



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

“Captura de anticuerpos y antígenos en suero  
de ratas infectadas experimentalmente con  
*Trichinella spiralis*”

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
P R E S E N T A  
JORGE MORA HERNÁNDEZ

ASESORES:

M. EN C. MA. DOLORES CORREA BELTRÁN

M. EN C. JORGE LUIS DE LA ROSA ARANA

TEJAS CON  
FALLA DE ORIGEN

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1998

268077



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.



UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

VIVIENDA NACIONAL  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

U. N. A. M.  
SECRETARÍA DE ESTUDIOS  
PROFESIONALES CUAUTITLAN



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

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

Capture de anticuerpos y antígenos en suero de ratas  
infectadas experimentalmente con Trichinella spiralis

que presenta el pasante Jorge Mora Hernández  
con número de cuenta 8204602-0 para obtener el TITULO de  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATTENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo de Méx, a 27 de Mayo de 1998

PRESIDENTE QFB Idalia Avila Miyazawa

VOCAL Dr Marco A Vega López

SECRETARIO M en C. Ma. Dolores Correa Beltrán

PRIMER SUPLENTE M en C Victor M Zendejas Buitrón

SEGUNDO SUPLENTE MVZ Angel G Martínez Sosa

**A MIS PADRES:**

**ADALBERTO MORA.**

A su memoria, por todo el afecto y comprensión que me brindo, el dedico esta obra con mucho amor.

**Ma. CONCEPCION HERNANDEZ.**

Por toda la confianza, apoyo y paciencia dedicada para que saliera adelante. ¡Gracias!

**A MIS HERMANOS:**

**YOLANDA, CARMEN, TERE, RAYMUNDO,**

**LUPE, BERTHA, ADALBERTO Y MANUEL**

Por compartir los buenos y malos momentos en que hemos estados.

**A MIS SOBRINOS Y PRIMOS**

**JAVIER, GABY, MIGUEL ANGEL, IVONE, MONCE,**

**BRUNO, WENDY, NANCY, CESAR, ELIZABETH,**

**ANGELICA, ANSELMA, ALEJANDRA, ALMA,**

**ARMANDO, MARTIN Y PACO**

Con todo el afecto del mundo.

**BERTHA ERENDIRA MORA**

**VEGA**

Quien ha sido una parte importante de mi vida.

# **A G R A D E C I M I E N T O S**

## **AL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA**

**TOÑO MEZA, ALEJANDRO, ROBERTO, OLGA,  
ARMANDO, HILDA, RAQUEL, ISA, LAURA,  
YOLA, EDITH, ZOILA, JUAN CARLOS, RIR, GIL,  
AMERICA, ROSY, MARIBEL, PATY, JUAN  
ANTOÑO IBARRA, RICARDO MONDRAGON,  
SUSANA, CHAVEZ, JUAN MANUEL, HECTOR,  
TERE Y CHELO**

## **AL LABORATORIO DE TRIQUINELOSIS**

**SUSANA GARCIA, LIDIA, SEIDY, CARMELITA,  
ALICIA, JUAN, NIEVES, GRICELDA, FERNANDO,  
VLADIMIR, ISSAC.**

A todos muchas gracia por su amistad y apoyo  
brindado durante todo este tiempo.

## **A LILIA ARGUAYO, HORTENCIA GONZALEZ Y ALBERTO GOMEZ**

Gracias por su valiosas colaboración y  
consejos en la realización de este trabajo.

## **EN ESPECIAL A DOLORES CORREA Y JORGE LUIS DE LA ROSA**

Gracias por abrimme las puertas de su confianza,  
amistad y apoyo en mi formación profesional.

## **A TODOS MIS AMIGOS**

**ANGELINA CRUZ, CLAUDIA ROJAS, IRENE  
TORRES, MARISA MARTINEZ EDITH  
SALGADO, JOSE BACSIN, GUS, VICKY SOSA ,  
MARIBEL HERRERA. LUCY LEAL, OLGA Y  
ALEJANDRA MENDOZA.**

Por todo su apoyo y palabras de aliento para  
continuar adelante. ¡Gracias!

## **A LOS PROFESORES**

**ANDREA BECERRIL, RAMOS CENDEJAS  
SELENE B. Y ANA LAURA VAZQUEZ**

Gracias por su amistad y contribuir en mi  
formación profesional.

## **A MIS SINODALES**

**IDALIA, VICTOR ZENDEJA, MARCO VEGA,  
ANGEL MARTINEZ**

Gracias por sus valiosos consejos y amistad en  
este trabajo

## **PERSONAL DE COMPUTACION**

**SUSY, ADRIANA, LUPITA, MIGUEL Y  
FERNANDO**

Por todo su apoyo y consejos y  
facilidades para la elaboración del  
presente trabajo. A todos ¡Gracias!

**AGRADEZCO AL BIOTERIO DE LA ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL POR EL SUMINISTRO DE LOS  
ANIMALES QUE SE UTILIZARON PARA EL DESARROLLO DE ÉSTE TRABAJO;  
ASÍ COMO; AL BIOTERIO DEL INDRE POR LOS CUIDADOS Y MANUTENCIÓN  
DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.**

**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE  
BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO NACIONAL DE DIAGNÓSTICO  
Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS (INDRE)**

**DEPENDIENTE DE LA SECRETARIA DE SALUD.**

# INDICE GENERAL

páginas

	Glosario	I
	Resumen	III
1	Generalidades	1
1.1	Introducción	1
1.2	Biología del parásito	3
1.2.1	Clasificación taxonómica del género <i>Trichinella</i>	3
1.3	Morfología	3
1.4	Bioquímica y fisiología	10
1.5	Ciclo de vida	10
1.5.1	Fase entérica	11
1.5.2	Fase parenteral	13
1.6	Epidemiología de la triquinelosis en México	15
1.7	Inmunología	17
1.7.1	Respuesta humoral	17
1.7.2	Respuesta celular	19
1.8	La enfermedad y el tratamiento	20
1.9	Diagnóstico	21
2	Justificación	26
3	Hipótesis	28
4	Objetivos	28
5	Material y métodos	29

	<b>páginas</b>	
5.1	Mantenimiento del ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i>	29
5.2	Preparación del antígeno de extracto crudo (EC)	29
5.3	Preparación de anticuerpos específicos contra el antígeno (EC)	30
5.4	Infección experimental	31
5.5	Muestra de suero	32
5.6	Tratamiento de la muestra	33
5.7	Digestión enzimática del músculo esquelético	33
5.8	Detección de anticuerpos por el ELISA	35
5.9	Detección de antígenos en suero	36
6	Resultados	41
6.1	Determinación de antígenos circulantes	41
6.2	Cinética de la aparición de anticuerpos	46
6.3	Determinación de la carga parasitaria	48
7	Discusión	51
8	Conclusiones	58
9	Bibliografía	59

## **INDICE DE CUADROS**

## **Páginas**

01 Clasificación taxonómica del género <i>Trichinella</i> .	<b>4</b>
02 Comparación de las características zoogeográficas de los diferentes grupos genéticos de <i>Trichinella</i> .	<b>6</b>
03 Volúmenes y soluciones para los geles separador y concentrador de poliacrilamida.	<b>37</b>

**INDICE DE FIGURAS****Páginas**

01 Esquema de la morfología de <i>Trichinella spiralis</i> .	<b>9</b>
02 Ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i> .	<b>13</b>
03 Estados de la República Mexicana en los que se han notificado la presencia de casos o brotes de triquinelosis.	<b>16</b>
04 Determinación de antígenos de la larva infectiva por IET.	<b>42</b>
05 Determinación de antígenos de la larva infectiva L <sub>1</sub> de <i>Trichinella spiralis</i> en ratas hembras.	<b>43</b>
06 Determinación de antígenos de la larva infectiva L <sub>1</sub> de <i>Trichinella spiralis</i> en ratas machos.	<b>44</b>
07 Determinación de antígenos de la larva infectiva L <sub>1</sub> de <i>Trichinella spiralis</i> en ratas no infectadas.	<b>45</b>
08 Cinética de aparición de anticuerpos contra la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i> por ELISA.	<b>47</b>
09 Densidad de larvas L <sub>1</sub> recuperadas de diferentes muestras de tejido muscular en hembras y machos.	<b>49</b>
10 Densidad de larvas L <sub>1</sub> recuperadas en el resto del músculo de cada una de las ratas.	<b>50</b>

## GLOSARIO

$\alpha$	Alfa.	$H_2O_2$	Peróxido de hidrogeno.
$\beta$	Beta.		
$^{\circ}C$	Grados centígrados.	$H_2SO_4$	Acido sulfúrico.
1x	Concentración 0.001mM.	HCl	Acido clorhídrico.
Ag	Antígeno.	hpi	Horas post-infección.
ATP	Adenosintrifosfato.	IET	Inmuno - electrotransferencia.
$cm^3$	Centímetro cubico.	IFI	inmunofluorescencia indirecta.
DELFLIA	Floroimmunoensayo de disociación estimulada por lantano	IgA	Inmunoglobulina clase A.
Dpi	Días post-infección.	IgE	Inmunoglobulina clase E.
EC	Extracto crudo	IgG	Inmunoglobulina clase G.
ECIA	Inmunoensayo estimulado por quimioluminiscencia.	IgM	Inmunoglobulina clase M.
ELFA	Ensayo inmunoenzimático de fluorescencia.	IL	Interleucina.
ELISA	Ensayo inmunoenzimático.	KDa	Kilo dalton.
g	Gramos.	$L_1$	Larva infectiva de <i>Trichinella spiralis</i> .
		LRN	Larvas recién nacidas.
		m	Metros.
		M	Molaridad.
		mA	Miliamperes.
		mg	Miligramo.

min	minutos.	Spi	Semanas post-
mL	Mililitros.		infección
mM	Milimolar.	srn	Suero de rata normal.
mm	Milímetros	SSa	Secretaria de Salud.
NaCl	Cloruro de sodio.	T+	Testigo positivo.
nm	Nanometros.	T-	Testigo negativo.
p>0.05	Probabilidad estadística.	TH2	Linfocitos T cooperadores 2
PBS	Amortiguador de fosfatos 0.01 M NaCl 0.15 M, pH 7.2	TLCK	N- $\alpha$ -p-tosil-lisina clorometil cetona.
PBS-Tween	Amortiguador de fosfatos/salina (PBS) con polioxietilensorbita monolaurato (Tween 20) al 0.5%.	TPCK	L-1-tosilamida 2 fenietil clorometil cetona.
pH	Potencial de hidrogeno.	tris-base	Tris hidroximetil aminometano.
Pi	Post-infección.	tris-HCl	Hidroximetil aminometano hidroclorehidrico.
PMSF	Fenilmetil sulfonil fluoruro.	volts	Voltios.
RIA	Radioinmunoensayo.	xg	Gravedades.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.	$\mu$ g	Microgramos.
		$\mu$ l	Microlitros.

## RESUMEN.

La triquinelosis es una zoonosis cosmopolita de origen alimentario causada por la larva infectiva del nemátodo *Trichinella spiralis*. El ciclo de vida del helminto se lleva a cabo en el mismo hospedero y presenta dos fases: una entérica y otra parenteral. En la triquinelosis humana, la diversidad de signos y síntomas que se presentan durante ambas fases pueden confundir el diagnóstico clínico.

Para el diagnóstico de la triquinelosis, detectando la presencia de anticuerpos contra *Trichinella spiralis* se han empleado métodos sensibles y específicos, como el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la inmunoelectrotransferencia (IET). Sin embargo estas técnicas solo demuestran el contacto del hospedero con el helminto y no determinan si el parásito está en una etapa activa. Para esto último se han desarrollado varias técnicas de captura de antígeno de *Trichinella spiralis* en suero, sin que hasta el momento exista una técnica diagnóstica eficiente; posiblemente por la formación de complejos inmunes.

Con el fin de captura de antígenos en suero de *Trichinella spiralis*, se infectaron experimentalmente a hembras y machos, y se realizó una cinética de captura de antígenos, implementó la técnica de inmunoelectrotransferencia y comparándola con una cinética de aparición de anticuerpos por ELISA. Teniéndose como resultado la nula detección de antígenos así mismo se determinó que la cantidad mínima de antígeno de extracto crudo que se logró detectar fue de 1 µg. Mientras que la detección de anticuerpos por ELISA,

mediante antígeno de extracto crudo fue alrededor de la segunda semana post-infección. No se encontró diferencia significativa, estadísticamente, con respecto al género a la intensidad de la absorbancia.

