario, que sus medias poblacionales no difieren.

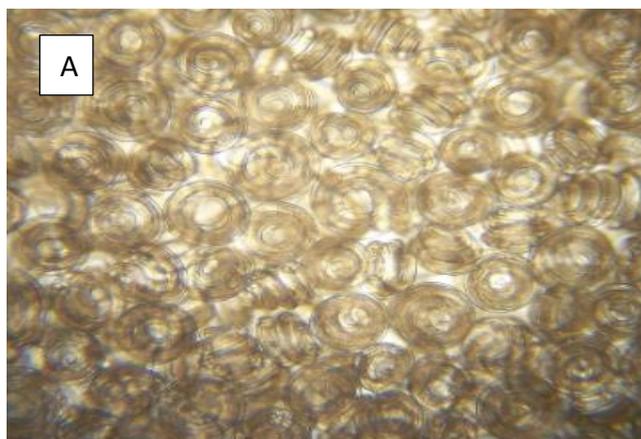
5.14.2 Prueba de contraste de Tukey (Diferencia Honestamente significativa de Tukey).

Cuando todos los grupos tienen el mismo número de individuos y podemos asumir que están igualmente dispersos. Es un test que se suele utilizar cuando se quiere comparar cada grupo con todos los demás e identificar entre los que hubo diferencias significativas (* $P < 0.05$) (Barón y Téllez, 2003).

6. RESULTADOS

6.1 Obtención de los productos de excreción y secreción de la LM

Se obtuvieron los PES de la cepa MSUS/ME/92/CM-92 de *T. spiralis* (fig. 16) así como su determinación de proteínas (en donde se registraron valores de 100 $\mu\text{g/ml}$) para la posterior elaboración de las cuatro formulaciones de nanopartículas de quitosano. Además, la cepa del parásito se propagó por infección oral con 7,000 larvas musculares, *i. e.*, 23 larvas por gramo de peso en ratas Wistar de ocho semanas.



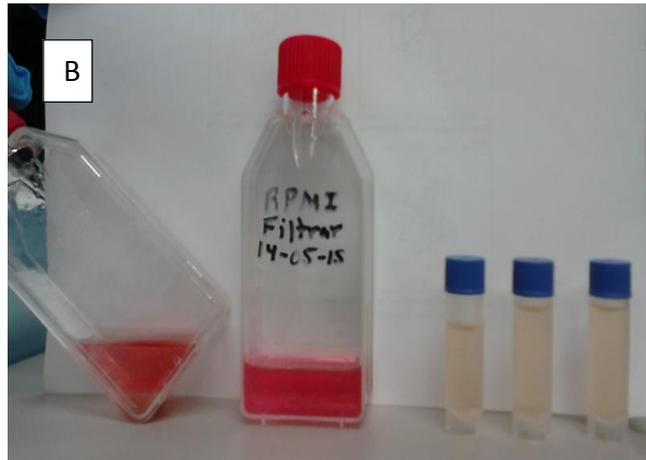


Figura 16. Productos de Excreción y Secreción (PES) de la LM de *T. spiralis*. A) Se observa la obtención de las LM previo a la B) elaboración y C) cambio de medio RPMI nuevo al cultivo de las LM cada 48 horas cuando viró de rosa a un color durazno o amarillo.

6.2 Formulaciones de nanopartículas

Para determinar la formación de las nanopartículas de quitosano, se tomaron fotografías en microscopía electrónica de transmisión. Las fotografías las tomó el IQ. Rafael Iván Puente Lee, jefe del Laboratorio de Microscopia, USAI-FQ, UNAM con sede en Ciudad Universitaria. La

figura 17, muestra la imagen de la formulación que no incluye el antígeno. Las nanopartículas miden entre 200 y 400 nanómetros de diámetro y no tienen una forma regular, aunque tienden a la esfericidad. Imágenes similares se obtuvieron con las formulaciones hechas con antígeno. Con este procedimiento no se pudo determinar si el antígeno se acopló al quitosano.

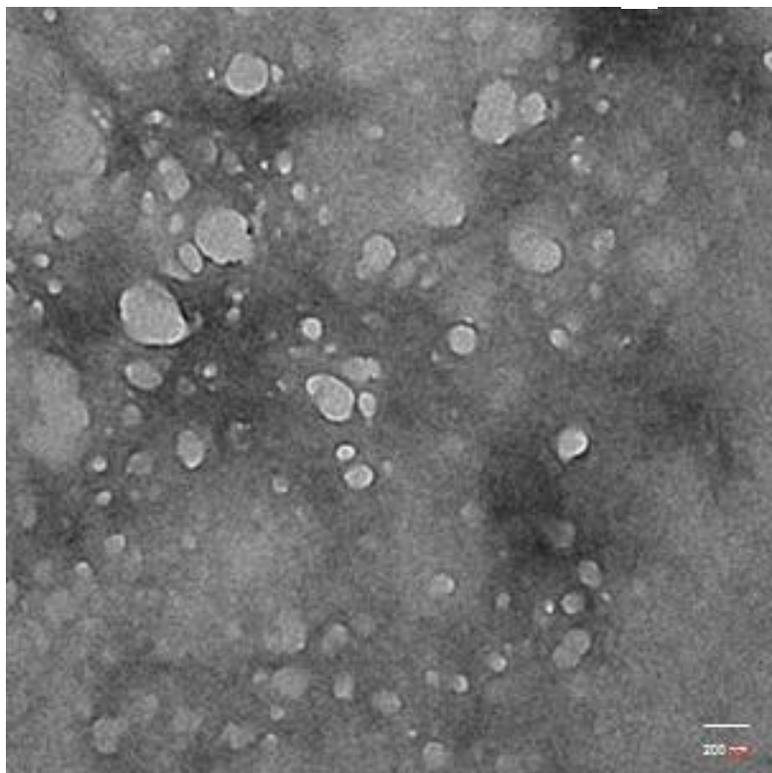


Figura 17. **Micrografía electrónica de las nanopartículas.** La suspensión de nanopartículas se sometió a microscopía electrónica de transmisión y se tomaron fotografías. La línea blanca del extremo derecho inferior mide 200 nm (tomada por Q. Iván Puente. Lab. Microscopía, FQ, UNAM).

La reactividad de los PES acoplados a las nanopartículas de quitosano se determinó por ELISA empleando sueros de ratones infectados experimentalmente con *T. spiralis*. La figura 18 muestra la reactividad de cada una de las formulaciones preparadas. La mayor reactividad se observó con la formulación donde los antígenos se acoplaron dentro de la nanopartícula (PES/D), seguido por la formulación con los antígenos fuera (PES/F) y por último dentro y

fuera (PES/DF). Básicamente la reactividad observada con las nanopartículas fue similar en comparación al grupo de pozos que se sensibilizaron con el antígeno. Mientras que no se observó reactividad en las nanopartículas sin antígeno (CHI).

ELISA para Evaluación de la reactividad de las nanopartículas.

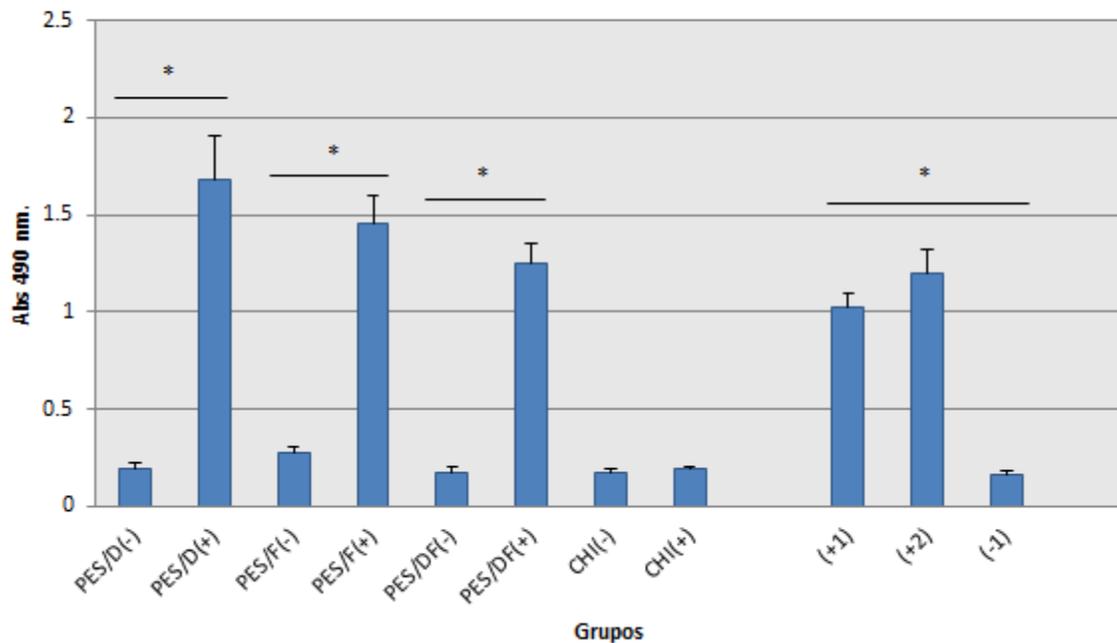


Figura 18. Reactividad de los PES en las nanopartículas de quitosano. La reactividad de los PES en las nanopartículas se determinó por ELISA empleando suero de ratones infectados de manera experimental. La reacción se reveló con anticuerpos de chivo contra IgG de ratón acoplado a peroxidasa. Las formulaciones que se evaluaron fueron: antígenos acoplados dentro de la nanopartícula (PES/D), antígenos acoplados fuera de la nanopartícula (PES/F) y antígenos dentro y fuera (PES/DF) y CHI. Se muestra la comparación con la reactividad del antígeno (sin nanopartícula) con suero de ratón infectado (+1 y +2) y suero de ratón testigo (-1). Se muestran diferencias significativas $*=P<0.05$

RS: control negativo (-); **PESe:** productos de excreción y secreción por vía oral o enteral; **CHI:** nanopartículas de quitosano (sin antígeno); **PES/D:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por dentro; **PES/F:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por fuera; **PES/DF:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por fuera y dentro; **PES/AF:** control (+) productos de excreción y secreción con adyuvante de Freund; **PESp:** productos de excreción y secreción por vía intraperitoneal (+); **AF:** adyuvante de Freund por vía intraperitoneal.

6.3 Cinética de anticuerpos séricos

A partir del ELISA realizado para evaluar la cinética de anticuerpos (IgG) como se muestra en la siguiente gráfica, en donde el eje "Y" representa la absorbancia a 492 nm y en el eje "X" tenemos el tiempo en semanas durante las que se inmunizó a los animales, podemos observar que no se estimularon anticuerpos séricos IgG en ningún grupo de los que se probaron las nanopartículas de quitosano, en cambio, donde sí se observaron dichos anticuerpos fue en el grupo control (+) PES/AF (figura 19) y en el grupo PESP; los cuales alcanzaron el mayor nivel de anticuerpos a la cuarta semana post- inmunización.

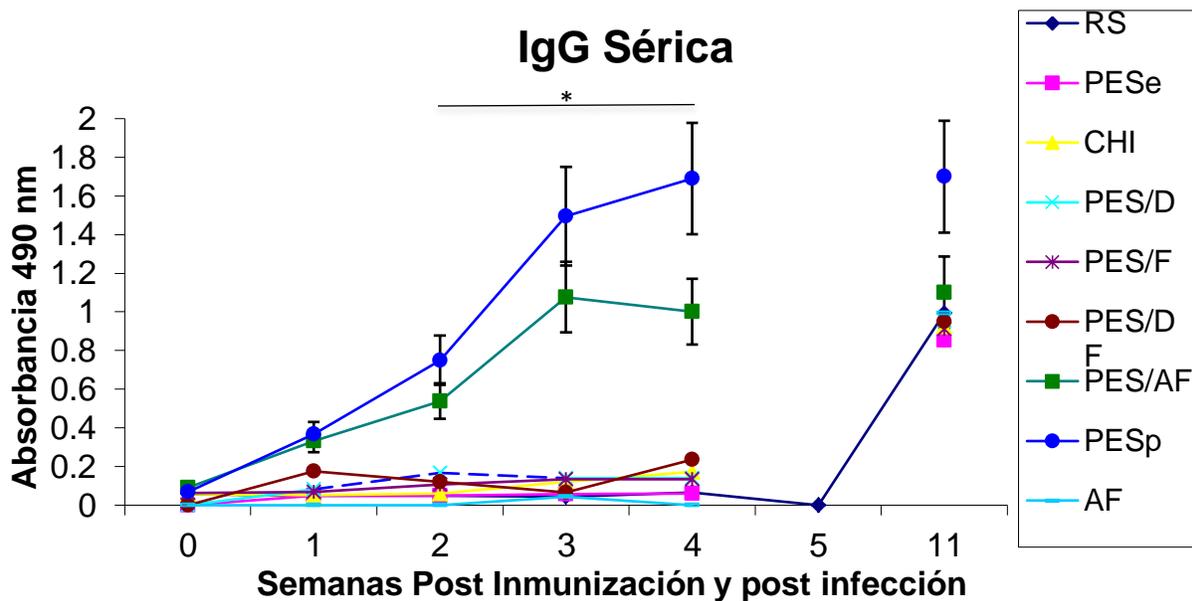


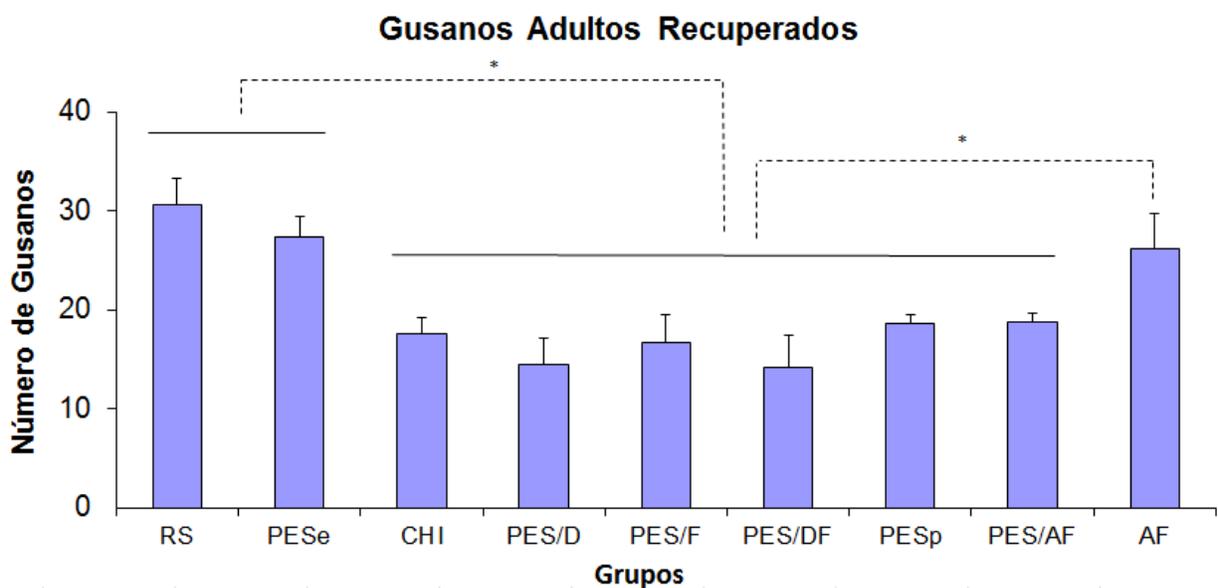
Figura 19. Cinética de producción de anticuerpos IgG en ratones inmunizados con las nanopartículas de quitosano durante cuatro semanas de inmunización (1 a la 4) y posteriores a la infección de reto (5 a la 11). Se muestran diferencias significativas $*=P<0.05$

RS: control negativo (-); **PESe:** productos de excreción y secreción por vía oral o enteral; **CHI:** nanopartículas de quitosano (sin antígeno); **PES/D:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por dentro; **PES/F:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por fuera; **PES/DF:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por fuera y dentro; **PES/AF:** control (+) productos de excreción y secreción con adyuvante de Freund; **PESP:** productos de excreción y secreción por vía intraperitoneal (+); **AF:** adyuvante de Freund por vía intraperitoneal.

6.4 Infección de reto y estimación de la protección contra GA y LM

La protección contra los gusanos adultos (GA) se manifiesta en la reducción del número de éstos recuperados en el intestino delgado (figura 20) al día siete PI, y posterior al esquema de inmunización. Por lo tanto, se observa en el eje de las "Y" el porcentaje de reducción y en el de las "X" los grupos, en donde se muestra al grupo PES/D con 52% de reducción con respecto al grupo RS (0 %); PES/F con 45.3 % de reducción, PES/DF con 52.7 %, y CHI 41.3 %, por lo que es similar el porcentaje de protección obtenido entre éstos últimos grupos, indicándonos también un efecto muy parecido de protección entre el CHI y los grupos que se inmunizaron con PES/AF y PESp (por lo tanto no hay diferencias significativas entre éstos tres grupos).

a)



RS: control negativo (-); **PESe:** productos de excreción y secreción por vía oral o enteral; **CHI:** nanopartículas de quitosano (sin antígeno); **PES/D:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por dentro; **PES/F:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por fuera; **PES/DF:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por fuera y dentro; **PES/AF:** control (+) productos de excreción y secreción con adyuvante de Freund; **PESp:** productos de excreción y secreción por vía intraperitoneal (+); **AF:** adyuvante de Freund por vía intraperitoneal.

b)

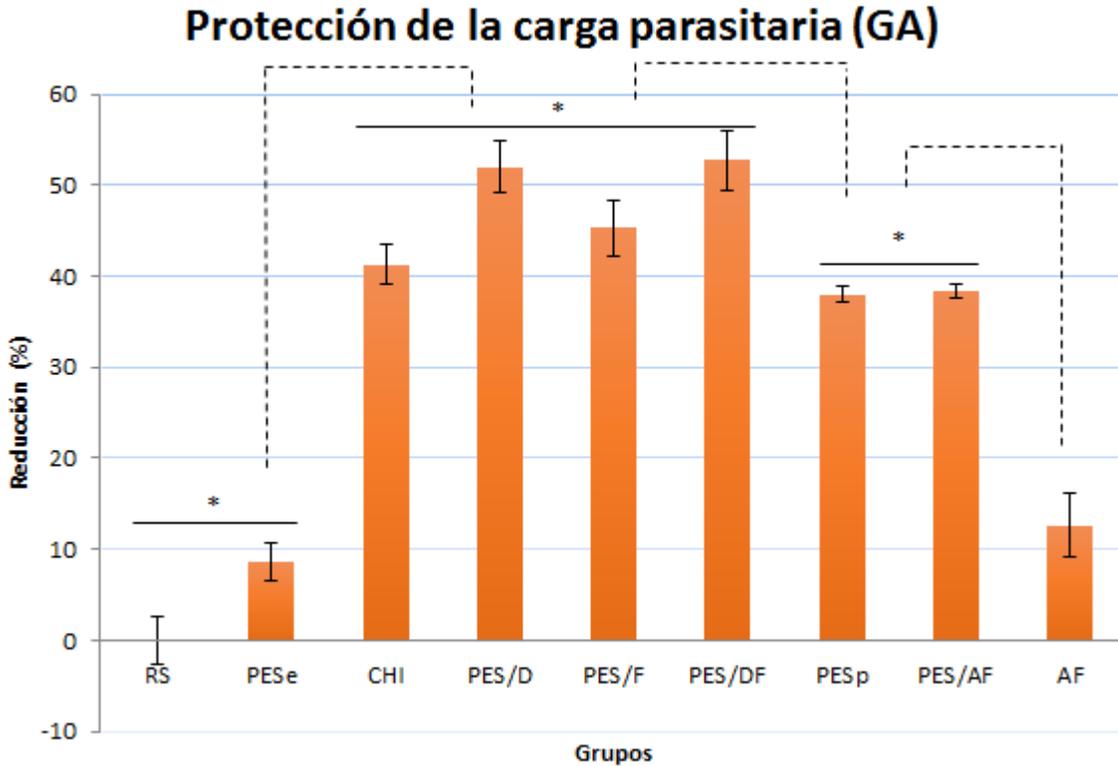


Figura 20. Reducción de la carga parasitaria a nivel entérico. Se observa en a) los GA recuperados a los siete días PI en el intestino delgado de los ratones, posterior al esquema de inmunización de los grupos experimentales. Con éstos valores se muestra en b) el porcentaje de protección el cual se manifiesta en la reducción a los siete días PI en el intestino delgado, obtenida por las distintas formulaciones de nanopartículas. Se muestran diferencias significativas $*=P<0.05$

RS: control negativo (-); **PESe:** productos de excreción y secreción por vía oral o enteral; **CHI:** nanopartículas de quitosano (sin antígeno); **PES/D:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por dentro; **PES/F:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por fuera; **PES/DF:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por fuera y dentro; **PES/AF:** control (+) productos de excreción y secreción con adyuvante de Freund; **PESp:** productos de excreción y secreción por vía intraperitoneal (+); **AF:** adyuvante de Freund por vía intraperitoneal.

La figura 21 muestra el promedio de la carga parasitaria de cada grupo experimental, a partir de tejidos como son los maseteros, la lengua y el diafragma, en donde en el eje "Y" tenemos el número promedio de LM recuperadas y en el eje "X" los distintos grupos evaluados, por lo tanto, no se observan diferencias significativas entre alguno de los grupos de nanopartículas y el (+) PES/AF y PESp, aunque, como era de esperarse, si hubo diferencias significativas entre dichos grupos mencionados y nuestro grupo testigo (-), el cual presentó la mayor cantidad de LM, como se esperaba.