Adicionalmente, se determinó la carga parasitaria en diferentes tejidos (pierna, músculo abdominal, diafragma, lengua, corazón y intestino delgado), mediante digestión enzimática. Mostrándose que la pierna fue donde se encontró un mayor número de larvas por gramo, mientras que el corazón se encontró pocas larvas por gramo, en el intestino delgado no se encontraron larvas; sin embargo, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes tejidos u órganos, en los que se encontraron larvas tampoco se encontró diferencia estadísticamente significativa entre género.

# 1 GENERALIDADES

## 1.1 INTRODUCCIÓN.

La triquinelosis es una zoonosis cosmopolita de origen alimentario causada por la larva infectiva (L<sub>1</sub>) del nemátodo *Trichinella*, el cual se establece en el músculo esquelético de muchas especies de mamíferos, incluyendo el del ser humano, y el de algunas aves, por lo cual esta parasitosis constituye un problema médico y veterinario (Despommier, 1983; Yépez, 1995). Sin embargo, a pesar de que los hallazgos de triquinelosis humana se han documentado desde el siglo pasado (revisado por Vega, 1991), es hasta principios de este siglo que la parasitosis se reconoció como un problema de salud pública.

Epidemiológicamente, la triquinelosis tiene una distribución mundial, pero existen 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 infectada. En los países industrializados de Europa se han detectado brotes de triquinelosis de manera frecuente, principalmente debido al consumo de carne cruda de cerdo, jabalí y muy recientemente de caballo; en Italia, por ejemplo, se ha considerado a la región Noreste como zona epidémica debido a que se presentan frecuentes casos de triquinelosis (Bari *et al.*, 1990).

En México, los datos sobre la prevalencia y la distribución de la parasitosis son escasos e indican tasas diversas de infección. Por ejemplo en algunos

estudios hechos con muestras de cadáveres humanos en la Ciudad de México, indican que la frecuencia de esta parasitosis es del 4.1% (Martínez-Marañón, 1974). En un estudio seroepidemiológico realizado recientemente en una zona semi-rural de San Luis Potosí se obtuvo una prevalencia de anticuerpos específicos contra *Trichinella spiralis* del 1.9% (De la Rosa *et al.*, 1998), lo cual apoya la presencia de triquinelosis endémica. De hecho, Martínez-Marañón en 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 han 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, el cerdo y algunos roedores.

Para apoyar el diagnóstico clínico de esta parasitosis se han empleado técnicas parasitológicas como la triquinoscopia y la digestión enzimática artificial que ponen de manifiesto la presencia del helminto, así como técnicas serológicas, como el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la inmunoelectrotransferencia (IET) que detectan la presencia de anticuerpos en suero (Alcántara *et al.*, 1989; Alcántara y Correa, 1993). Sin embargo, estas técnicas no ponen de manifiesto una parasitosis activa. Con esta finalidad, en este trabajo se trató de determinar antigenemia en ratas infectadas experimentalmente, mediante el uso de la IET adaptada para detectar antígenos de la larva L<sub>1</sub>.

## 1.2 BIOLOGÍA DEL PARÁSITO

### 1.2.1 Clasificación Taxonómica del Género *Trichinella*

*Trichinella* es un helminto que pertenece al phylum Nematoda, en donde se encuentran agrupados otros parásitos de importancia médica como *Ascaris* sp., *Onchocerca* sp. y *Trichiuris* sp. En el cuadro 1 se enlista la clasificación taxonómica de *Trichinella*.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del género *Trichinella*

(Tomado de Alcántara *et al.*, 1992).

REINO	ANIMAL
SUBREINO	METAZOA
RAMA	EUMETAZOA
GRADO	BILATERIA
DIVISIÓN	PROTOSTOMIA
SUBDIVISIÓN	PSEUDOCOELOMATA
SUPERPHYLUM	ASCHELMINTHES
PHYLUM	NEMATODA
CLASE	ADENOFOREA
ORDEN	ENOPLIDA
FAMILIA	TRICHINELLIDAE
GÉNERO	<i>Trichinella</i>
ESPECIES	<i>T. spiralis</i>
	<i>T. nativa.</i>
	<i>T. britovi</i>
	<i>T. pseudospiralis</i>
	<i>T. nelsoni</i>
TIPOS GENETICOS	T5
	T6
	T8

Con base en estudios morfológicos, bioquímicos, biológicos, epidemiológicos, clínicos, inmunológicos y genéticos se han podido clasificar taxonómicamente cinco especies de *Trichinella* (Cuadro 1) y tres grupos genéticos T5, T6 y T8 (Arakawa y Todd, 1971; Britovi y Boev, 1972; Sukhneo y Meerovitch, 1979; Dick, 1983a, 1983b; Dick y Chadee, 1983; Lichtenfels *et al.*, 1983). Con respecto a los tipos genéticos T5, T6 y T8, aun no se han encontrado suficientes elementos para diferenciarlos como grupos independientes; de hecho, el análisis filogenético de sus secuencias genómicas, indican que se encuentran emparentados con *T. nativa* y *T. britovi* (Snyder *et al.*, 1993). Por otro lado, todos los tipos genéticos de *Trichinella* presentan diferencias zoogeográficas y de infectividad (cuadro 2) lo que hace aún más difícil determinar la ubicación taxonómica de los tipos T5, T6 Y T8.

Cuadro 2. Comparación de las características zoogeográficas e infectividad de los diferentes grupos genéticos de *Trichinella* (tomado de Wakelin y Goyal 1996).

ESPECIE	GENOTIPO (T1 - T8)	DISTRIBUCIÓN	CARACTERÍSTICAS
		GEOGRÁFICA	BIOLÓGICAS
<i>T. spiralis</i>	T1	Cosmopolita	Alta infectividad en roedores y cerdos
<i>T. pseudospiralis</i>	T4	Cosmopolita	Infecta a aves; no forma célula nodriza
<i>T. nelsoni</i>	T7	África tropical	Baja infectividad en ratas y cerdos; lento desarrollo de célula nodriza; no resiste la refrigeración
<i>T. nativa</i>	T2	Ártico y subártico	Alta resistencia a la refrigeración
<i>T. britovi</i>	T3	Zona templada	Baja infectividad en ratas y ratones; baja resistencia a la refrigeración
<i>Trichinella</i>	T5	Región Norártico	Fenotipo de <i>T. britovi</i>
<i>Trichinella</i>	T6	Área Subártica	Fenotipo de <i>T. nativa</i>
<i>Trichinella</i>	T8	África Subtrópica	Fenotipo de <i>T. britovi</i>

### 1.3 MORFOLOGÍA

El adulto presenta el diámetro de la parte posterior del cuerpo ligeramente más ancho que el de la parte anterior. El esófago consta de una parte anterior de tipo muscular y una posterior de tipo glandular denominado esticosoma, el cual está formado por una hilera de aproximadamente 55 células llamadas esticocitos; los esticocitos se dividen en  $\alpha$  y  $\beta$ , dependiendo del gránulo que secretan: los  $\alpha$  secretan polipéptidos mayores a 50/55 kDa y los  $\beta$  secretan un polipéptido de 48 kDa. Además la morfología y el gradiente de sedimentación también influyen en la clasificación de los esticocitos. El intestino es abierto, de tipo tubular y se abre en un ano casi terminal (Silberstein y Despommier, 1985).

Las hembras se diferencian de los machos por tener el extremo posterior romo y redondeado, mientras que los machos presentan dos apéndices caudales lobulados sin espículas copulatorias. Los machos miden entre 1.4 y 1.6 mm de longitud por 40  $\mu\text{m}$  de diámetro, las hembras miden de 3 a 4 mm de longitud por 60  $\mu\text{m}$  de diámetro (Lamothe y García, 1988; Olsen, 1974). Las hembras tienen la vulva orientada hacia la parte posterior del esticosoma; poseen un solo ovario localizado en la parte posterior del cuerpo, en el cual se producen óvulos de aproximadamente 25  $\mu\text{m}$  de diámetro, con tres cromosomas. El macho tiene un testículo que produce espermatozoides de tipo no flagelar con dos o tres cromosomas, por lo que es éste quien determina el sexo de la descendencia; las

células somáticas de las hembras tienen número cromosómico de 6 y las de los machos de 5 (Despommier, 1983).

Las larvas recién nacidas (LRN) miden 120  $\mu\text{m}$  de longitud por 7  $\mu\text{m}$  de diámetro y son la fase de invasión al músculo y al parecer en esta fase aun no tienen formado el esticosoma (Kim *et al*, 1983).

La larva infectiva ( $L_1$ ) se localiza en el músculo esquelético del hospedador potencial (figura 1); mide aproximadamente 1.2 mm de longitud por 40  $\mu\text{m}$  de diámetro y se encuentra rodeada de una cápsula de colágena en asociación con el miocito formando una unidad hospedadora llamada célula nodriza. Esta estructura se encuentra rodeada de un plexo de vénulas formando por una acción angiogénica provocada por el parásito; al parecer, estas vénulas tienen la finalidad de eliminar los desechos metabólicos, así como de proveer nutrientes. Se ha documentado que la célula nodriza protege al helminto del ataque del sistema inmune del hospedador y le confiere resistencia al congelamiento (Despommier, 1983). Las larvas  $L_1$  sobreviven *in vitro* en una atmósfera anaerobia.

El ciclo de vida de este parásito se caracteriza por presentar dos fases: una entérica, donde pasa por cuatro estadios larvarios y el adulto y la fase parenteral, que incluye la migración de la LRN y el establecimiento de la larva infectiva en el músculo esquelético (Despommier, 1977; Stewart y Giannini, 1982).

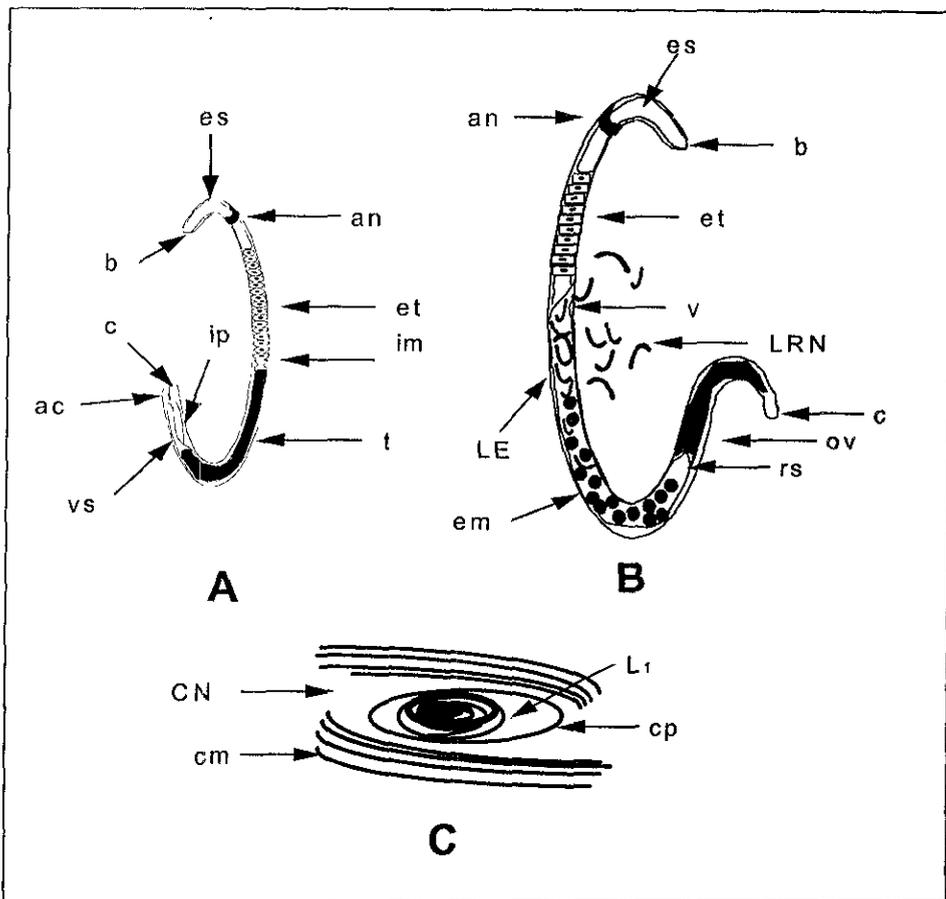


Figura 1. Esquema de la morfología de *Trichinella spiralis*. En A) se representa al macho; en B) a la hembra y a las larvas recién nacidas (LRN); en C) a la larva infectiva (L<sub>1</sub>). Anillo nervioso (an), boca (b), cápsula (cp), célula muscular (cm), célula nodriza (CN), cloaca (c), embriones (em), esófago (es), esticosoma (et), intestino medio (im), intestino posterior (ip), larva infectiva (L<sub>1</sub>), larvas en embriogénesis (LE), ovario (ov), receptáculo seminal (rs), testículo (t), vulva (v). (Tomado de Alcántara *et al.*, 1992).