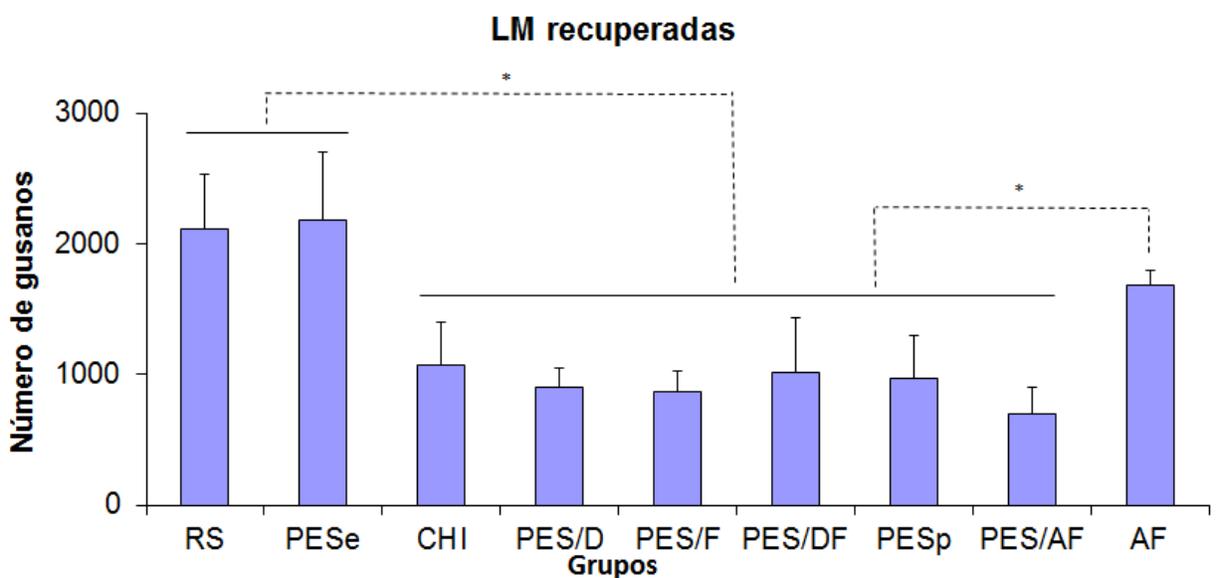


Figura 21. Reducción de la carga parasitaria a nivel parenteral. Se muestra el promedio de LM de *T. spiralis* obtenidas de maseteros, lengua y diafragma de cada grupo experimental al día 45 PI, y posterior al esquema de inmunización. Se muestran diferencias significativas $*=P<0.05$

RS: control negativo (-); **PESe:** productos de excreción y secreción por vía oral o enteral; **CHI:** nanopartículas de quitosano (sin antígeno); **PES/D:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por dentro; **PES/F:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por fuera; **PES/DF:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por fuera y dentro; **PES/AF:** control (+) productos de excreción y secreción con adyuvante de Freund; **PESp:** productos de excreción y secreción por vía intraperitoneal (+); **AF:** adyuvante de Freund por vía intraperitoneal.

6.5 Respuesta inmune (IgA) en suero

Se observó una producción de IgA a nivel sistémico (figura 22) en los grupos experimentales, por lo tanto, en el eje "Y" está la absorbancia a 490 nm y en el eje "X" el tiempo en semanas, de ésta manera encontramos que el punto de mayor estímulo de anticuerpos fue en la semana 11 (o 6° semana post-infección) tanto para PES/D, PES/F, PES/DF, CHI, como para PESe, PESp, FA y PES/AF(+), sin embargo, éste último fue estimulado a partir de la segunda y tercera semana post-inmunización.

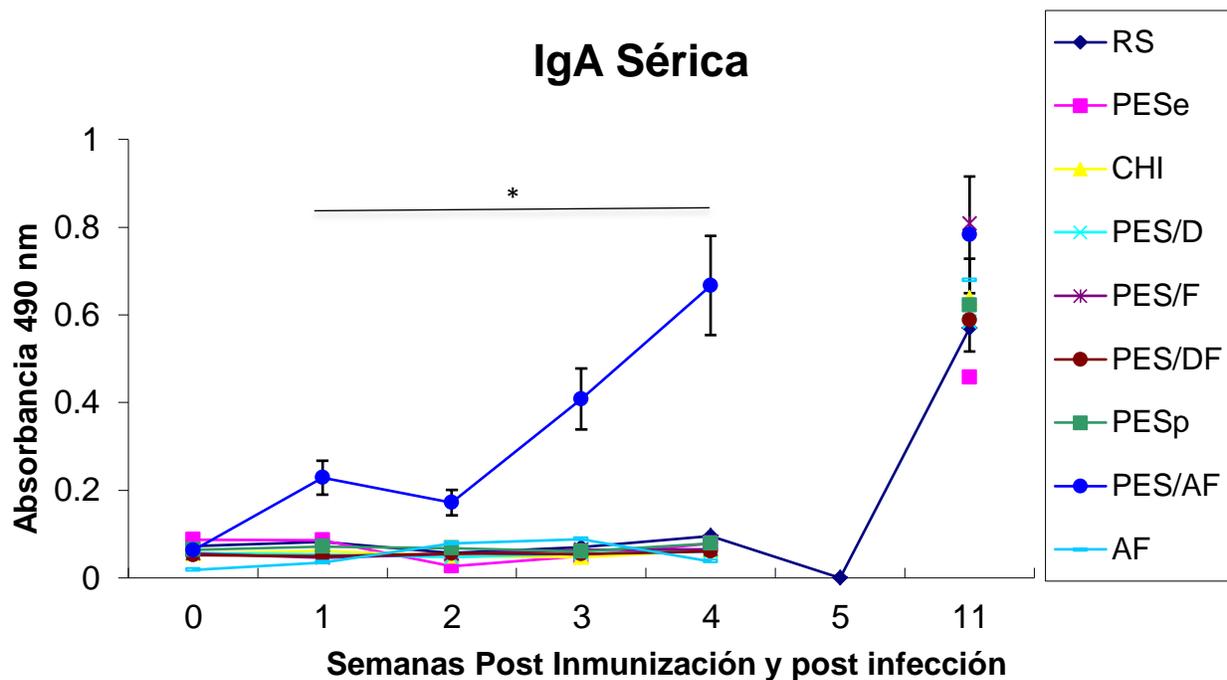


Figura 22. Cinética de producción de IgA específica en suero de ratones de los grupos experimentales durante las cuatro semanas de inmunización (1 a la 4) y a las semanas posteriores a la infección de reto (5 a la 11). Diferencias significativas $*=P<0.05$

RS: control negativo (-); **PESe:** productos de excreción y secreción por vía oral o enteral; **CHI:** nanopartículas de quitosano (sin antígeno); **PES/D:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por dentro; **PES/F:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por fuera; **PES/DF:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por fuera y dentro; **PES/AF:** control (+) productos de excreción y secreción con adyuvante de Freund; **PESp:** productos de excreción y secreción por vía intraperitoneal (+); **AF:** adyuvante de Freund por vía intraperitoneal.

6.6 Evaluación de los niveles de IgA en heces/lavados intestinales

En ratones inmunizados con PES acoplados a las nanopartículas de quitosano e infectados con LM de *T. spiralis*. Contrario a la IgA que se mostró en el suero, no se registró IgA en la mucosa del tracto gastrointestinal en heces y en lavados intestinales (figura 23) como se observa, en el eje "Y" la absorbancia a 490 nm, en el eje "X" el tiempo en semanas durante la inmunización y durante la infección de reto, así como en los lavados intestinales.

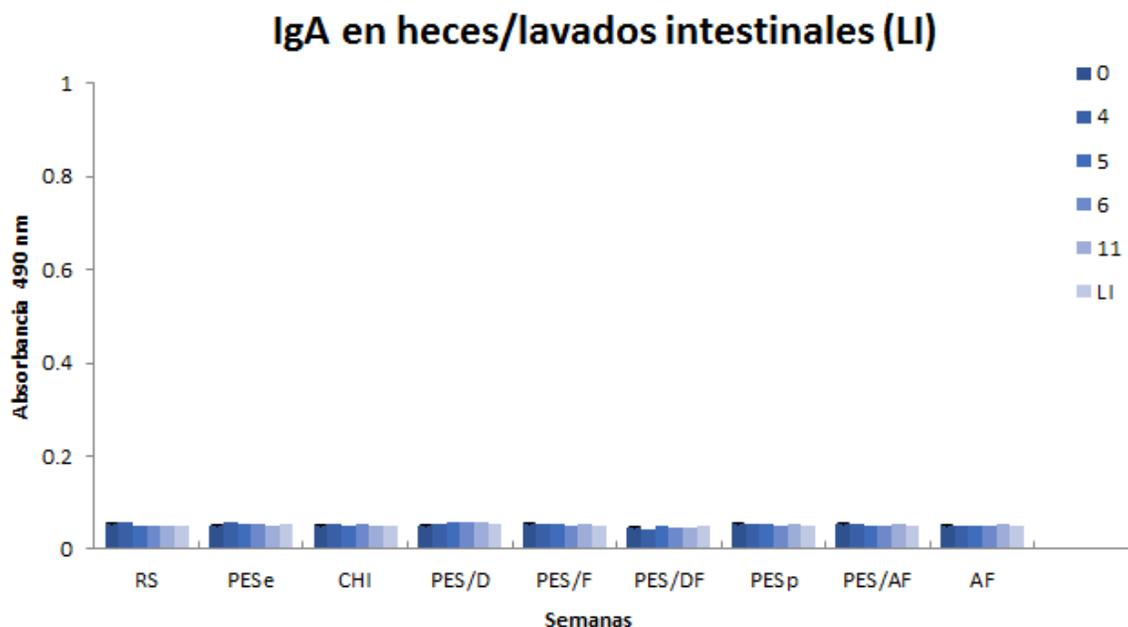


Figura 23. Cinética de anticuerpos IgA en heces y lavados intestinales de ratones de los distintos grupos experimentales, se observa la muestra previa a la inmunización (0), durante las cuatro semanas de inmunización (4) y a las semanas posteriores a la infección de reto (5, 6 y 11) y en lavados intestinales (LI) al día siete post-infección.

RS: control negativo (-); **PESe:** productos de excreción y secreción por vía oral o enteral; **CHI:** nanopartículas de quitosano (sin antígeno); **PES/D:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por dentro; **PES/F:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por fuera; **PES/DF:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por fuera y dentro; **PES/AF:** control (+) productos de excreción y secreción con adyuvante de Freund; **PESp:** productos de excreción y secreción por vía intraperitoneal (+); **AF:** adyuvante de Freund por vía intraperitoneal.

6.5 Citocinas séricas INF- γ e IL-4.

La figura 24 muestra la producción de INF- γ a través del tiempo, siendo del perfil de linfocitos CD4 tipo TH1. Por lo tanto, en el eje "Y" tenemos la concentración de dicha interleucina en pg/ml y en el eje "X" las semanas posteriores a la inmunización (0 a la 4) y a la infección de reto (5 a la 11). Como se aprecia, se estimuló INF- γ a partir de la segunda semana post-inmunización y esto ocurrió únicamente en tres grupos: CHI, PES/AF(+) y FA, en los cuales se mantuvo la respuesta hasta la semana 11 (o 6° semana PI).