## 1.4 BIOQUIMICA Y FISILOGIA.

El adulto y la larva L<sub>1</sub> son aerobios facultativos, ya que obtienen su energía a través de fermentaciones utilizando ácidos grasos mediante la vía de  $\beta$ -oxidación y del ciclo de Krebs. Las larvas recién nacidas necesitan para sobrevivir *in vitro* colesterol, azúcares, ácidos grasos y aminoácidos (Stewart, 1983). Las larvas L<sub>1</sub> sobreviven *in vitro* en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, aire al 95% por un periodo de 3 a 5 días, en un medio de cultivo que contenga aminoácidos, sales y vitaminas (Alcántara *et al.*, 1992).

## 1.5 CICLO DE VIDA

La transmisión del helminto es a través del consumo de larvas L<sub>1</sub> albergadas en tejido muscular (carne) cruda o mal cocida. En México, la triquinelosis humana se ha asociado al consumo carne de cerdo y sus derivados y a productos de res "adulterados" en forma intencional o inadvertida con carne de cerdo o caballo infectada (SSa., 1992). En algunos estudios epidemiológicos realizados en diferentes partes del mundo, se ha encontrado que la parasitosis esta relacionada con el consumo de carne de jabalí o de caballo y, dependiendo de los hábitos alimenticios de la población, la carne de oso y de otros animales silvestres también son una fuente de infección (Wiegger *et al.*, 1991).

De entre todos los helmintos que infectan animales, *T. spiralis* tiene una característica en su ciclo de vida que lo hace única entre todos ellos: todo el ciclo de vida se completa en el mismo hospedador. En términos generales, el ciclo de vida del parásito muestra dos fases claramente distinguibles: una entérica y una parenteral

### 1.5.1 Fase entérica

El hombre, al igual que cualquier otro hospedador potencial, se infecta al ingerir carne cruda o insuficientemente cocida que alberga a la larva infectiva (L<sub>1</sub>); la figura 2 ilustra el ciclo de vida de *Trichinella*. En el estómago, las larvas L<sub>1</sub> son liberadas del músculo esquelético por acción de los jugos gástricos y tardan aproximadamente diez minutos en emigrar e invadir el epitelio columnar y la lámina propia del intestino delgado. El helminto se sitúa generalmente en el duodeno y yeyuno, aunque es capaz de ocupar cualquier parte del intestino delgado (Dick y Silver, 1980).

Treinta horas después de la infección, la larva infectiva sufre cuatro mudas, pasando por cinco estados larvarios (de L<sub>1</sub> a L<sub>5</sub>) hasta convertirse en adulto. Durante esta etapa de cambio, el helminto sufre una morfogénesis extensa, remodelando la cutícula, las células glandulares hipodérmicas, el músculo, el sistema nervioso, el primordio genital, el aparato digestivo y el esticosoma. El hábitat del gusano adulto consiste en una hilera de células epiteliales columnares del intestino. Cinco días después de la infección, la hembra llega a invadir de 415

a 425 células y el macho de 140 a 152; por lo que a esta etapa se le conoce como intramulticelular, de manera interesante, no existe desintegración total de las células del hospedador como resultado de la penetración del helminto (Despommier, 1983).

Entre las 37 y las 40 horas post-infección (hpi), las hembras producen una feromona de atracción heterosexual (Belossevic y Dick, 1980). Los machos reptan hasta ocupar una hilera de células adyacentes a la que ocupa la hembra con la cual va a copular. La cópula se efectúa presumiblemente dentro del nicho intramulticelular dentro las siguientes 80 hpi. Se ha calculado que el macho puede inseminar a dos hembras, ya que el promedio de adultos encontrados en infecciones experimentales es de dos hembras por cada macho (Olsen, 1974). Después de la inseminación, los machos mueren y son expelidos, mientras que las hembras penetran la mucosa intestinal, llegando incluso al peritoneo y a los ganglios linfáticos mesentéricos. La embriogénesis dura alrededor de 90 h, entonces las larvas recién nacidas son liberadas hacia el quinto día después de la infección (dpi).

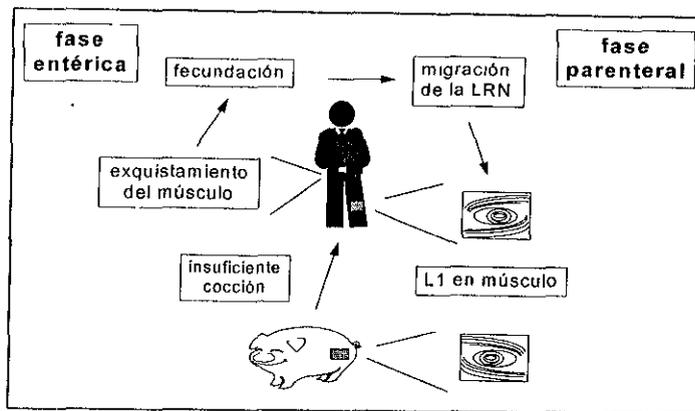


Figura 2. Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*.

### 1.5.2 Fase parenteral

Después de que las LRN son paridas (11 dpi), se introducen en la lámina propia del intestino hasta llegar a la circulación arterial o conductos linfáticos, pasan por el corazón y los pulmones hasta llegar a invadir las células del músculo esquelético, donde se establecen definitivamente. En estas células, las larvas inician un periodo de desarrollo post-embionario creciendo exponencialmente. En esta etapa, las larvas comienzan a enrollarse y se diferencian sexualmente. La transformación de las células musculares en la célula nodriza dura aproximadamente 20 días, período en el cual el helminto induce cambios profundos en los miocitos: las estrías desaparecen y los filamentos contráctiles se desorganizan, se incrementa el número de mitocondrias y aumentan la actividad catalítica, aumenta el tamaño del núcleo y se reubica al centro de la célula, el glicocáliz se hipertrofia y se transforma en una capa gruesa de colágena.

Finalmente el micocito invadido se rodea de vénulas que sirven como medio de transporte desde y hacia el interior de la célula, constituyendo una nueva unidad hospedadora denominada célula nodriza. En el desarrollo y mantenimiento de esta estructura, se ha propuesto la participación de una molécula secretada por la larva L<sub>1</sub> de 43 kDa, la cual se ha detectado en núcleo y citoplasma de la célula nodriza desde el día 8 post-penetración y hasta después de seis meses post-infección. Aunque la función biológica de esta molécula no se conoce con precisión, se ha propuesto que interacciona directamente con el genoma de la célula, porque el primer día que se detecta coincide con el máximo aumento en el tamaño del núcleo y nucleólo (Despommier, 1990; Despommier *et al.*, 1991; Stewart y Gianinni, 1982). La célula nodriza mantiene viva a la larva infectiva durante toda la vida del hospedador, aunque, se ha observado en el ser humano que la célula nodriza se calcifica cuando la larva L<sub>1</sub> se muere (Martínez-Marañón *et al.*, 1974).

En lo que respecta a la formación de la cápsula de colágena se ha argumentado que ésta podría proteger a la larva de la respuesta inmune del hospedador (Bagheri *et al.*, 1986) y que le podría conferir resistencia al congelamiento (Pozio *et al.*, 1989). De hecho se ha observado que la *T. nativa* resiste el congelamiento de -10° C durante 18 meses en el músculo del lobo y a -15° C en carne de oso polar por 12 meses (Campbell, 1983).

## 1.6 EPIDEMIOLOGÍA DE LA TRIQUINELOSIS EN MÉXICO

La primera observación de la larva L<sub>1</sub> fue hecha por el Dr. Miguel Zúñiga en 1891, quien al realizar la necropsia de un cadáver humano, observó en el músculo un puntillero blanquizco; el estudio histopatológico que efectuó el Dr. Manuel Toussaint confirmó que se trataba de la larva L<sub>1</sub> de *Trichinella*, (revisado en Mazzotti y Cavira, 1943). A partir de ese hallazgo se ha encontrado la larva L<sub>1</sub> en cadáveres humanos y de animales. Perrin (1942) examinó por compresión 200 diafragmas y encontró el 12.5% con *T. spiralis*; Mazzotti en 1943 determinó el 5% de prevalencia en diafragma, después Martínez-Marañón y colaboradores en 1974 encontraron larvas L<sub>1</sub> en el 4.1% de 1000 diafragmas; además, observaron mayor frecuencia de larvas en el diafragma de cadáveres del género femenino. En cadáveres de animales sinantrópicos como gatos, perros, ratas y recientemente en caballos, se ha encontrado que la presencia de larvas infectivas es común (Arriaga, *et al.*, 1995).

A pesar de que desde finales del siglo pasado se conoció la existencia de triquinelosis en México, es hasta la década de los años setenta cuando se inicia el estudio sistemático de los casos de triquinelosis. Los principales estados de la República que dan a conocer estos casos son: el DF, Chihuahua, Zacatecas y Estado de México.

Con la finalidad de establecer con precisión la distribución de la triquinelosis, en México se han realizado diversos estudios seroepidemiológicos para poner de manifiesto la prevalencia de anticuerpos específicos contra la larva

L<sub>1</sub>. Se ha observado que el 1.9% de la población en Cerritos, San Luis Potosí tiene anticuerpos (De la Rosa *et al.*, 1998). A nivel Nacional, la distribución de la triquinosis humana, se ha documentado en la zona Norte-Centro del país (figura 3). En esta zona se han registrado más de 360 casos en los últimos años (1987,1988,1990 revisado en Correa *et al.* 1997).

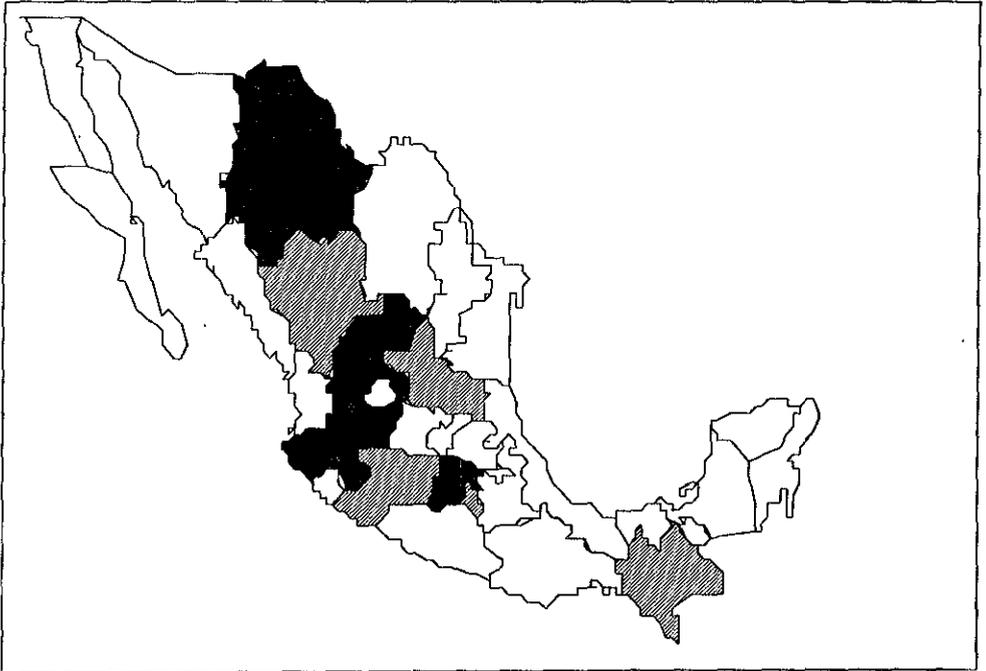


Figura 3. Estados de la República Mexicana en los que se ha notificado la presencia de casos o brotes de triquinosis. En obscuro se indican los estados en los que se han reportado oficialmente casos o brotes de triquinosis; en diagonales, los estados en donde se conoce de la existencia de triquinosis pero no se han reportado oficialmente; en blanco, los estados que carecen de reportes (Tomado de Correa *et al.*, en prensa).