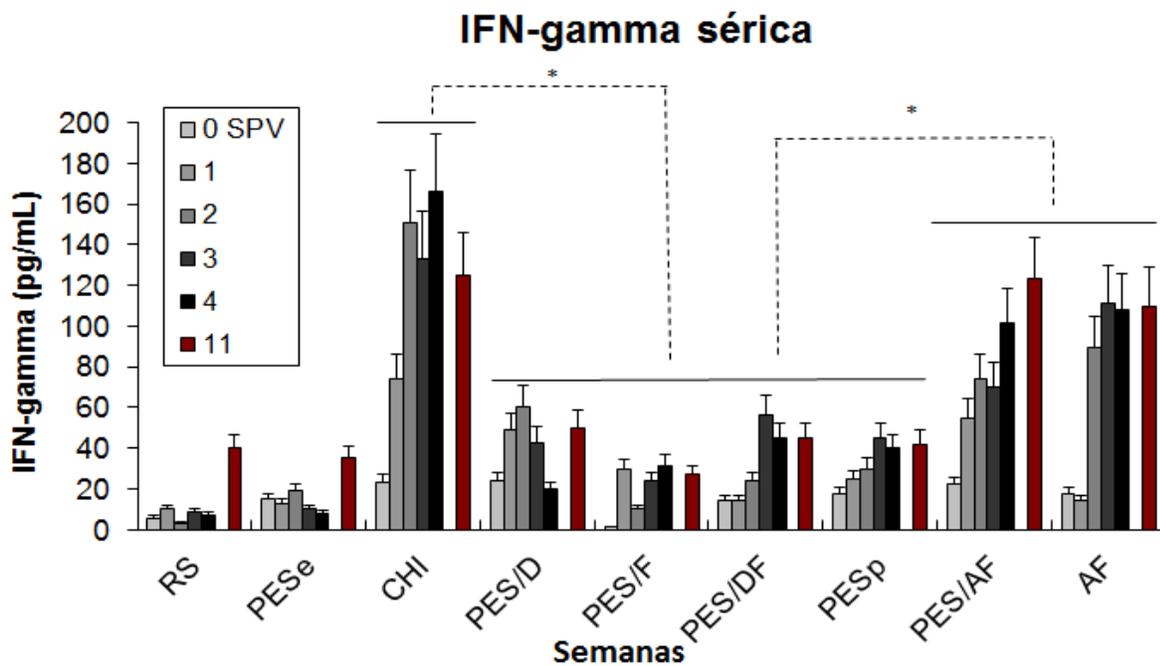


Figura 24. Niveles de IFN-gamma. Se observa la concentración de INF- γ en suero de ratones de los grupos experimentales, semana previa a la inmunización (0 SPV), durante las cuatro semanas de inmunización (1-4) y a las semanas posteriores a la infección de reto (11). Se muestran diferencias significativas $*=P<0.05$

RS: control negativo (-); **PESe:** productos de excreción y secreción por vía oral o enteral; **CHI:** nanopartículas de quitosano (sin antígeno); **PES/D:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por dentro; **PES/F:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por fuera; **PES/DF:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por fuera y dentro; **PES/AF:** control (+) productos de excreción y secreción con adyuvante de Freund; **PESp:** productos de excreción y secreción por vía intraperitoneal (+); **AF:** adyuvante de Freund por vía intraperitoneal.

En la figura 25 se muestra la evaluación de IL-4, por lo tanto, se observa en el eje "Y" la concentración de dicha interleucina en pg/ml y en el eje "X" las semanas durante la inmunización (1 a la 4) y las semanas posteriores a la infección de reto (11). Como podemos ver, los niveles de IL-4 no fueron detectables en ninguno de los sueros de los grupos experimentales.

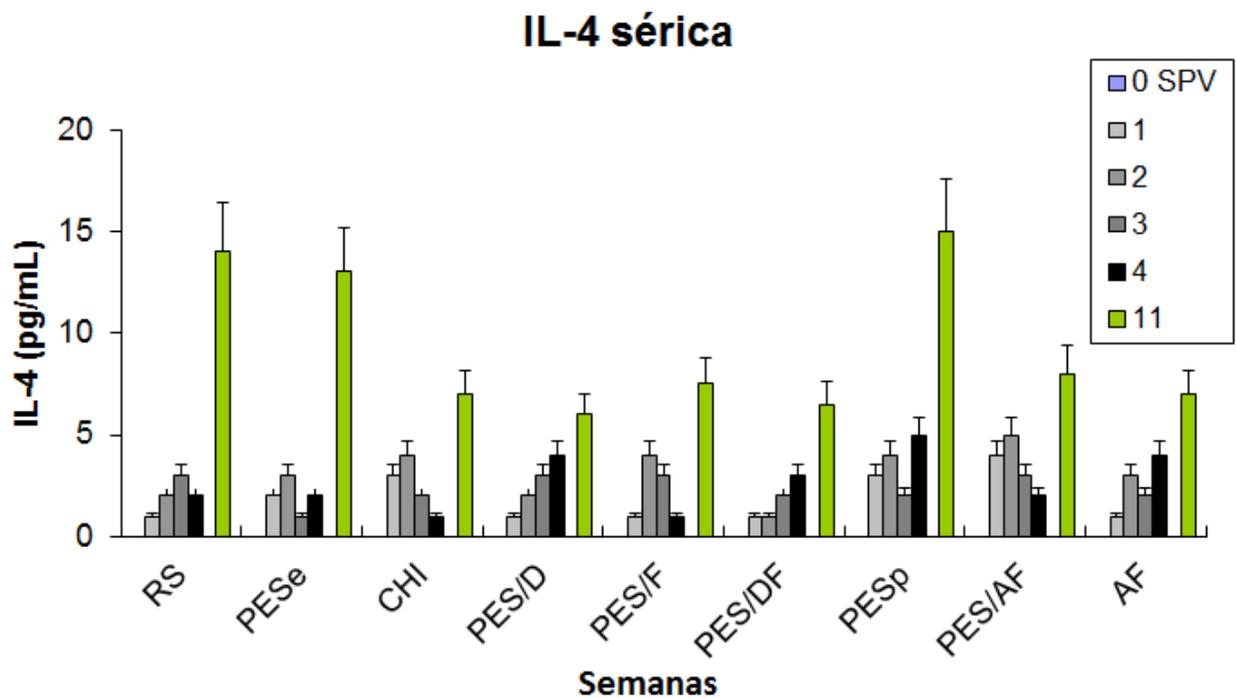


Figura 25. Niveles de producción de IL-4. Se observa la ausencia en los niveles de IL-4 en sueros de ratones de los grupos experimentales, semana previa a la inmunización (0 SPV), durante las cuatro semanas de inmunización (1-4) y a las semanas posteriores a la infección de reto (11).

RS: control negativo (-); **PESe:** productos de excreción y secreción por vía oral o enteral; **CHI:** nanopartículas de quitosano (sin antígeno); **PES/D:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por dentro; **PES/F:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por fuera; **PES/DF:** nanopartículas con productos de excreción y secreción por fuera y dentro; **PES/AF:** control (+) productos de excreción y secreción con adyuvante de Freund; **PESp:** productos de excreción y secreción por vía intraperitoneal (+); **AF:** adyuvante de Freund por vía intraperitoneal.

7. DISCUSIÓN

7.1 Obtención de los productos de excreción y secreción de la LM

Una de las estrategias que se han estudiado para evitar la transmisión de la triquinosis, es la utilización de los productos de excreción y secreción de la LM en estudios de protección (McGuire *et al.*, 2002; Robinson *et al.*, 1995). Los resultados de esos experimentos apuntan hacia una protección parcial y una respuesta inmune de los linfocitos CD4+ tipo TH2. Por lo que la búsqueda de antígenos y nuevas sustancias adyuvantes que estimulen la respuesta inmune protectora es importante en la investigación de la inmunoparasitología (de la Rosa., 2012).

En el presente estudio la propagación de la cepa MSUS/ME/92/CM-92 de *T. spiralis* en ratas de la cepa Wistar se llevó a cabo con una dosis infectiva oral de 23 LM por gramo de peso (LM/g), equivalente a 7000 LM por rata, ya que su peso se encontró entre 300 ±12 gr y a través de la digestión artificial resultó un promedio de 100,000 LM por rata para conseguir un adecuado cultivo de los PES cuya concentración en promedio resultó de 100 µg/ml. Por lo tanto se cumplió el objetivo de la obtención de los antígenos de *T. spiralis* con el propósito de incorporarlos a un biopolímero como sistemas de liberación de antígenos en el epitelio intestinal, algo que es innovador en los estudios de protección contra dicho parásito, en donde se ha buscado la forma de inmunizar animales de laboratorio con los mismos antígenos junto con sustancias adyuvantes por vía parenteral (Robinson *et al.*, 1995), de igual forma, se han empleado los extractos larvales en otros estudios de vacunación pero la protección que se ha obtenido también es parcial (Dea-Ayuela *et al.*, 2006).

7.2 Formulaciones de nanopartículas de quitosano

En el presente estudio se cumplió el objetivo de la obtención de las nanopartículas de quitosano con un tamaño entre 200 y 400 nm, para lo cual se empleó el método de gelación iónica (uno de los distintos métodos que se han empleado para su fabricación), junto con el TPP; en donde se formaron complejos entre las especies con carga opuesta, de ésta forma es como se obtuvieron partículas coloides (Rodríguez *et al.*, 2010), debido a que el quitosano es positivamente cargado y las glicoproteínas de los PES de *T. spiralis* están negativamente cargadas (Takahashi, 1997), estos antígenos pueden asociarse o entrecruzarse fácilmente a las nanopartículas. Además, se ha demostrado que las micropartículas y nanopartículas de quitosano son capaces de atrapar grandes cantidades de antígeno, así como su transporte

hacia las placas de Peyer (Junginger *et al.*, 2003). También se sabe que sus propiedades mucoadhesivas se deben a la presencia de los grupos amino cargados positivamente capaces de interactuar electrostáticamente con la superficie mucosa del epitelio cargada negativamente (Rodríguez *et al.*, 2010). Por lo tanto, la elaboración de nuestras nanopartículas coinciden con estudios como el de Rodríguez *et al.* (2010) quienes también obtuvieron nanopartículas por el método de gelación iónica, en donde dichas partículas coloidales de quitosano resultantes se reconocieron como una suspensión opalescente, cuyo rango de tamaño fue de 100 a 400nm.

En nuestro estudio se comprobó por medio de ELISA que las formulaciones de nanopartículas que incorporaron los PES de la LM fueron reconocidos por los anticuerpos de ratón IgG anti- *T. spiralis* debido a la reacción presentada, aunque no se ha determinado con precisión qué cantidad de antígeno se incorporó a las nanopartículas que fabricamos, y si la antigenicidad fue preservada completamente, como se ha realizado en otros estudios en donde se emplearon micropartículas para inmunizar por vía oral o nasal (Baudner *et al.*, 2003; van der Lubben *et al.*, 2003). A partir de éste ensayo, fue como se consideró que se podría estimular la inmunidad humoral eficientemente contra los PES de la LM transportados y liberados en el epitelio intestinal por éste vehículo nanoparticulado, tal como se planteó en nuestra hipótesis.

Sin embargo, los resultados muestran que dichas formulaciones no estimularon a la respuesta inmune de mucosas ni la sistémica para la protección ante la infección por éste parásito, a pesar de sus distintas propiedades reportadas en el epitelio mucoso (Porporatto *et al.*, 2005) así como su capacidad adyuvante. En un número de estudios en animales (Giudice *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2001) han reportado el uso del quitosano como un excipiente seguro en los sistemas de liberación nasal, el cual aumenta el transporte de proteínas a través de la mucosa nasal; y en otros experimentos han encontrado que dicho polímero cumple de manera eficiente el papel de acarreador únicamente, administrado por vía oral y nasal (De Vos *et al.*, 1993; Junginger *et al.*, 2003) así como en el presente trabajo, en donde resultó sin actividad alguna como adyuvante (por vía oral) tanto en las formulaciones probadas con el antígeno incorporado como en la preparación de nanopartículas únicamente de quitosano.

7.3 Anticuerpos séricos (IgG)

Como se sabe, una vacuna efectiva debe ser capaz de inducir elevados niveles de inmunidad en una gran proporción de una población de hospedadores genéticamente heterogénea (Robinson *et al.*, 1995).

En infecciones por helmintos del género *Trichinella* y *Trichuris* los anticuerpos bajo el control de la respuesta TH2 (como los isotipos IgG1 e IgA) han sido asociados a la expulsión de la población de gusanos adultos del intestino del hospedador (Dea Ayuela *et al.*, 2006; Onah *et al.*, 2000), aunque su papel preciso no ha sido bien establecido. Particularmente la respuesta inmune sistémica es importante en la defensa contra las larvas recién nacidas migrantes de *T. spiralis* (Fabre *et al.*, 2009).

Para conocer la respuesta inmune producida por las formulaciones de las nanopartículas, examinamos los niveles de anticuerpos como IgG e IgA, así como los niveles de las citocinas IL-4 e IFN- γ , y como se mostró en los resultados no se logró estimular la respuesta sistémica (anticuerpos séricos IgG) por la vacunación oral con las formulaciones de nanopartículas (CHI, PES/D, PES/F, PES/DF), únicamente en el grupo control (+) PES/AF (vía intraperitoneal), como se esperaba y mayor aún fue la respuesta del grupo inmunizado únicamente con los PESP (por vía intramuscular) a partir de la 2° semana post- inmunización; sólo se observó la producción de dichos anticuerpos en los grupos experimentales como resultado de la respuesta inmune contra la infección por *T. spiralis*, y esto se observó a la semana 11 (o 6° post-infección).

En un estudio previo de van der Lubben *et al.*, (2003) en donde también evaluaron la respuesta inmune local y sistémica a tres grupos de ratones después de la administración oral y nasal de tres formulaciones (respectivamente): micropartículas de quitosano cargadas con DT (Toxoide de la Difteria), DT con PBS y micropartículas de quitosano (solas) como control. Posteriormente, al evaluar los niveles de IgG observaron que los títulos no fueron detectables en el grupo que recibió las micropartículas de CHI solas, en cambio, donde si encontraron un incremento en la respuesta inmune sistémica (IgG) fué en los grupos que recibieron micropartículas de quitosano con la mayor concentración de DT (40 Lf). Adicionalmente, niveles elevados significativamente de IgA anti- DT fueron detectados en el tracto gastrointestinal (heces). Por lo tanto, el DT asociado al sistema acarreador de vacunas (quitosano) no sólo aumentó la respuesta inmune, sino también protege durante la infección

contra el DT. Por lo tanto, el aumento de la respuesta humoral en animales vacunados e infectados puede ser considerado un marcador para la protección.

Además, en otros estudios se ha demostrado que la respuesta inmune combinada TH1/ TH2 es importante para la inmunidad contra la infección por *T. spiralis* (Deville *et al.*, 2005; Kolodziej-Sobocinska *et al.*, 2006), incluso se ha pensado que la respuesta TH2 es esencial para la inmunidad protectora contra las infecciones por helmintos intestinales (Xinping Zhu *et al.*, 2014). Un ejemplo de esto es el trabajo de Xinping Zhu *et al.*, (2014) quienes evaluaron la estrategia de vacunación heteróloga de sensibilización/refuerzo (oral- intramuscular) en ratones con Ts87 (un antígeno inmunodominante) contra la infección por *T. spiralis*. Los resultados revelaron que los ratones inmunizados indujeron una fuerte respuesta inmune TH1/TH2 combinada (IgG2a e IFN- γ ; IgG1 en suero, IgA en mucosa, IL-4 e IL-6, respectivamente) aunque TH2 fue predominante, lo que puede contribuir a una mejor protección. Además se observó una reducción significativa de las LM. Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos se sugiere que en el presente estudio las nanopartículas de quitosano asociadas a los PES de la LM de *T. spiralis* no resultaron una estrategia óptima para estimular suficientemente la respuesta inmune humoral sistémica.

7.4 Infección de reto y estimación de la protección (GA)

La infección de reto se llevó a cabo con 300 LM/ratón de *T. spiralis* a las cinco semanas post-inmunización. Los resultados muestran que las nanopartículas de quitosano así como su asociación con los PES presentaron del 41 al 52.7 % de reducción de los GA en el intestino respecto al grupo RS(-), indicándonos que no hay diferencias significativas entre las formulaciones de nanopartículas evaluadas. Por lo tanto, en el presente estudio se logró protección parcial a partir de la vacunación oral, como se manifiesta en la reducción en el establecimiento de los GA al día 7 p.i. y por ende, en la reducción en el promedio de las LM obtenidas, en donde se observó un efecto muy similar entre los tratamientos de las nanopartículas de quitosano; por lo que se sugiere que durante la vacunación, dicho polisacárido promovió funciones fisiológicas sumamente importantes como estimular la peristalsis intestinal (pues en previas investigaciones se le atribuyen propiedades como fibra dietética y suplemento dietético o agente contra la obesidad) (Sumiyoshi y Kimura., 2006; Walsh *et al.*, 2013), de esta manera, cuando se llevó a cabo la infección de reto con LM de *T. spiralis* (una semana después del esquema de vacunación con las nanopartículas) una gran proporción de larvas fue expulsada del intestino y sólo otra proporción alcanzó invadir las

células columnares epiteliales y continuó con su ciclo de vida hasta llegar al estadio adulto y reproducirse, justo en el momento en que obtuvimos los GA del intestino y evaluamos la protección.

Otros resultados similares de protección parcial ante dicha parasitosis por vacunas dirigidas al epitelio mucoso intestinal se encontraron en estudios previos, como en el experimento realizado por Dea-Ayuela *et al.*, (2006) en donde realizaron vacunación oral, con la diferencia de que ellos utilizaron (dos tratamientos) extracto crudo de las larvas y PES de la LM de *T. spiralis* microencapsulados con un copolímero de Ácido metacrílico y la posterior infección de reto (con 300 LM), cuyos resultados de protección reflejaron una reducción significativa ($p < 0.05$) de los GA a nivel intestinal en ambas cepas de ratones BALB/c y NIH al día 6 post-infección, aunque ellos sí observaron estimulación moderada de anticuerpos IgG1 e IgA sistémicos en BALB/c después de la primera administración de las micropartículas y la posterior infección de reto no alteró dicha respuesta humoral.

Jing Cui *et al.*, (2015) reportaron resultados de protección parcial en ratones Balb/c vacunados con Δ *cya*SL1344/pcDNA3.1-TsNd y la posterior infección de reto con 300 LM de *T. spiralis*. Dicha vacuna consiste en una proteína recombinante Hidrolasa Nudix de *T. spiralis* (TsNd) que se une a las células del epitelio intestinal, cuyo gen fue clonado en un plásmido de expresión eucariota pcDNA3.1 y transformado en una cepa atenuada de *Salmonella typhimurium* (Δ *cya*SL1344). La inmunización oral mostró una reducción estadísticamente significativa del 73.32 % en los GA al día 7 post- infección y también una reducción del 49.5% en las LM obtenidas comparado con el grupo del vector solo o el control de PBS. Además dicha vacuna produjo una respuesta local significativa ($P < 0.05$) de IgA total y una combinada respuesta inmune TH1/TH2 (IL-2, IFN- γ , IL-4, and IL-10 así como IgG1 e IgG2a) con una predominancia hacia TH2.

En base a estos estudios se ha demostrado que las vacunas de DNA son potencialmente seguras y efectivas tanto para humanos como para uso veterinario, incluso, se ha reportado que algunas vacunas de DNA son más efectivas que las vacunas de proteínas (Yang *et al.*, 2010) debido a que estas no estimulan de forma adecuada tanto la inmunidad sistémica como la de mucosas, sabiendo que IgA e IgG son de gran importancia para la eliminación de helmintos intestinales.

7.5 Respuesta inmune (IgA) en suero

Debido a que la mucosa intestinal es la primera barrera natural que enfrenta a los parásitos, probablemente la inmunidad de mucosas es importante para proteger al hospedador contra la infección por *Trichinella*. Estudios previos han mostrado que la mucosa intestinal de animales infectados produjeron anticuerpos específicos contra *T. spiralis* y la IgA mucosa media la inmunidad protectora (Yang *et al.*, 2010; Pei Liu *et al.*, 2015) ya que la expulsión de los GA del intestino puede ser mediada por dichos anticuerpos contra los antígenos de superficie del mismo estadio mencionado (Appleton *et al.*, 1998; Inaba *et al.*, 2003; Pei Liu *et al.*, 2015).

Como se ha demostrado en estudios previos, la infección de desafío por *T. spiralis* causó un incremento significativo en los niveles de IgA (Fabre *et al.*, 2009), como lo que se observó en los resultados del presente estudio, en donde se muestra que el punto de mayor estímulo de anticuerpos fue únicamente en la semana 11 (o 6° post- infección) para todos los grupos, sin embargo, el grupo control (+) PES/AF fue estimulado a partir de la semana dos post-inmunización, por el efecto del Adyuvante de Freund. De ésta forma, se demostró que la vacunación oral con PES asociadas a las nanopartículas de quitosano no logró la producción de IgA local ni sistémica; por lo tanto, la respuesta de perfil TH2 no fue la que predominó en el presente estudio.

Giudice *et al.* (2003) inmunizó ratones BALB/c con la vacuna conjugada del meningococo grupo C (CRM-MenC) (2.5 µg por dosis) con la enterotoxina mutante no tóxica de *Escherichia coli* (LTK63) (1µg por dosis) como adyuvante, ambos incorporados a micropartículas de quitosano (20µg por dosis) administrados por vía nasal y en dicho experimento lograron estimular significativamente la respuesta inmune sistémica (IgG) y mucosa (IgA) incluso mayor que en el grupo control (+) que recibió la vacuna de manera subcutánea. Estos resultados demuestran que el uso concomitante de las micropartículas de quitosano y la LTK63 mutante aumentaron significativamente la inmunogenicidad y la eficacia protectora de la vacuna CRM intranasal. Además, observaron en el grupo de ratones que recibió las micropartículas de quitosano solas o vacías ningún efecto adyuvante por sí solas, algo que resultó muy semejante con nuestros hallazgos de la respuesta inmune tanto del grupo que recibió nanopartículas de quitosano (solas) como los grupos que recibieron las formulaciones de nanopartículas asociadas a los PES.

Otra estrategia de vacunación fue empleada en el estudio realizado por De Vos (1993), donde examinaron el efecto adyuvante de la toxina colérica (CT) y para ello, inmunizaron ratones por vía oral utilizando antígeno del extracto crudo de la LM de *T. spiralis* en tres formulaciones: soluble, particulado y particulado/soluble en combinación con CT, (esto fue en días 0, 14 y 21) lo cual produjo una ligera estimulación de la inmunidad mucosa (IgA), aunque, ésta respuesta estuvo ausente en los ratones que recibieron éstos antígenos sin CT. Además, se observó un incremento significativo aprox. diez veces más ($P < 0.05$) (al día seis post-infección) de la misma clase de anticuerpo después de la infección de reto (día 28) con dicho parásito. La respuesta sistémica (IgG) se comportó similar después de la infección de reto. Por lo tanto, la inmunización produjo inmunidad protectora a la subsecuente infección con *T. spiralis*, ésta protección está correlacionada con la respuesta humoral mucosal.