## 1.7 INMUNOBIOLOGÍA

Es indudable que, por las características del ciclo biológico, durante la mayor parte del tiempo en que *T. spiralis* permanece en su hospedero definitivo, varios componentes del parásito (somáticos, de superficie o de excreción-secreción) pueden inducir respuestas inmunitarias y dependiendo de las características de esos inmunógenos tales respuestas pueden identificarse como del tipo humoral o celular.

### 1.7.1 Respuesta Humoral

La respuesta inmune humoral hacia la larva L<sub>1</sub> de *Trichinella* ha sido ampliamente estudiada bajo diferentes condiciones y en distintos modelos. En términos generales se ha descrito que está dirigida principalmente hacia los antígenos de superficie y del esticosoma, así como hacia los productos de excreción y secreción (Almond *et al.*, 1986; Ortega-Pierres *et al.*, 1989; Parkhouse y Ortega-Pierres 1984; Siberstein, 1983). Sin embargo, también se ha descrito que hay antígenos inmunodominantes en la cutícula de la lámina interior, vaina embrionaria, glándula hipodermal y gránulos exócrinos del tracto reproductivo del macho (Takahashi, 1997)

El estudio de la respuesta humoral de los pacientes con triquinelosis ha puesto de manifiesto la existencia de anticuerpos de las clases IgE, IgA, IgM e IgG; la IgG es la clase principal de inmunoglobulinas que se detectan durante toda

la infección. En orden secuencial de aparición, se han detectado las subclases IgG1, IgG3 e IgG4; la IgG1 domina durante toda la infección aunque la IgG4 se ha asociado con una respuesta crónica o repetitiva; sin embargo su presencia no correlaciona con la presencia de IgE específica, (Ljungstrom *et al.*, 1988). La IgG y la IgM específicas contra un extracto total de la L<sub>1</sub> se detecta desde la segunda semana post-infección (spi) y se pueden encontrar hasta después de nueve meses incluso hasta los 10 años pi (Dupouy-Camet *et al.*, 1988). Mediante el uso de la IET se ha observado que los sueros de humanos, cerdo, ratas y ratones infectados, así como los de conejo hiperinmunes, reconocen el mismo perfil antigénico en un extracto total de la larva L<sub>1</sub>, el cual está constituido principalmente por ocho antígenos: 38, 45, 54, 59, 73, 93 y 104 kDa (Alcántara y Correa, 1993; Almond *et al.*, 1986; Arriaga *et al.*, 1992; Ortega-Pierres *et al.*, 1989). Con los productos de excreción y secreción, los sueros de humanos y ratas infectadas reconocen un duplete de 54 y 59 KDa (De la Rosa, *et al* 1996).

Recientemente se ha caracterizado el epítipo responsable de la inmunodominancia y especificidad de los antígenos de superficie, de esticosoma y de los productos de excreción y secreción; consiste en un polisacárido denominado D-tivelosa constituido por un enlace  $\beta$  de 3,6 dideoxi-D-arabino-hexopiranososa (Ellis *et al.*, 1996; Ortega-Pierres *et al.*, 1996; Reason *et al.*, 1994), el cual es un componente de los antígenos agrupados como TsL-1; el principal de éstos tiene un peso molecular de 40 - 70 KDa en condiciones reductoras y de 45 - 100 KDa en no reductoras (Ortega, *et al.*, 1996).

### 1.7.2 Respuesta Celular

El estudio de la respuesta celular se ha enfocado principalmente hacia la forma en que actúa sobre los estados entéricos: los linfocitos T cooperadores (TH<sub>2</sub>) median la producción de interleucinas IL-3 e IL-4 lo que provoca reacciones inflamatorias en el intestino delgado, logrando con ello la expulsión de los gusanos adultos (Grencis *et al.*, 1985).

En modelos murinos de triquinelosis experimental, se ha observado que a partir del cuarto día post-infección, aumenta el número de las células cebadas y de los eosinófilos que se infiltran en la mucosa y en el lumen del intestino delgado; también se ha observado que aumenta la concentración de histamina, de leucotrienos y de algunas enzimas lisosomales, lo cual daña la mucosa del intestino delgado, acelerando los movimientos peristálticos que culminan con la expulsión de los helmintos al décimo día post-infección y con el máximo aumento en el número de células cebadas. Aumentando este fenómeno probablemente se inhibe el desarrollo de los estados entéricos y se reduce la fecundidad de la hembra (Despommier *et al.*, 1977; Wakelin y Wilson, 1980). Se ha documentado que los eosinófilos de la circulación sanguínea y de la cavidad peritoneal, previamente sensibilizados, se adhieren fuertemente *in vitro* a la superficie de las LRN, , iniciando de esta manera una reacción citotóxica mediada por anticuerpos (Gansmuller *et al.*, 1987; Lee y Befus, 1989).

## 1.8 LA ENFERMEDAD Y EL TRATAMIENTO

La gravedad de la enfermedad producida por *Trichinella spiralis*, al igual que la producida en otras parasitosis, depende de la carga parasitaria que alberga el hospedador. Se consideran infecciones leves aquellas en las que existen de 1 a 50 larvas por gramo de músculo, moderadas de 50 a 100 y graves más de 100. Las infecciones leves suelen ser asintomáticas, pero las graves se complican por la gran variedad de signos y síntomas que se presentan (Olsen, 1974). Los principales signos y síntomas que se presentan durante la fase entérica son: dolor abdominal, diarrea, náusea y vómito. El curso de la parasitosis en la fase parenteral involucra a varios órganos y sistemas como los pulmones, los órganos linfoides, el sistema nervioso, el músculo estriado, el corazón y el sistema nervioso central, en los cuales se producen daños importantes. Durante la fase parenteral se presenta edema facial, astenia, fiebre, escarlatina, cefalea, malestar general, anorexia, mialgias, artralgias, contracciones musculares, pérdida de peso, sopor y coma en infecciones severas.

Para el tratamiento de la triquinelosis se recomienda usar mebendazol a una dosis de 1.0 g diarios divididos en varias dosis durante catorce días (Katzung, 1984), así como tiabendazol en combinación con dexametasona a razón de 50 y 0.50 mg/kg/día respectivamente durante 5 días. Se recomienda el uso de la dexametasona por su acción analgésica, así como por su función anti-inflamatoria (Stevens, et al., 1993). La combinación de estos medicamentos reduce las manifestaciones del sistema cardiovascular y nervioso central y reducción de los

niveles de eosinófilos (Martínez *et al.*, 1986). La acción del fármaco consiste en unirse a receptores de glucosa por enlace covalente, obligando al parásito a utilizar su glucógeno hasta matarlo por falta de energía tipo ATP (Katzung, 1984).

## 1.9 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la triquinosis humana es difícil porque durante la fase entérica se presenta un cuadro clínico que puede ser confundido con el de otras enfermedades, como salmonelosis y brucelosis e incluso intoxicación alimentaria, debido a que se presenta diarrea, náuseas, vómito y dolor abdominal. En la fase parenteral el dolor muscular, la fiebre, la deshidratación, la encefalitis, los soplos cardiacos y la parálisis, podrían confundirla con fiebre reumática y problemas del corazón así como enfermedades como el dengue u otras febriles (Martínez-Marañón *et al.*, 1979; Fragoso, 1981). Las pruebas generales de laboratorio, como la biometría hemática en la que se puede detectar eosinofilia mayor a 500 eosinófilos/mm<sup>3</sup> y químicas para la detección de la 1, 6-difosfofructoaldosa y de la deshidrogenasa láctica, aunque inespecíficas, podrían orientar el diagnóstico de la triquinosis; con el apoyo de los antecedentes epidemiológicos de la zona. El apoyo al diagnóstico clínico durante la fase entérica puede ser complicado porque las pruebas de laboratorio son positivas a partir de los 10 dpi (Cabral-Soto *et al.*, 1989; De la Rosa *et al.*, 1997; Pawlowski, 1983).

Para apoyar el diagnóstico clínico de la parasitosis se han instrumentado diferentes métodos, como los parasitológicos y los serológicos. Los primeros involucran técnicas como la triquinoscopía, la digestión enzimática del tejido muscular y el xenodiagnóstico (Kolata, 1985; Mazzotti y Pastrana, 1943; Zimmermann, 1983). La triquinoscopía consiste en la inspección por microscopía de una muestra muscular; la digestión del tejido muscular se efectúa mediante pepsina y ácido clorhídrico al 1% en agitación continua a 37°C durante tres horas para liberar a las larvas, que se buscan en el sedimento de la digestión. El xenodiagnóstico se efectúa cuando se sospecha que un alimento es la fuente de infección; con este producto se alimentan ratas o ratones de laboratorio y después de 30 dpi se busca la presencia de la larva infectiva en el músculo esquelético. Mediante el uso de estos métodos se puede hacer el diagnóstico definitivo de la infección; sin embargo, el uso de estas técnicas se ha restringido a estudios post-mortem y además sólo detectan al 56% de los casos con respecto a la presencia de anticuerpos (Au *et al.*, 1983).

Debido a su alta sensibilidad, especificidad y versatilidad, el empleo de las técnicas inmunológicas en el diagnóstico de la triquinelosis ha sido importante porque ha permitido identificar la enfermedad de manera retrospectiva, detectando anticuerpos específicos. Para estos fines, los ensayos serodiagnósticos aplicados han sido numerosos y variados. Se han usado pruebas de precipitación de gel en tubo; la fijación de complemento, la hemaglutinación indirecta, la floculación con partículas (bentonita, colesterol, carbón) y otras más. De igual forma los antígenos utilizados han sido preparados a partir del cuerpo completo de larvas L<sub>1</sub> de

componentes de superficie o bien, productos de excreción-secreción obtenidos por cultivo celular *in vitro*. Todos los ensayos han brindado diferentes resultados de sensibilidad y especificidad diagnóstica (Lamb, 1964). Las pruebas serológicas que actualmente se usan en el diagnóstico de la triquinelosis son el radioinmunoensayo (RIA), la inmunofluorescencia indirecta (IFI), el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la inmunoelectrotransferencia (IET). El ELISA es la técnica de más amplio uso debido a que es relativamente barata y de fácil implementación, lo cual permite examinar un gran número de muestras en un período corto de tiempo (Yépez, *et al.*, 1994).

La IET fue descrita por Towbin y colaboradores en 1979, es un método analítico útil para el análisis de antígenos el cual permite identificar los antígenos útiles para el diagnóstico. La IET combina tres técnicas: la electroforesis en geles de poliacrilamida, la transferencia de las proteínas del gel a papel de nitrocelulosa y la reacción inmunoenzimática. En la electroforesis los extractos antigénicos o extractos proteicos pueden ser sometidos, a condiciones reductoras, y al someterse a electroforesis de poliacrilamida-SDS las proteínas se separan de acuerdo a sus pesos moleculares, lo que permite su identificación posterior en la reacción inmunoenzimática, haciendo que el método sea sensible. En triquinelosis, la técnica tiene la característica de determinar los antígenos que son reconocidos por sueros que contienen anticuerpos contra el nemátodo de *T. spiralis* teniendo la ventaja de detectar posibles falsos positivos que se puedan presentar en otras pruebas inmunológicas. La IET, junto con otros métodos inmunológicos han ayudado a clasificar un grupo de ocho antígenos de *T. spiralis* (TSL-1-TSL-8);

siendo el antígeno TSL-1 el más ampliamente caracterizado biológica e inmunológicamente (Ortega, *et al.*, 1996).