La inmunidad estimulada en éstos estudios es soportada por los datos de anticuerpos IgA en suero y en mucosa, así como el título de IgG, estos resultados son debido a la estrategia que emplean, ya sea alguna vacuna o antígeno junto con una toxina bacteriana, o también algunos emplean éste sistema mencionado asociado a las micropartículas del polímero quitosano (De Vos *et al.*, 1993; Giudice *et al.*, 2003; Junginger *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2001). Cabe mencionar que la producción de IgA mucosa es dependiente de una respuesta de linfocitos T CD4+ de perfil TH2; particularmente IL-10 e IL-4 son las principales citocinas que aumentan la respuesta IgA (Pei Liu *et al.*, 2015), sugiriendo que altos niveles de estas citocinas pueden promover la respuesta mucosa intestinal. Por lo tanto, se sugiere que una estrategia para mejorar los resultados del presente trabajo en la protección contra *T. spiralis* podría ser la administración de nanopartículas de quitosano asociadas a los PES de la LM de dicho parásito por vía nasal ya que podría resultar mejor para estimular la inmunidad humoral (IgA) mucosa, y también esperaríamos estimular la inmunidad humoral sistémica.

7.6 Citocinas séricas IL-4 e INF- γ

Como se ha mencionado, el perfil de las citocinas que se secretan cuando son sensibilizados los linfocitos T CD4, es importante para determinar los anticuerpos que se producirán por parte de las células B. Por lo tanto, en el presente trabajo de manera inesperada no se observó ningún impacto en la producción de IL-4 durante el periodo de vacunación con las nanopartículas, dicha interleucina es dependiente de linfocitos tipo TH2, es por ello que, sugerimos que no se observó la producción de IgA. No obstante, se observó una muy ligera respuesta de IL-4 a la semana 11 posterior a la vacunación (o semana 6 post-infección) como

resultado de la característica respuesta ante la infección por el parásito *T. spiralis*, el cual se encontraba en la fase parenteral de su ciclo de vida.

El INF- γ por su parte, es producido por células NK y por linfocitos CD4 tipo TH1 y es una citocina esencial que media la inmunidad celular protectora contra bacterias intracelulares facultativas como *Listeria monocytogenes* y *Mycobacterium tuberculosis*, hongos y parásitos (Scott, 1991) ya que activa a los macrófagos que se vuelven microbicidas por la masiva liberación de agentes tóxicos incluyendo intermediarios de oxígeno reactivos (Yang *et al.*, 1995). En el presente estudio se observó a partir de la segunda y tercera semana post inmunización un aumento en la producción de INF- γ únicamente en el grupo (+) PES/AF y FA, además del grupo de la formulación de nanopartículas de CHI, lo cual corresponde a una respuesta de linfocitos CD4+ de perfil TH1; dicha respuesta se mantuvo hasta la semana 11 post- inmunización (o 6 post- infección). Estos datos son soportados por lo reportado por de la Rosa *et al.*, (2012) en donde inmunizaron ratas con PES de LM de *T. spiralis* asociados a distintas sustancias adyuvantes como levamisol (LV), *Staphylococcus* (ST) y Adyuvante de Freund (AF). En este último tratamiento se observó un incremento en la producción INF- γ después de la inmunización y de la infección así como el decremento en la producción de IL-4.

Además, la respuesta de INF- γ en el grupo de las nanopartículas de CHI dadas por sí solas resultó contrario respecto a lo que se ha observado en algunos estudios previos sobre el comportamiento de éste polímero en la mucosa intestinal, en donde se ha reportado que induce mayormente el incremento de citocinas inmunoregulatoras/supresoras como IL-4, IL-10 y TGF- β disminuyendo los niveles de otras citocinas inflamatorias (Porporatto *et al.*, 2004 y 2005) y también se sabe que el microambiente intestinal en condiciones fisiológicas es particularmente rico en citocinas anti- inflamatorias como IL-10 y TGF- β esenciales para la diferenciación a células regulatorias y la producción de IgA (ManWarren *et al.*, 1997).

También se ha reportado que el quitosano además de que incrementa la función de células polimorfonucleares inflamatorias tales como macrófagos, induce la secreción de citocinas así como la expresión de marcadores de activación como los receptores Fc y de manosa (Porporatto *et al.*, 2003; Shibata *et al.*, 1997). De hecho, el quitosano de bajo peso molecular (LMW) induce la expresión de dichos marcadores de activación y luego se une a los receptores de manosa (éstos receptores se encuentran en macrófagos), los cuales median la internalización o la fagocitosis de las partículas de quitosano y quitina (Shibata *et al.*, 1997). Esto es soportado por previas investigaciones, ya que han demostrado el efecto de activación

del quitosano en macrófagos residentes: en donde después del cultivo con quitosano éstas células expresaron marcadores de activación y produjeron citocinas pro-inflamatorias (Porporatto *et al.*, 2003; van der Lubben *et al.*, 2001). También se ha demostrado que los macrófagos activados alternativamente tienen características metabólicas que difieren de los que son activados por la vía clásica: los cuales muestran expresión preferencial de receptores de la inmunidad innata tales como el receptor de manosa en macrófagos (transmembranal). Por lo tanto, está bien establecido que dicho receptor es altamente regulado transcripcionalmente y traduccionalmente en macrófagos locales durante la inflamación (van der Lubben *et al.*, 2001), incrementando la posibilidad para interactuar con ligandos apropiados (microorganismos o partículas que expresan oligosacáridos apropiados como manosa, fucosa y N-acetil-D-glucosamina (Pontow *et al.*, 1992), en éste caso el quitosano.

Anteriormente, Shibata et al (1997) reportaron in vivo y en cultivos de células del bazo que la fagocitosis de partículas de quitina y quitosano (de uno a 10 micras) mediada por receptores de manosa (en macrófagos) fué dependiente de la secreción de INF- γ y de la activación de macrófagos del bazo (en cultivo) y alveolares después de la administración intravenosa (en ratones C57B1/6 y SCID) (Shibata et al., 1997b). Estos estudios muestran claramente que los macrófagos del bazo que fagocitan dicho intervalo de partículas de quitina producen IL-12 y TNF- α , ambas citocinas son esenciales para la secreción de INF- γ . Dicha interleucina inducida por las partículas de quitina parece simular la inmunidad celular inespecífica como defensa del hospedador. Tales resultados sugieren que en particular los residuos terminales de azúcar en los microbios o en la quitina como pueden ser manosa y N-acetil-D-glucosamina son reconocidos y fagocitados por macrófagos preferencialmente para inducir las citocinas anteriores. De estos hallazgos concluyeron que la fagocitosis parece ser muy importante para la regulación positiva de la inmunidad celular inespecífica como parte de la respuesta innata; por lo tanto, los resultados obtenidos en la presente investigación nos indican algo muy similar, es por ello que se sugiere que el INF- γ que se produjo durante la vacunación con las nanopartículas de CHI, es el resultado de la estimulación inespecífica de la respuesta innata en el ambiente intestinal.

En contraste a éstas observaciones, Seferian y Martínez, (2001) reportaron que cuando el quitosano y el antígeno fueron administrados en las distintas piernas, ningún aumento de la respuesta inmune fue observado. Además Risbud *et al.*, (2001) observaron que un hidrogel de polivinil pirrolidona-quitosano diseñado para aplicaciones de trasplantes no activó macrófagos. De los estudios mencionados se puede concluir que la actividad adyuvante que deriva del quitosano parece ser dependiente de aspectos como el grado de desacetilación, y

el tipo de formulación que se emplea (van der Lubben *et al.*, 2001). Sin embargo, se necesitan más investigaciones para aclarar los factores precisos que influyen la capacidad adyuvante del quitosano y sus derivados.

En cuanto a la administración de las formulaciones de las nanopartículas: PES/D, PES/F y PES/DF, en las cuales no se observó ninguna estimulación de la respuesta inmune ni mucho menos producción de INF- γ , probablemente el antígeno se degradó durante su transporte por las enzimas digestivas aunado a la baja concentración que se manejó, por lo tanto, para mejorar éste trabajo podríamos considerar obtener una mayor concentración de los PES. No obstante, se necesitan hacer futuros estudios en la influencia de los procesos de inmunización de mucosas para determinar el papel de la respuesta TH1 en la protección contra *Trichinella*.

8. CONCLUSIONES

8.1 Las nanopartículas de quitosano no mostraron capacidad adyuvante cuando se asociaron con los productos de excreción y secreción de *T. spiralis*.

8.2 Las nanopartículas de quitosano funcionaron como un sistema transportador o acarreador.

8.3 Las nanopartículas de quitosano indujeron protección parcial de manera inespecífica a través de la expulsión de los gusanos adultos de *T. spiralis*, aún en ausencia de los productos de excreción y secreción.

9. PERSPECTIVAS

9.1 Evaluar la respuesta inmune celular a nivel del intestino por medio de cortes histológicos.

9.2 Hacer estudios en las nanopartículas de quitosano para conocer la cantidad que se incorpora y libera de los PES de la LM de *T. spiralis*.

9.3 Una perspectiva a considerar, en caso de que se requiera realizar algún cambio en la metodología del presente trabajo, sería la administración de nanopartículas de quitosano asociadas a los PES de la LM de dicho parásito por vía intranasal.

10. REFERENCIAS

1. Almond, N. M. y Parkhouse, R. M. 1986. The Ig class distribution of antiphosphoryl choline responses in mice infected with parasitic nematodes. *Immunology*. **59**: 633–635.
2. Afzali, B., Mitchell, P., Lechler, R. I., John, S. y Lombardi, G. 2009. Translational Mini-Review Series on Th17 Cells: Induction of interleukin-17 production by regulatory T cells. *Clinical and Experimental Immunology*. **159**: 120-130.
3. Appleton, J. A. y Mcgregor, D. D. 1984. Rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in suckling rats. *Science*. **226** (70).
4. Appleton, J.A. & Mcgregor, D. D. 1987. Characterization of the immune mediator of rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in suckling rats. *Immunology*. **62**: 477-484.
5. Appleton, J. A., Schain, L. R. y McGregor D. D. 1988. Rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in suckling rats: mediation by monoclonal antibodies. *Immunology*. **65**:487–492.
6. Appleyard, G. D., Conboy, G. y Gajadhar, A. A. 1998. *Trichinella spiralis* in sylvatic hosts from Prince Edward Island. *Journal of Wildlife Diseases*. **34**: 158–160.
7. Au, C. S., Ko, R. C., Simon J. W. y cols. 1983. Study of acute trichinosis in ghurkas; specificity and sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assays for IgM and IgE antibodies to *Trichinella* larva antigens in diagnosis. *Transactions Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*. **77** (3):412-415.
8. Baudner, B. C., Giuliani, M. M., Verhoef, J. C. Rappuoli, R., Junginger, H. E. y Giudice G. 2003. The concomitant use of the LTK63 mucosal adjuvant and of chitosan-based delivery system enhances the immunogenicity and efficacy of intranasally administered vaccines. *Vaccine*. **21**: 3837-3844.
9. Beiting, D.P., Bliss, S.K., Schlafer, D.H., Roberts, V.L. y Appleton J.A. 2004. Interleukin-10 limits local and body cavity inflammation during infection with muscle-stage *Trichinella spiralis*. *Infection and Immunity*. **72**: 3129–3137.
10. Beiting, D., Gagliardo, L., Hesse, M., Bliss, S., Mexkill, D., y Appleton J. 2007. Coordinated control of immunity to muscle stage *Trichinella spiralis* by IL-10, regulatory T cells, and TGF- β . *The Journal of Immunology*. **178**: 1039-1047.

-
11. Bell, R.G. y McGregor, D.D. 1979. *Trichinella spiralis*: role of different cycle phase in induction, maintenance and expression of rapid expulsion in rats. *Experimental Parasitology*. **48**: 51–60.
 12. Bell R. G. 1998. The generation and expression of immunity to *Trichinella spiralis* in laboratory rodents. *Advanced Parasitology*. **41**:149-217.
 13. Bischoff, *et al*, 2003. Taxonomy Browser, NCBI. www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser
 14. Bolás-Fernández, F. y del Corral-Bezara L. 2006. TSL-1 antigens of *Trichinella*: an overview of their potential role in parasite invasion, survival and serodiagnosis of trichinellosis. *Research in Veterinary Science*. **81**: 297–303.
 15. Bruschi, F. 2002. The immune response to the parasitic nematode *Trichinella* and the ways to escape it. From experimental studies to implications for human infection. *Current Drug Targets and Immune Endocrinal Metabolism Disorders*. **2**(3):269-280.
 16. Bruschi, F., Pozio, E., Watanabe, N., Gomez, M.A., Ito, M., Huang, Y. y Binaghi, R. 1999. Anaphylactic response to parasite antigens: IgE and IgG1 independently induce death in *Trichinella*-infected mice. *International Archives of Allergy and Immunology*. **119**: 291–296.
 17. Bruschi, F. y Murrell, D. 2002. New aspects of human triquinelosis: the impact of new *Trichinella* species. *Postgraduate Medical Journal*. 78 pp. 15-22.
 18. Bruschi, F. Korenaga, M. y Watanabe N. 2008. Eosinophils and *Trichinella* infection toxic for the parasite and the host? *Trends in Parasitology*. **24**(10):462-467.
 19. Bruschi, F. 2012. Trichinellosis in developing countries: is it neglected? *The Journal of Infection in Developing Countries*. **6**(3):216-222.
 20. Capó, V. y Despommier, D. D. 1996. Clinical Aspects of Infection with *Trichinella* spp. *Clinical Microbiology Reviews*. **9** (1): 47-54.
 21. Chávez –Ruvalcaba. 2006. Evaluacion del albendazol, ivermectina y nitazoxanida en infección causada por *Trichinella spiralis* en modelo suino. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. **25** (2).
 22. Dea-Ayuela, M. A. y Bolas-Fernández, F. 1999. *Trichinella* antigens: a review. *Veterinary Research*. **30**(6):559-571.

-
23. Dea-Ayuela, M. A., Rama-Iñiguez, S. y Bolas-Fernández, F. 2006. Vaccination of mice against intestinal *Trichinella spiralis* infections by oral administration of antigens microencapsulated in methacrylic acid copolymers. *Vaccine*. **24**(15):2772-2780.
24. De la Rosa, J. L., Alcantara, P. y Correa, B. D. 1995. Investigation of cross-reactions against *Trichinella spiralis* antigens by enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay in patients with various diseases. *American society for microbiology*. **2**: 122-124.
25. De la Rosa, J. L. y Correa-Beltrán, D. 1996. Trichinellosis en México. *Vigilancia Epidemiológica*, InDRE-SS. México, **51**(13).
26. De la Rosa, J. L. y Gómez- Priego, A. 2004. Triquinelosis. **En**: Becerril-Flores, M. A. (ed). *Parasitología Médica*. México. Mc Graw Hill, pp. 208- 214.
27. De la Rosa, J. L., Alvarez, N., y Gómez-Priego, A. 2007. Study of the reproductive capacity of *Trichinella spiralis* antigens during experimentally infected mice under-dosed with albendazole or mebendazole. *Tropical Biomedicine*. **24**(2): 93-97.
28. De la Rosa, J. L. 2012. INDUCCION DE INMUNIDAD PROTECTORA TIPO TH1 EN LA TRIQUINELOSIS EXPERIMENTAL MURINA. Tesis de Doctorado en Investigación Inmunológica. Escuela Superior de Medicina. IPN. México. p 79.
29. Dennis, D. T., Despommier, D. D., Davis, N. 1970. Infectivity of the new born larva of *Trichinella spiralis* in the rat. *The Journal of Parasitology*. **56**(5): 974-977.
30. Despommier, D. D. 1978. *Trichinella spiralis*. Site selection by the larva during the enteral phase of infection in mice. *Experimental Parasitology*. **44**: 209-215.
31. Despommier, D. D. 1998. How Does *Trichinella spiralis* Make Itself at Home? *Parasitology Today*. **14**(8):318-323.
32. Deville, A. de Pooter, J. y Aucouturier. 2005. Influence of adjuvant formulation on the induced protection of mice immunized with total soluble antigen of *Trichinella spiralis*. *Veterinary Parasitology*. **132** (1-2):75-80.
33. Dupouy-Camet, J. 2000. Trichinellosis: a worldwide zoonosis. *Veterinary Parasitology*. **93**: 191-200.
34. Ellis, L. A., McVay, C. S., Probert, M. A., Zhang, J., Bundle, D. R. y Appleton J. A., 1997. Terminal beta-linked tyvelose creates unique epitopes in *Trichinella spiralis* glycan antigens. *Glycobiology*. **7**(3):383-390.

-
35. Fabre, M. V., Beiting, D. P., Bliss, S. K. y Appleton J. A. 2009. Immunity to *Trichinella spiralis* muscle infection. *Veterinary Parasitology*. **159**: 245-248.
36. Flisser, S. A. y Pérez, T. R. 2006. *Aprendizaje de a parasitología basado en problemas*. México. Ed. Editores de Textos Mexicanos. pp 614.
37. Gajadhar, A. A. y Gamble H. R. 2000. Historical perspectives and current global challenges of *Trichinella* and trichinellosis. *Veterinary Parasitology*. **93**: 183- 189.
38. Gurish, M. F., Humbles, A., Tao, H., Finkelstein, S., Boyce, J., Craig, G., Friend, D. S. y Austen K. F. 2002. CCR3 is required for tissue eosinophilia and larval cytotoxicity after infection with *Trichinella spiralis*. *Journal of Immunology*. **168**(11):5730-5736.
39. Gómez-Priego, A., Crecencio-Rosales, Lidia. y De la Rosa, J. L. 2000. Serological Evaluation of Thin-Layer Immunoassay-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Antibody Detection in Human *Trichinellosis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. **7**(5): 810- 812.
40. Gottstein, B., Pozio, E. y Nöckler, K. 2009. Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control of Trichinellosis. *Clinical Microbiology Reviews*. **22**(1):127-145.
41. Grecis, R. K., Hültner, L. y Else K. J. 1991. Host protective immunity to *Trichinella spiralis* in mice: activation of Th cell subsets and lymphokine secretion in mice expressing different response phenotypes. *Immunology*. **74**(2):329-32.
42. Hasnain, S. Z. 2011. Muc5ac: a critical component mediating the rejection of enteric nematodes. *The Journal of Experimental Medicine*. **208**:893–900.
43. Holmgren, J., Czerkinsky, C., Lycke, N. y Svennerholm, A. M. 1994. Strategies for the induction of immune responses at mucosal surfaces making use of cholera toxin B subunit as immunogen, carrier and adjuvant. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **50**: 42-54.
44. Illum, L., Jabbal-Gill, I., Hinchcliffe, M., Fisher, A. N. y Davis, S. S. 2001. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **51**: 81–96.
45. Inaba, T., Sato, H. y Kamiya, H. 2003. Monoclonal IgA antibody-mediated expulsion of *Trichinella* from the intestine of mice. *Parasitology*. **126**: 591-598.
46. Kapel, C. M. O. 2000. Host diversity and biological characteristics of the *Trichinella* genotypes and their effect on transmission. *Veterinary Parasitology*. **93**: 263-278.

-
47. Karmanska, K., Houszka, M., Widyma, A., y Stefaniak, E. 1997. The cells observed inside capsules of larvae in the course of experimental trichinellosis in mice. *Wiadomosci Parazytologiczne*. **43**: 251–256.
48. Khan, W. I., Blennerhasset, P., Ma C., Matthaei, K. I. y Collins, S. M. 2001. Stat6 dependent goblet cell hyperplasia during intestinal nematode infection. *Parasite Immunology*. **23**: 39–42.
49. Knight, P. A., Brown, J. K. y Pemberton A. D. 2008. Innate immune response mechanisms in the intestinal epithelium: potential roles for mast cells and goblet cells in the expulsion of adult *Trichinella spiralis*. *Parasitology*. **135**: 655-670.
50. Kociecka, W. 1993. Early clinical syndromes of severe Trichinellosis. p. 475–480. In W. S. Campbell, E. Pozio, and F. Bruschi (ed.). *Trichinellosis. Proceedings of the 8th International Conference on Trichinosis, 1993*. Istituto Superiore di Sanita' Press, Rome.
51. Kociecka, W. 2000. Trichinellosis: human disease, diagnosis and treatment. *Veterinary Parasitology*. **93**: 365- 383.
52. Kolodziej-Sobocinska, M., Dvoroznakova, E., Dziemian, E. 2006. *Trichinella spiralis*: Macrophage activity and antibody response in chronic murine infection. *Experimental Parasitology*. **112**: 52-62.
53. Korenaga, M., Wang, C. H., Bell, R. G., Zhu, D., y Ahmad, A. 1998. Intestinal immunity to *Trichinella spiralis* is a property of OX8- OX22- T-helper cells that are generated in the intestine. *Immunology*. **66**(4):588-594.
54. Kozar, Z. 1970. Trichinosis in Europe. In: *Trichinosis in Man and Animals* (S.E. Gould, ed.), pp. 423–436. Springfield, IL: Charles C Thomas Publisher.
55. Li, C. K. F. y Ko, R. C. 2001. Inflammatory response during the muscle phase of *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* infections. *Parasitology Research*. **87**(9):708-714.
56. Llabot, J. M., Palma, S. D. y Allemandi, D. A. 2008. Nanopartículas poliméricas sólidas. *Farmacotec*. (53): 40– 47.
57. ManWarren, T., Gagliardo, L., Geyer, J., McVay, C., Pearce-Kelling, S. y Appleton, J. 1997. Invasion of intestinal epithelia in vitro by the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Infection and Immunity*. **65** (11): 4806-4812.
58. McGuire, C., Chan, W. C. y Wakelin, D. 2002. Nasal immunization with homogenate and peptide antigens induces protective immunity against *Trichinella spiralis*. *Infection and Immunity*. **70** (12): 7149-7152.

-
59. McVay, C.S., Tsung, A. y Appleton, J. 1998. Participation of parasite surface glycoproteins in antibody-mediated protection of epithelial cells against *Trichinella spiralis*. *Infection and Immunity*. **66** (5): 1941–1945.
60. Medina-Lerena, M. S., Ramirez-Álvarez, A. Kühne, M., Gómez-Priego, A. y De-la-Rosa J. L. 2009. *Tropical Animal Health and Production*. **41**: 437-442.
61. Meslin, X. F., Stohr, K. and Heymann D. 2000. Public health implications of emerging zoonoses. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. **19**: 310-317.
62. Mitreva, M. y Jasmer, D.P. 2006. Biology and genome of *Trichinella spiralis*, *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.124.1, <http://www.wormbook.org>.
63. Murrell, K. D. 1994. Beef as a source of trichinellosis. *Parasitology Today*. **10**: 434-444.
64. Murrell, k. D., y F. Bruschi. 1994. Clinical trichinellosis. En: *T. Sun* (ed.), *Progress in clinical parasitology*. CRC Press, Boca Raton, Fla. p. 117-150.
65. Murrell, K. D. y Pozio, E. 2000. Trichinellosis: the zoonosis that won't go quietly. *International Journal for Parasitology*. **30**: 1339-1349.
66. Nelson, G.S. 1988. More than a hundred years of parasitic zoonoses: with special reference to trichinosis and hydatid disease. *Journal of Comparative Pathology*. **98**: 135–153.
67. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Diario Oficial de la Federación, 22 de agosto de 2001.
68. Onah, D. N., Nawa, Y. 2000. Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes. *Korean Journal of Parasitology*. **38**:209–36.
69. Ortega-Pierres, G. 1995. La caracterización de los antígenos de superficie del nemátodo parásito *Trichinella spiralis*: estudio de su participación en los mecanismos de protección y su utilidad en el diagnóstico de la triquinosis. *Gaceta medica de México*. **131** (1):2-13.
70. Yopez-Mulia, L., Hernández-Bello, R., Arizmendi-Puga, N., Fonseca-Liñán, R., Ortega-Pierres, G. 2007. Contributions to the study of *Trichinella spiralis* TSL-1 antigens in host immunity. *Parasite Immunology*. **29**: 661-670.