Sin embargo, debido a que la presencia de anticuerpos no pone de manifiesto una parasitosis activa, sino el contacto que ha habido entre el hospedador y el parásito, actualmente se han tratado de instrumentar diversos ensayos inmunoenzimáticos para la detección de antígenos circulantes (Takahasi *et al.*, 1990; Arriaga *et al.*, 1994).

Con las técnicas inmunoenzimáticas de captura de antígeno, se ha observado que la sensibilidad del diagnóstico se encuentra entre el 25 y 30%, en el mejor de los casos, con respecto a la presencia de anticuerpos (Arriaga *et al.*, 1992; Tadeunz *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1990b). Se ha supuesto que la falta de sensibilidad se debe a que los antígenos se encuentran formando complejos inmunes.

Por lo anterior, en este trabajo se planteó determinar la presencia de antígenos circulantes de *Trichinella spiralis* en ratas infectadas experimentalmente, mediante el uso del IET.

En el estudio de la triquinelosis humana se ha observado que existe una mayor prevalencia tanto de anticuerpos como de larvas en mujeres que en hombres, sugiriendo que las mujeres son más susceptibles a la infección que el hombre; aunque estas observaciones no han sido comprobadas, en modelos experimentales se ha observado que en zorros no existe susceptibilidad de género. Sin embargo, en otras parasitosis por nemátodos, se ha logrado determinar la susceptibilidad por género; como se ha observado en la respuesta

inflamatoria contra la infección de la cisticercosis, en donde la mujer presenta una mayor inflamación que el hombre. En la filariasis linfática se ha observado que el hombre es más susceptible a la infección después de los 11 años. Estudios en ratones infectados con *Brugia malayi*, muestran que los machos son más susceptibles a la infección (Del Brutto, *et al.*, 1992; Pain, *et al.*, 1997; Rajan, *et al.*, 1994).

Por lo que en el presente trabajo se sugirió determinar si existía susceptibilidad por género a la infección con *T. spiralis*, en ratas.

Un de los primeros métodos empleados en el diagnóstico de la triquinosis fue la triquinoscopia, como ya se mencionó anteriormente, la muestra ideal ha sido el diafragma, en necropsias; sin embargo, han sido pocos los estudios enfocados en determinar que tejido u órgano es el de mayor predilección y si esto es debido a la actividad muscular. Los autores que se han enfocado a este problema han encontrado que en el caballo, *T. spiralis* tiene mayor predilección por la lengua, y el diafragma, mientras que en el zorro, es el diafragma y otros los maseteros, (Nockel y Vorgt, 1996; Ionescu, 1996; Kapel, *et al.*, 1996).

## 2 JUSTIFICACIÓN

Para apoyar el diagnóstico clínico de la triquinelosis humana, se han instrumentado los métodos parasitológicos (que ponen de manifiesto la presencia de la larva infectiva en músculo esquelético) y los que detectan la presencia de anticuerpos específicos; estos últimos demuestran que el hospedador ha tenido contacto con el helminto pero no ponen de manifiesto una parasitosis activa. La detección de antígenos circulantes de la larva L<sub>1</sub> sería importante en el diagnóstico diferencial de la triquinelosis porque, por un lado, sería indicativo de una parasitosis activa y por otro sería de utilidad para verificar la eficacia de los fármacos antiparasitarios. En estudios epidemiológicos, la detección de antígenos permitiría conocer zonas con presión parasitaria.

Estudios previos, en los que se ha utilizado el ELISA como método de captura, han observado que no tiene la suficiente sensibilidad como para ser implementada como un método de rutina, posiblemente porque los epítomos se encuentran formando complejos inmunes. En este trabajo se trató de determinar la presencia de antígenos circulantes de la larva L<sub>1</sub> en ratas infectadas experimentalmente durante el curso temporal de la parasitosis haciendo uso de la inmunoelctrotransferencia. Debido principalmente a que este método obligaría a romper los complejos inmunes debiendo dejar libres los epítomos de los antígenos que subsecuente por la reacción inmunológica se deberían evidenciar.

Por otra parte, en las observaciones hechas en otros trabajos en los que se sospecha que la mujer es más susceptible que el hombre a la infección por *T.*

*spiralis*; lo que al parecer, no sucede en animales infectados experimentalmente. Se propuso determinar la susceptibilidad por género en función a la carga parasitaria y a la producción de anticuerpos en ratas

Adicionalmente, se determinó la densidad parasitaria en diferentes tejidos y órganos infectados por *T. spiralis*, para determinar si existía preferencia de la larva a invadir algún tejido u órgano. Esto debido principalmente, a que no hay suficientes trabajos al respecto y los reportados en caballos y zorros difieren en el tejido con mayor densidad parasitaria.

### **3 HIPÓTESIS**

Los anticuerpos específicos circulantes reaccionan con los antígenos de *T. spiralis* y forman complejos inmunes. Si se desnaturaliza el suero mediante condiciones reductoras determinadas, los antígenos de la larva L<sub>1</sub> se liberarán del complejo inmune y podrían detectarse e identificarse mediante un procedimiento analítico como la IET.

### **4 OBJETIVOS**

Determinar la presencia de antígenos circulantes de la larva infectiva de *T. spiralis* en muestras de sueros de ratas infectadas experimentalmente durante el curso de la parasitosis.

Determinar si existe diferencia entre carga parasitaria entre músculo y la producción de anticuerpos y antígenos, así como, si existe susceptibilidad de género.

## 5 MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Mantenimiento del ciclo de vida de *Trichinella spiralis*

El helminto se mantuvo en ratas machos Wistar de 200 g de peso y 3 meses de edad. Cada animal se infectó por vía oral con 7,000 L<sub>1</sub>. Los animales fueron aislados en jaulas de plástico de 1.20 m x 0.70 m x 0.40 m con aserrín estéril; se mantuvieron con agua y alimento condensado ambos estériles y se sacrificaron a los 40 dpi las larvas se recuperaron del músculo esquelético por digestión.

### 5.2 Preparación del antígeno de extracto crudo (EC).

El antígeno de *Trichinella spiralis* es un extracto crudo (EC) de la larva infectiva; para su preparación, se aislaron doscientas mil larvas L<sub>1</sub>, mediante una solución digestora del músculo esquelético de una rata infectada experimentalmente, se suspendieron en 4.0 mL de tris hidroximetil aminometano (tris-base) (Bio Rad; California, EE.UU.) 10 mM pH 8.0, que contenía 200 mg de L-1-tosilamida 2-feniletíl clorometil cetona (TPCK) (Sigma; St. Louis, EE.UU.), 200 mg de N- $\alpha$ -p-tosil-lisina clorometil cetona (TLCK) (Sigma) y 40  $\mu$ L de fenilmetil sulfonil fluoruro (PMSF; Lakeside) 100 mM.

Las larvas se homogeneizaron con un triturador de tejidos manual en frío durante 15 min, se agregaron 960  $\mu$ L de desoxicolato de sodio (Gibco) 10% en tris-base 10 mM pH 8.0 y se homogeneizó durante 15 min más. Se dejó reposar en frío durante 20 min y finalmente se centrifugó a 15,000 xg a 4<sup>o</sup>C durante 30 min. Se tomó el sobrenadante y se cuantificó la concentración de proteínas mediante el método colorimétrico de Bradford. Finalmente el antígeno se dividió en alícuotas y se almacenó a -20<sup>o</sup>C y luego a -70<sup>o</sup>C hasta su uso (Alcántara et al., 1989).

### 5.3. Preparación de anticuerpos específicos contra el antígeno EC.

Para obtener los anticuerpos contra el antígeno EC de *T. spiralis*, se inmunizó a un conejo Nueva Zelanda de cuatro meses de edad, con antígeno EC. La primera inmunización consistió en 1 mg de antígeno diluido 1:2 en adyuvante completo de Freund (Difco), La mezcla se administró por vía subcutánea en varios puntos del lomo. La segunda inmunización se aplicó subcutáneamente una semana después y consistió en 1 mg de antígeno diluido 1:2 en adyuvante incompleto (Difco). La tercera y la cuarta inmunizaciones, se efectuaron en las dos semanas siguientes y se administraron 500  $\mu$ g de antígeno sin adyuvante vía intramuscular en el muslo.

Se tomaron muestras de sangre semanalmente durante todo el periodo de inmunización. Para separar el suero se dejó coagular durante 30 min a 37<sup>o</sup>C y se centrifugó a 1,400 xg durante 10 min. El suero se separó con pipeta, se repartió en

viales de 500  $\mu$ l, se alicuotaron y se almacenaron en congelación hasta su uso para determinar la presencia de anticuerpos por ELISA. El criterio que se siguió para sangrar a blanco se apoyó en una absorbancia mayor a dos Unidades de densidad óptica después de la cuarta inmunización, utilizando el suero a una dilución de 1:2000.

Los anticuerpos se purificaron a partir del suero hiperinmune mediante una columna de proteína A-sefarosa de 5 mL, la cual se incubó con 5 mL de suero por toda la noche a 4<sup>o</sup>C. Al día siguiente se eluyeron las proteínas no pegadas con PBS pH 7.2. después se agregó glicina 0.1 M pH 2.5. La fracción de IgG obtenida se dializó contra PBS pH 7.2 toda una noche para eliminar el exceso de glicina. El dializado se separó en proporciones pequeñas y se almacenó a -20<sup>o</sup>C y luego a -70<sup>o</sup>C hasta su uso. La pureza de las proteínas se corroboró por electroforesis en gel de poliacrilamida -SDS al 12% y la actividad de anticuerpo por ELISA.

#### 5.4 Infección experimental

Se utilizaron 16 ratas Wistar de 3 semanas de edad: 8 hembras de 160-190 g de peso y 8 machos de 180-210 g de peso. Previo a la infección experimental, a cada animal se le administró mebendazol con una dosis de 1 mL por cada kilogramo de peso cada semana, durante dos semanas. Al término del tratamiento se les tomó una muestra de 2 mL de sangre por punción cardiaca para corroborar la ausencia de anticuerpos contra la larva infectiva (L<sub>1</sub>) de *Trichinella spiralis*

Se infectaron 6 machos y 6 hembras con 5,000 L<sub>1</sub> por vía oral, 1 rata de cada género no se infectaron. Los animales se distribuyeron en seis cajas de 4.30 x 3.20 x 0.95 m de altura y permanecieron en el vivario con agua y alimento estériles durante 68 días. La distribución se hizo de la siguiente manera: las seis ratas hembras infectadas se distribuyeron en dos cajas quedando tres en cada caja, mientras que una rata hembra no infectada queda sola en una caja; lo mismo se realizó con las ratas machos.

#### 5.5. Muestra de suero.

Cada animal se anestesió con vapores de cloroformo y luego se puncionó por vía cardiaca con una aguja de insulina (27 x 13 mm), y se le tomaron 2 mL de sangre cada tercer día. Para realizar la toma de muestra de manera sistemática, los animales se dividieron en dos grupos A y B, la primera semana se tomaron muestras a los animales del grupo A los días lunes, miércoles y viernes, la segunda semana se tomaron muestras al grupo de animales B los días martes y jueves. Cada dos semanas se invirtió el orden de los días de toma de muestra de los grupos A y B. A todas las ratas se sangraron durante 10 semanas

## 5.6. Tratamiento de la muestra.

La muestra de sangre se dejó coagular a 37°C durante 15 minutos. Se desprendió el coagulo de las paredes del tubo con un aplicador de madera y posteriormente se centrifugó a 5,000 xg. durante 5 minutos. El suero se separó del paquete celular, dividiéndolo en dos porciones: una para determinar la presencia de anticuerpos y la otra para determinar antígenos. Ambas fracciones de suero se rotularon con la identificación del animal y día de sangrado, las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

## 5.7 Digestión enzimática del músculo esquelético

A las diez semanas post-infección las ratas se eutanizaron con cloroformo y se disectaron; las vísceras, la piel, la cabeza y la cola se cremaron. Para determinar la carga parasitaria de diferentes tejidos, órganos y estructuras, se tomaron muestras de peso variable de aproximadamente 1g de corazón, diafragma, lengua, pierna, parrilla intercostal e intestino delgado, así como, el resto de la carne de cada rata . Las muestras individualizadas de esta manera, se lavaron exhaustivamente con agua corriente para eliminar al máximo los residuos de sangre y pelo. También de forma individual, todas las muestras se fragmentaron en porciones de aproximadamente 0.3 cm<sup>3</sup> para su digestión.

Se preparó una solución digestora constituida de pepsina y HCl ambos al 1%, en la cual se depositó la carne. La digestión enzimática se llevó a cabo a 37°C con agitación continua durante tres horas. La suspensión se vertió en copas de sedimentación y se dejó en reposo una hora a temperatura ambiente, las larvas L<sub>1</sub> se recuperaron del sedimento; luego, se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M con NaCl 0.015 M pH 7.20 (PBS); el sobrenadante de lavado se eliminó mediante centrifugación a 5,000 xg durante dos minutos. Para eliminar los residuos de tejido, las larvas se sometieron a un gradiente de dextrosa al 80, 40 y 20%; dejándose en reposo durante 1 h a temperatura ambiente, las larvas se recuperaron de la interface 20-40% y el exceso de dextrosa se eliminó, lavándolas como se describió anteriormente (Knapen *et al.*, 1980).

Para determinar el número de larvas recuperadas, se consideró un volumen de 10 mL con PBS; de ésta solución se tomó 100 µL y se llevaron a 1.0 mL; de esta nueva suspensión se tomaron 3 fracciones de 10 µL para contar el número de larvas en un microscopio estereoscópico invertido con el objetivo de 20x y obtener un número promedio de larvas. Con este número promedio de larvas, se calculó el número de larvas que se encuentran en los 10 mL iniciales.

## 5.8. Detección de anticuerpos por el ELISA

El método empleado para detectar la presencia de anticuerpos se realizó de acuerdo al descrito por Alcántara *et al.* (1989) para el inmunodiagnóstico de triquinelosis humana con modificaciones para analizar sueros de ratas. Se utilizaron placas de poliestireno para microtitulación (Costar; Cambridge MA, EE.UU.). Las placas se lavaron tres veces durante cinco minutos en cada ocasión con agua destilada; luego, el agua se vertió en una tarja y el excedente se secó con una gasa. Las placas se sensibilizaron con 100  $\mu$ L/pozo de una solución del EC de la larva infectiva de *T. spiralis* a una concentración de 5  $\mu$ g/mL en carbonatos 0.1 M pH 9.6 (Alcántara *et al.*, 1993). La placa se incubó durante toda una noche a 4°C.

Al día siguiente el contenido de la placa se vertió en una tarja y se lavó tres veces durante 5 minutos en cada ocasión con 200  $\mu$ L de una solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH 7.20 con tween 20 (Sigma) al 0.5% (PBS-Tween). Después de cada incubación se repitió este procedimiento.

Las placas se bloquearon con 200  $\mu$ L/pozo de una solución de albúmina sérica bovina (Sigma) al 1% en PBS-Tween y se incubó a 37°C durante 30 minutos.

Las muestras de los sueros se diluyeron 1:2,000 en PBS-Tween y se colocaron 100  $\mu$ L/pozo de esta solución; se incubó a 37°C durante dos horas. Posteriormente, se lavó con PBS-Tween y, a cada pozo se incubó con 100  $\mu$ L de

una solución de anticuerpos de chivo contra IgG de rata marcados con peroxidasa (Sigma), diluidos 1:1,000 en PBS-Tween; se incubó a 37<sup>0</sup>C durante dos horas.

La reacción se puso en evidencia con 100  $\mu$ L/pozo de una solución de sustrato preparada con una solución amortiguadora de citratos al 0.1 M pH 5.0, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1.2% y o-fenilendiamina, 5.0 mg (Sigma) y se dejó incubar a temperatura ambiente en obscuridad durante 10 minutos. La reacción se detuvo con 100  $\mu$ L /pozo de una solución 1 N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La lectura se realizó en un lector para microplacas (Bio-Rad) a 490 nm (Alcántara *et al.*, 1989).

#### 5.9. Detección de antígenos en suero.

Para detectar antigenemia durante el curso de la parasitosis, las muestras de suero de las ratas, se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras de acuerdo a la técnica descrita por Wiegger, *et al.*,(1991). Cada una de las muestras de suero se tomó un volumen equivalente a 60  $\mu$ g de proteína sérica, adicionándole a cada suero un volumen igual de una solución digestora para obtener una solución 1:2; después se sometieron a ebullición durante cinco minutos a baño maría. La solución digestora se preparó con 1 mL de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%, 7.4 mg de ácido etilendinitrilotetracético, 1 mL de glicerina, 250 mL de una solución de tris hidroximetil aminometano hidroclohídrico (tris-HCl) 2 M pH 6.8, 5 miligramos de

azul de bromofenol y agua destilada para completar 10 mL. Cada mililitro de la solución digestora se mezcló con 100  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol (Bio Rad).

La electroforesis se llevó a cabo con un sistema discontinuo de geles: uno inferior donde se separaron las proteínas y otro concentrador. En los cuadros 4 y 5 se enlistan las soluciones que se emplearon para preparar cada gel.

Cuadro 3. Volúmenes y soluciones para preparar el gel separador y concentrador de poliacrilamida (Wiegger *et al.*, 1991).

<b>GEL SEPARADOR</b>	
solución	volumen (mL)
acrilamida 30%-n,n'-metileno-bis-acrilamida 0.8%	11.00
tris hidroximetil aminometano 2 M pH 8.8	6.00
SDS al 10%	0.30
agua destilada	11.75
persulfato de amonio (10 mg/mL)	0.50
n,n,n'-tretametilendiamina	0.030
<b>GEL CONCENTRADOR</b>	
Solución	
acrilamida 30% - bis 0.8%	3.50
tris hidroximetil aminometano hidroclorehidrico 2M pH 6.8	0.65
SDS al 10%	0.10
agua destilada	11.50
persulfato de amonio (10 mg/mL)	0.20
n,n,n'-tretametilendiamina	0.010

Diez mililitros de la mezcla para preparar el gel separador se vertieron entre dos cristales de 7.3 x 10.2 cm usando separadores de 1.5 mm de espesor, evitando la formación de burbujas. Después de que el gel polimerizó, el exceso de solución no polimerizada se eliminó con papel filtro y se colocó un peine de plástico de 15 carriles. Posteriormente, la mezcla preparada del gel concentrador se colocó sobre el peine procurando evitar la formación de burbujas. Después de la polimerización se quitó el peine y se eliminó el exceso de solución no polimerizada, dejando secos los carriles para colocar las muestras, las cuales se distribuyeron de la siguiente manera: el primero para el marcador de pesos moleculares preteñidos (Bio-Rad), los tres últimos carriles fueron para los testigos: positivo, negativo y de antígeno; el testigo positivo del ensayo se preparó de la siguiente manera: 80 µg de suero de rata normal más 60 µg de antígeno EC de *Trichinella spiralis*; el testigo negativo se preparó con 80 µg de suero de rata normal; el último carril se utilizó para el antígeno de EC, empleando 60 µg de éste; el resto de los carriles se utilizaron para colocar las muestras de la cinética de los sueros de ratas infectadas experimentalmente.

La electroforesis se efectuó en refrigeración en una cámara para electroforesis Mini-Protean II (Bio-Rad), en presencia de una solución de corrida (tris hidroximetil aminometano, 3.6 g; glicina, 27.6 g; SDS 10%, 12 mL; agua destilada, 1,500 mL), aplicando una corriente de 150 volts durante dos horas.

Después de la electroforesis, la transferencia se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por Towbin *et al.* (1979). El gel se colocó en un recipiente con el amortiguador de transferencia (tris hidroximetil aminometano, 3.08 g;

glicina, 14.48 g; metanol, 200 mL; agua destilada, 800 mL) durante 15 minutos. En el mismo recipiente se colocó el papel de nitrocelulosa (NC) de 0.45 mm de poro (Schleicher and Schuell; Keene, NH, EE.UU.) y aditamentos de la cámara de transferencia (Sigma). La transferencia se llevó a cabo con una corriente de 400 mA, durante 70 min. a 4°C.

Después de la transferencia, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau (Sigma) al 0.2% en ácido tricloroacético 0.3% (Merck; México) para observar si la transferencia de las proteínas fue adecuada; se lavó con agua destilada para eliminar el colorante y se bloqueó con leche descremada (Sveltes-Nestle; México) al 5% en PBS-Tween por toda una noche a 4°C. Al día siguiente la membrana se dejó en agitación continua durante 30 minutos, luego se lavó tres veces con PBS-Tween y dos veces con PBS durante cinco minutos en cada ocasión, repitiendo esta operación después de cada paso. A continuación se colocó suero de conejo hiperinmune contra un extracto soluble de la larva de *Trichinella*, previamente diluido 1: 1,000 en PBS-Tween; se incubó durante dos horas a temperatura ambiente y en agitación continua. Luego se adicionaron anticuerpos de chivo contra IgG de conejo marcados con peroxidasa (Sigma) diluidos en PBS-Tween 1:1,000 durante dos horas a temperatura ambiente y en agitación continua. La reacción se reveló utilizando una solución de sustrato que contenía 10 mL metanol al 30%, 5 mg de 4-cloro-1-naftol y 5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% y 50 mL de PBS 1x. La reacción se detuvo con agua destilada.

Los resultados fueron analizados por el método estadístico de *t*-student, para poder determinar si existe diferencia de los resultados entre hembras y machos; con una  $p < 0.05$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1. Determinación de antígenos circulantes

Para determinar la sensibilidad del IET para detectar antígenos en suero, se mezclaron diferentes concentraciones del EC con sueros hiperinmunes de ratas contra *T. spiralis* y las mezclas se analizaron por IET. En la figura 4 se observa que la mínima cantidad de antígeno que se puede detectar es de 1 µg/carril.

La reacción en el sistema de captura de antígeno quedó puesta en evidencia por los testigos positivo, negativo y de antígeno, como se observa en las figuras 5 a la 7. Las bandas correspondientes a los pesos moleculares de 38, 44, 45, 66, 68, 70, 77 y 104 kDa, son las bandas que aparecen tanto en el testigo positivo como en el de antígeno. Sin embargo, en la cinética, de las muestras de sueros de las ratas infectadas, no se logró detectar antígenos en ninguna de ellas. En la figura 6, M-4, se puede observar que las muestras de suero de una rata macho presentan un par de bandas de 43 y 45 kDa, desde el inicio de la pre-infección, lo cual podría ser indicativo de bandas inespecíficas.

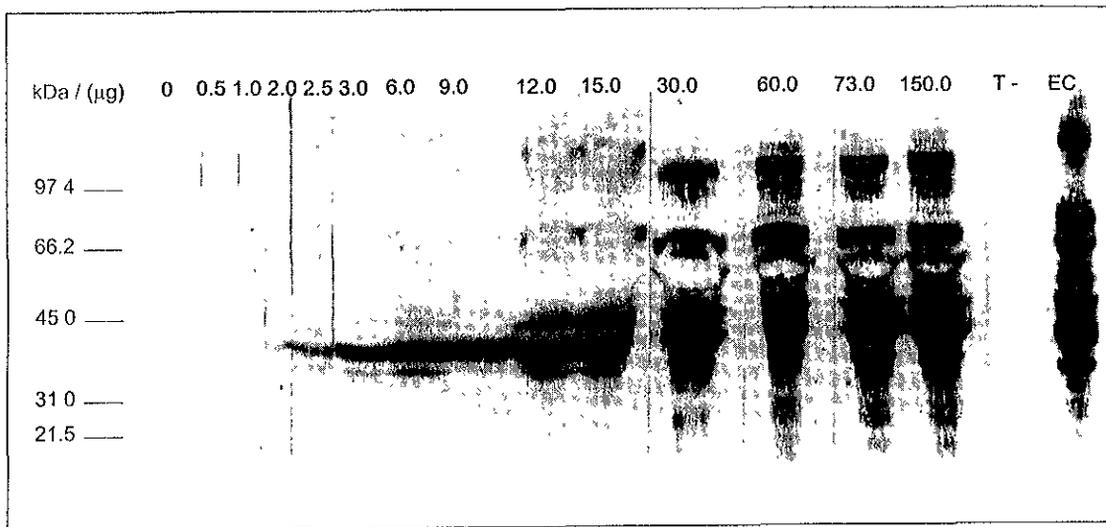


Figura 4. **Determinación de antígenos de la larva infectiva por IET.** Se muestra la curva de calibración. Se disolvieron diferentes cantidades de antígeno (1 a 150 µg) en un suero de rata hiperinmune contra la larva L<sub>1</sub>. El testigo negativo (T-) fue un suero de rata normal; y otro testigo con únicamente antígeno (EC). La reacción se reveló con anticuerpos policlonales de conejo anti-EC.