-
71. Ortega-Pierres, G., Arriaga, C. y Yépez-Mulia, L. 2000. Epidemiology of trichinellosis in Mexico, Central and South America. *Veterinary Parasitology*. **93**: 201-225.
72. Patel, N., Kreider, T., Urban, J., Gause, W. 2009. Characterization of effector mechanisms at the host: parasite interface during the immune response to tissue-dwelling intestinal nematode parasites. *International Journal of Parasitology*. **39**(1): 13-21.
73. Pei, Liu., Zhong, Q. W., Ruo, D. L., Peng, J., Shao, R. L., Li, N. L., Xin, Z. Z., Xiang, C. C., Chuan, Y., Hui, J. R., Jing, C. 2015. Oral vaccination of mice with *Trichinella spiralis* nudix hydrolase DNA vaccine delivered by attenuated Salmonella elicited protective immunity. *Experimental Parasitology*. **153**: 29-38.
74. Pontow, S. E., Kery, V. y Stahl, P. D. 1992. Mannose receptor. *International Review of Cytology*. **137**: 221.
75. Porporatto, C., Bianco, I. D., Riera, C. M. y Correa, S. G. 2003. Chitosan induces different L-arginine metabolic pathways in resting and inflammatory macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **304**: 266.
76. Porporatto, C., Bianco, I. D., Cabanillas, A. M., Correa, S. G. 2004. Early events associated to the oral co-administration of type II collagen and chitosan: induction of anti-inflammatory cytokines. *International Immunology*. **16**: 433-441.
77. Porporatto, C., Bianco, D. I. y Correa, G. S. 2005. Local and systemic activity of the polysaccharide chitosan at lymphoid tissues after oral administration. *Journal of Leukocyte Biology*. **78**: 62- 69.
78. Porporatto, C., Canali, M. M., Bianco, I. D. y Correa S. G. 2009. Ability of the polysaccharide chitosan to inhibit proliferation of CD4+ lymphocytes from mucosal inductive sites, *in vitro* and *in vivo*. *Cell proliferation*. **42**: 780-787.
79. Pozio, E., La Rosa, G., Murrell, K. D. y Lichtenfels, J. R. 1992. Taxonomic revision of the genus *Trichinella*. *Journal of Parasitology*. **78** (4): 654-659.
80. Pozio, E. 1995. Ecology of *Trichinella* parasites in Europe on the threshold of the third millennium. *Helmintologia*. **32**: 111-116.

-
81. Pozio, E., Serrano, F. J., La Rosa, G., Reina, D., Perez-Martin, E., Navarrete, I., 1997. Evidence of potential gene flow in *Trichinella spiralis* and in *Trichinella britovi* in Nature. *Journal of Parasitology*. **83**: 163–166.
82. Pozio, E., Miller, I., Jarvis, T., Kapel, C.M.O., La Rosa, G. 1998. Distribution of sylvatic species of *Trichinella* in Estonia according to climate zones. *Journal of Parasitology*. **84**: 193–195.
83. Pozio, E. 1998. Trichinellosis in the European Union: epidemiology, ecology and economic impact. *Parasitology Today*. **14**:35-38.
84. Pozio, E. 2000. Factors affecting the flor among domestic, synanthropic and sylvatic cycles of *Trichinella*. *Veterinary Parasitology*. **93**: 241-262.
85. Pozio, E. 2001. New patterns of *Trichinella* infections. *Veterinary Parasitology*. **98**: 133–148.
86. Pozio, E., Casulli, P., Bologov, V. V., Marucci, G. y la Rosa, G. 2001. Hunting practices increase the prevalence of *Trichinella* infection in wolves from European Russia. *Journal of Parasitology*. **87**:1498–1501.
87. Pozio, E. 2005. The broad spectrum of *Trichinella* hosts: from cold- to warm- blooded animals. *Veterinary Parasitology*. **132**: 3- 11.
88. Pozio, E. y Murrell, KD. 2006. Systematics and Epidemiology of *Trichinella*. *Advances in Parasitology*. **63**: 367-439.
89. Pozio, E. 2007. World distribution of *Trichinella* spp. infections in animals and humans. *Veterinary Parasitology*. **149**:2-21.
90. Pozio, E., Hoberg, E., La Rosa, G. y Zarlenga D. S., 2009. Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of nematodes belonging to the *Trichinella* genus. *Infection, Genetics and Evolution*. **9**: 606- 616.
91. Quiroz-Romero y Landeros-Ramirez. 1988. Valoración del tiempo de sobrevivencia de las larvas de *Trichinella spiralis* en chorizo de cerdo. *Revista Mexicana de Parasitología*. **1**(1): 22-24.
92. Ramaswamy, K., Hakimi, J. y Bell, R. G., 1994. Evidence for an interleukin 4-inducible immunoglobulin E uptake and transport mechanism in the intestine. *Journal of Experimental Medicine*. **180**(5):1793-1803.

-
93. Ramírez-Melgar, M. C., Gómez-Priego, A., de-la-Rosa, J. L. 2007. Application of Giemsa stain in the easy detection of *Trichinella spiralis* muscle larvae. *Korean Journal of Parasitology*. **45**(1):65-68.
94. Ribicich, M., Gamble, HR., Rosa, A., Bolpe J. y Franco, A. 2005. Trichinellosis in Argentina: an historical review. *Veterinary Parasitology*. **132**: 137-142.
95. Ribicich, M., Gamble, H. R., Bolpe, J., Scialfa, E., Krivokapich, S., Cardillo, N., Betti A., Cambiaggi-Holzmann, M. L., Pasqualetti, M., Fariña, F., y Rosa A. 2010. *Trichinella* infection in wild animals from endemic regions of Argentina. *Parasitology Research*. **107**: 377-380.
96. Roberts, T., Murrell, KD., Marks, S. 1994. Economic losses caused by foodborne parasitic diseases. *Parasitology Today*. **10**:419-442.
97. Robinson, K., Bellaby, T. y Wakelin, D. 1995. Oral and parenteral vaccination against *Trichinella spiralis* infections in high- and low-responder mice. *International Journal of Parasitology*. **25**: 989-992.
98. Rodríguez, H. N., Valderrama, N. A., Alarcón, C. H. y López, M. A. 2010. Preparación de partículas de quitosano reticuladas con Tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. **76** (4).
99. Saenz, S. A., Noti, M., y Artis, D. 2010. Innate immune cell populations function as initiators and effectors in Th2 cytokine responses. *Trends in Immunology*. **31**: 407-413.
100. Seferian, P.G. y Martinez, M.L. 2001. Immune stimulating activity of two new chitosan containing adjuvant formulations. *Vaccine*. **19**: 661-668.
101. Silberstein, D. S. y Despommier, D.D. 1984. Antigens from *Trichinella spiralis* that induce a protective response in the mouse. *Journal of Immunology*. **32**(2):898-904.
102. Shibata, Y., Metzger, W. J. y Myrvik, Q. N. 1997a. Chitin particle-induced cell-mediated immunity is inhibited by soluble mannan: mannose receptor-mediated phagocytosis initiates IL-12 production. *Journal of Immunology*. **159**: 2462-2467.
103. Shibata, Y., Foster, J. L. A., Metzger, M. y Myrvik Q. N. 1997b. Alveolar macrophage priming by intravenous administration of chitin particles, polymers of N-acetyl-D-glucosamine, in mice. *Infection and Immunity*. **65**:1734.

-
104. Sumiyoshi, M. y Kimura Y. 2006. Low molecular weight chitosan inhibits obesity induced by feeding a high-fat diet long-term in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **58**: 201–207.
105. Takahashi, Y. 1997. Antigens of *Trichinella spiralis*. *Parasitology Today*. **13**(3):104-106.
106. Thanou, M., Verhoef, J. C., y Junginger, H. E. 2001. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **52**: 117-126.
107. Tinoco-Velázquez, I., Gómez-Priego, A., Mendoza, R., de la Rosa, J. L. 2002. Searching for antibodies against *Trichinella spiralis* in serum samples of patients with febrile syndrome. *Annals of Tropical Medicine y Parasitology*. **96** (4): 391-395.
108. Urban, J. F., Schopf, L., Morris, S. C., Orekhova, T., Madden, K. B., Betts, C. J., Gamble, H. R., Byrd, C., Donaldson, D., Else, K. y Finkelman, F. D. 2000. Stat6 signaling promotes protective immunity against *Trichinella spiralis* through a mast cell- and T cell dependent mechanism. *Journal of Immunology*. **164**: 2046–2052.
109. van Knapen, F. 2000. Control of trichinellosis by inspection and farm management practices. *Veterinary Parasitology*. **93**: 385–392.
110. Venturiello, S. M., Malmassari, S. L., Costantino, S. N. Nuñez, G. G. 2000. Cytotoxicity-blocking antibodies in human chronic trichinellosis. *Parasitology Research*. **86**(9):762-767.
111. Vilallonga-Vázquez. 2009. El control de las triquinelosis. Nuevas tendencias y situación actual en la Comunidad de Madrid. <http://infosegalim.blogspot.com/>
112. Villela, J.B. 1970. Life cycle and morphology in: *Trichinosis in man and animals*. Ed. S. E. Gould. y Charles. C. Thomas. Springfield, Illinois. pp. 19-60.
113. Walsh, A. M., Sweeney ,T., Bahar, B., y O’Doherty, J. V. 2013. Multi-functional Roles of Chitosan as a Potential Protective Agent against Obesity. *PLoS ONE*. **8** (1).
114. Wright, K. A., Weidman, E., y Hong, H., 1987. The distribution of cells killed by *Trichinella spiralis* in the mucosal epithelium of two strains of mice. *Journal of Parasitology*. **73**: 935-939.
115. Xinping Zhu., Yuan Gu., Bin Zhan., Yaping Yang., Xiaodi Yang., Xi Zhao., Lei Wang., Jing Yang., Kuo BI., Yunyun Wang. 2014. Protective effect of a prime-boost strategy with the Ts87 vaccine against *Trichinella spiralis* infection in mice. *Biomed Research International*.

116. Yang Y., Zhang Z., Yang J., Chen X., Cui S., Zhu X. 2010. Oral vaccination with Ts87 DNA vaccine delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* elicits a protective immune response against *Trichinella spiralis* larval challenge. *Vaccine* **28**: 2735–2742.

117. Yang J., Kawamura I., Zhu H., and Mitsuyama M. 1995. Involvement of natural killer cells in nitric oxide production by spleen cells after stimulation with *Mycobacterium bovis* BCG: study of the mechanism of the different abilities of viable and killed BCG. *Journal of Immunology*. **155**:5728.