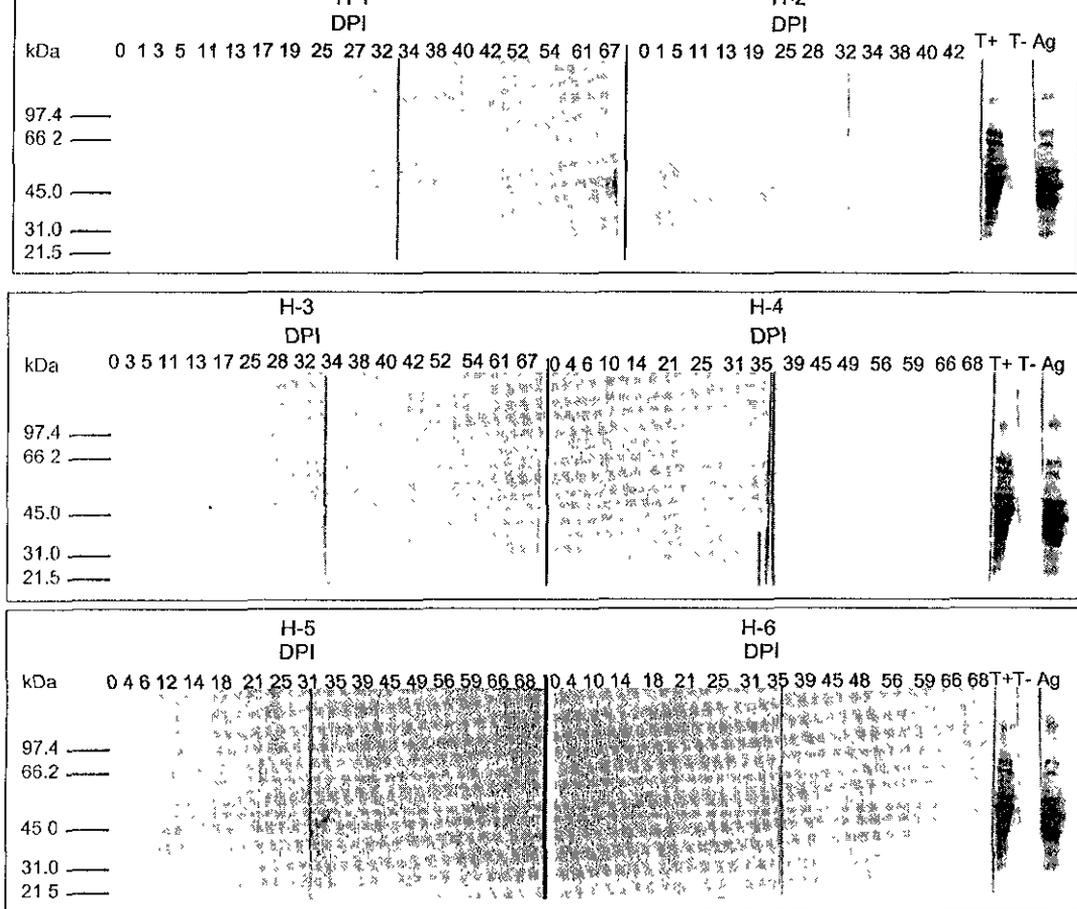


Figura 5. **Determinación de antígenos de la larva infectiva L<sub>1</sub> de *Trichinella spiralis* en sueros de ratas hembras (H).** En cada panel se muestra la cinética de captura de antígenos de la larva L<sub>1</sub> de *T. spiralis*, en sueros de ratas infectadas experimentalmente con el nemátodo. Mediante la técnica de IET se analizaron cada uno de los sueros obtenidos en los diferentes días post-infección (dpi) mostrados en cada carril de cada una de las ratas. A la izquierda se muestra el marcador de pesos moleculares en kDa y a la derecha tres carriles que contienen el testigo positivo (T+) el cual contiene suero de rata normal adicionado con antígeno, el testigo negativo (T-) el cual contiene únicamente suero de rata normal y el Ag: antígeno colocado directamente en el carril.

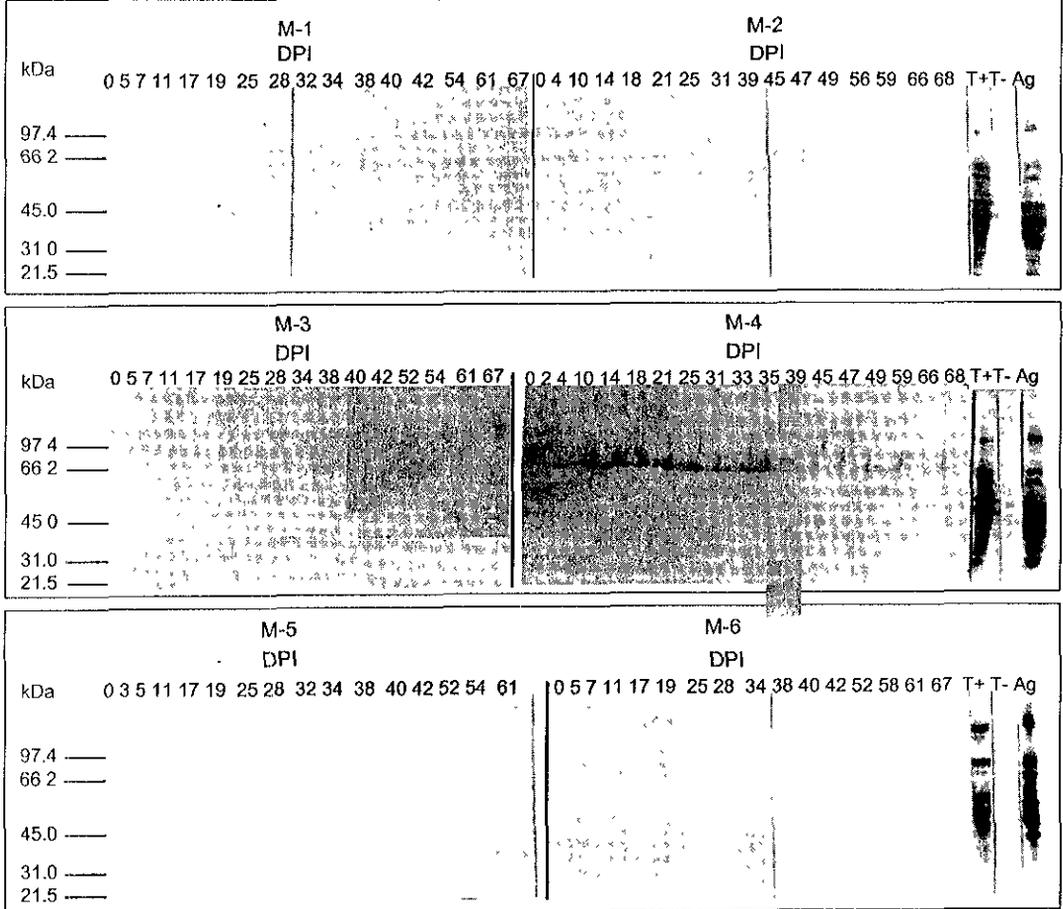


Figura 6. Determinación de antígenos de la larva infectiva L<sub>1</sub> de *Trichinella spiralis* en sueros de ratas machos (M). En cada panel se muestra la cinética de captura de antígenos de la larva L<sub>1</sub> de *T. spiralis*, en sueros de ratas infectadas experimentalmente con el nemátodo. Mediante la técnica de IET se analizaron cada uno de los sueros obtenidos en los diferentes días post-infección (dpi) mostrados en cada carril de cada una de las ratas. A la izquierda se muestra el marcador de pesos moleculares en kDa y a la derecha tres carriles que contienen el testigo positivo (T+) el cual contiene suero de rata normal adicionado con antígeno, el testigo negativo (T-) el cual contiene únicamente suero de rata normal y el Ag: antígeno colocado directamente en el carril.

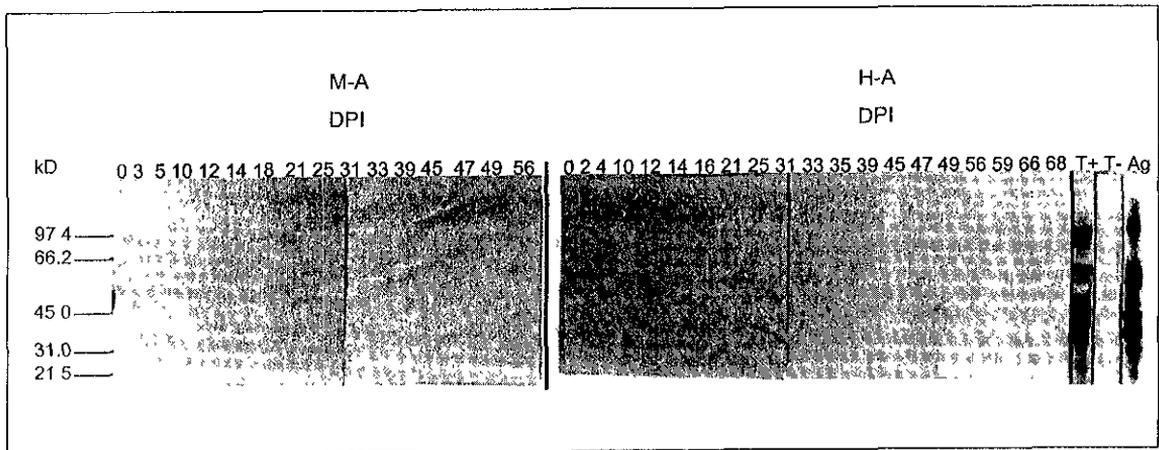


Figura 7. **Determinación de antígenos de la larva infectiva L<sub>1</sub> de *Trichinella spiralis* en ratas no infectadas.** En cada panel están las muestras de una rata macho y una hembra (M-A y H-A respectivamente) A la izquierda se muestra el marcador de pesos moleculares en kDa y a la derecha tres carriles que contienen los testigos. T+ representa al testigo positivo el cual contiene suero de rata normal más antígeno de EC; el T- representa al testigo negativo el cual contiene únicamente suero de rata normal y Ag, que es en el carril en el cual contiene antígeno de EC.

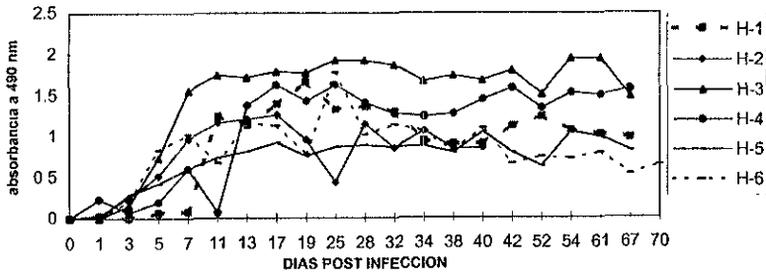
## 6.2 Cinética de la aparición de anticuerpos

Se realizó una cinética para detectar la aparición de anticuerpos contra la larva muscular mediante (ELISA), empleando como antígeno EC. Se observó que la respuesta humoral se detecta desde los cinco días post-infección en el 50% de los machos, y en el 67% de las hembras. A los 10 días post-infección se detectaron anticuerpos en todos los animales infectados experimentalmente.

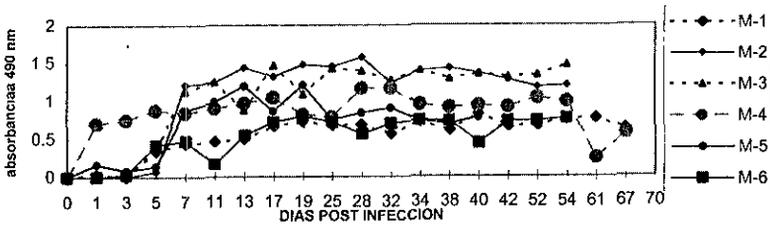
En la figura 8 se observa que todas las ratas infectadas, tanto hembras como machos, mantienen constantes los valores de absorbancia desde los 15 días post-infección, aunque se detectó una diferencia de aproximadamente 0.50 unidades de absorbancia entre hembras y machos, la cual se mantuvo constante. En promedio, el intervalo máximo de absorbancia en hembras fue entre los días 20 y 25, mientras que en los machos fue entre los días 25 y 30. Tomando como referencia el día 25 post-infección en ambos géneros, no se observaron diferencias significativas en la absorbancia con respecto al género ( $p > 0.05$ ).

Una rata macho (M-4) presentó una respuesta inmediata (figura 8 panel B), ya que desde el primer día se detectó un aumento en los niveles de absorbancia. Esta misma rata presentó antígenos por IET.

A



B



C

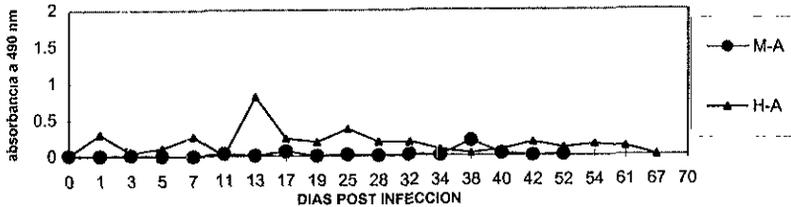


Figura 8. Cinética de aparición de anticuerpos contra la larva muscular de *Trichinella spiralis* por ELISA. En la gráfica se presentan los valores de absorbancia obtenidos de las muestras de suero de ratas infectadas con 5000 L<sub>1</sub> en función de los días de infección. En los paneles A y B se muestran a las ratas infectadas y en el panel C a las ratas no infectadas. Las letras H y M representan a las hembras y a los machos, respectivamente.

### 6.3. Determinación de la carga parasitaria

En la figura 9 y 10 se muestra la densidad de larvas medida en animales infectados experimentalmente, de acuerdo al órgano o tejido analizado. La pierna fue el músculo del cual se recuperó la mayor densidad de larvas, tanto en hembras como en machos con 3,086 y 3,143 L<sub>1</sub>/g respectivamente; seguido del diafragma y parrilla intercostal con 2,135 y 858 L<sub>1</sub>/g respectivamente en hembras 1,254 y 1005 L<sub>1</sub>/g en machos. Los músculos en los cuales se encontraron menor cantidad de larvas fueron la lengua y el corazón, en hembras correspondió a 395 y 16 L<sub>1</sub>/g y en machos del 445 y 9 L<sub>1</sub>/g respectivamente. No se recuperaron larvas del intestino delgado de las hembras ni de los machos.

Los tejidos que no presentaron diferencia significativa con respecto al género, fueron el músculo de la parrilla intercostal y la lengua; y los tejidos que sí presentaron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al género fueron el diafragma y la pierna. Debido a que los datos del corazón quedaron muy dispersos, tanto en hembras como en machos no se pudo determinar si existía alguna diferencia estadística con respecto al género. Cabe hacer notar, que los tejidos musculares donde se presentó diferencia significativa, se encontró una mayor densidad en las hembras.

En la figura 10 se muestra la densidad de larvas infectivas recuperadas de manera global. No hubo diferencia significativa entre hembras y machos ( $p > 0.05$ ). Sin embargo con excepción de un caso (hembra No. 6), los machos tuvieron una carga parasitaria más alta que las hembras.

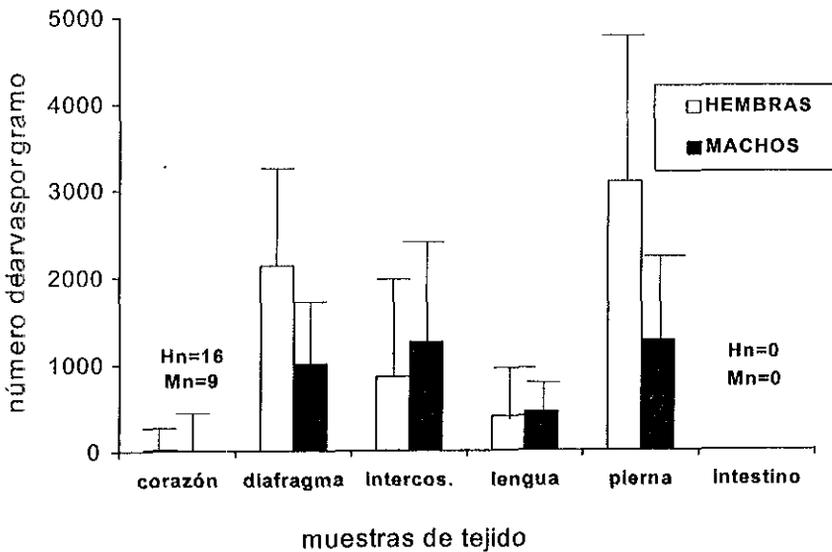


Figura 9. Densidad de larvas  $L_1$  recuperadas de diferentes muestras de tejidos musculares en hembras y machos con su respectiva desviación estándar. La anotación Hn y Mn corresponde al grupo de hembras y machos respectivamente, el número que se indica a la derecha de la anotación indica el número de larvas por gramo.

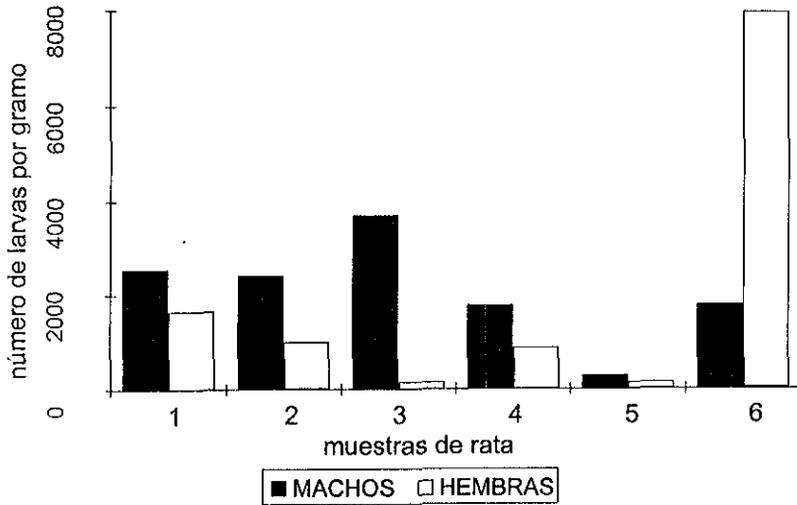


Figura 10. Densidad de larvas L<sub>1</sub> recuperadas en el resto del músculo de cada una de las ratas. Los números del 1 al 6 representan el par de ratas M-1 y H-1 al M-6 y H-6.

## 7 DISCUSION

La variedad de signos y síntomas que se presentan pueden dificultar el diagnóstico clínico de la triquinelosis. La carga parasitaria que alberga el hospedero induce desde una enfermedad subclínica, hasta una enfermedad grave en cualquiera de las dos fases de la infección: la entérica y la parenteral, lo que provoca síndromes y síntomas muy distintos entre sí. Por estas razones, el diagnóstico clínico, o simplemente la sospecha clínica de triquinelosis, debe ser confirmada por otros métodos. Por esto se han implementado diferentes procedimientos de diagnóstico, tanto parasitológico como serológico. Los primeros incluyen la triquinoscopía y la digestión enzimática, que muestran de manera directa al parásito, pero ambos tienen muy baja sensibilidad diagnóstica; mientras que los segundos son ensayos que detectan anticuerpos específicos. Sin embargo, la positividad de las muestras no indican si la parasitosis se encuentra en una etapa activa o es el reflejo del contacto con el hospedero tuvo con el helminto. Por consiguiente, y con base en el tiempo prolongado en el que el parásito está en contacto directo con el tejido del hospedero, es razonable pensar que los antígenos del nemátodo puedan encontrarse en la circulación sanguínea y que esto indicaría su presencia de una manera directa, lo que haría que este tipo de diagnóstico serológico fuera más confiable que la detección de anticuerpos.

En el presente trabajo se trató de identificar la presencia de antígenos circulantes para establecer una técnica alternativa en el diagnóstico definitivo, así como determinar cuales antígenos se podrían identificar en el suero, además de

determinar el tiempo en el que se pueden detectar después de iniciada la infección y si los antígenos detectados permanecen o cambian durante el curso de la infección.

En la determinación de antígenos circulantes se han establecido diferentes técnicas inmunoenzimáticas. Se ha observado que la sensibilidad diagnóstica de los ensayos varía entre 25 y 56%. (Arriaga *et al.*, 1995; De la Rosa *et al.*, 1997; Ivanoska *et al.*, 1989). Tal es el estudio desarrollado por Arriaga y colaboradores (1995) en el que se empleó el ELISA, utilizando como elementos de captura anticuerpos de conejo contra componentes de superficie/esticosoma de la L<sub>1</sub> y anticuerpos monoclonales contra antígenos TsL-1 para poner en evidencia la reacción antígeno-anticuerpo. Se detectó antigenemia en el 54% de porcinos infectados experimentalmente entre la tercera y cuarta semana después de la infección. La posibilidad de que los antígenos en el suero de las ratas experimentalmente infectadas que se estudian en este trabajo se encuentren formando complejos inmunes, es la razón por la que se decidió utilizar la IET como elemento de análisis. De hecho el procesamiento de la muestra antes de la electroforesis, favorece la disociación de los complejos inmunes. Por lo que se sugiere que las condiciones experimentales usadas no fueron ideales, ya que la IET sólo fue capaz de detectar 1 µg de antígeno, mientras que otras técnicas como el Dot-blot, detectan desde 3 ng (Tadeusz *et al.*, 1994). Los autores manifiestan que se puede detectar antígeno en muestras de suero de ratas infectadas experimentalmente a partir del cuarto día post-infección; sin embargo,

en muestras de la infección natural en seres humanos, solamente se detectó antígeno circulante en el 45% de los casos.

Además de estos ensayos, se han utilizado otras técnicas para determinar antigenemia, como el inmunoensayo estimulado por quimioluminiscencia (ECIA), el ensayo inmunoenzimático de fluorescencia (ELFA) y el fluoroinmunoensayo de disociación estimulada por lantano (DELFA). Datos preliminares utilizando DELFA en suero de ratones infectados experimentalmente, indican que la técnica detecta entre 1 y 1000 ng/mL de antígeno a los 7 días post-infección (Ko, 1995). Estas observaciones podrían indicar que los antígenos se encuentran en concentraciones muy bajas en el suero, por lo que no pueden ser detectados por otras técnicas actualmente disponibles como en nuestro caso el IET.

Sin embargo, la detección de antígenos circulantes de la larva no debería presentar ningún problema, debido a que la célula nodriza se encuentra rodeada de un plexo de vénulas, lo que permitiría el paso de sustancias del exterior hacia el interior de la célula nodriza y en sentido contrario (Baruch y Despommier, 1991). Aunque existe la posibilidad que los antígenos liberados no lleguen a la circulación, debido a que son necesarios para mantener la funcionalidad de la célula nodriza (Despommier, 1990; Ko, *et al* 1995).

En el presente trabajo, se analizó una cinética de aparición de anticuerpos en el suero de ratas infectadas experimentalmente, con el objetivo de relacionarlo con la cinética de captura de antígenos, así como, determinar si existe una relación entre la densidad de larvas encontradas en el tejido muscular y la absorbancia obtenida en el ELISA para la detección de anticuerpos, y además

determinar si existen diferencias en la intensidad de las absorbancias entre hembras y machos.

Se logró detectar anticuerpos de la clase IgG, contra antígeno EC de *T. spiralis*, a partir de la segunda semana post-infección, y ambos géneros presentaron la misma respuesta, pudiéndose observar que no existen diferencias entre hembras y machos. Estos resultados concuerdan con los reportados previamente (Alizadeh, 1982; Martin *et al.*, 1992; Ivanoska, *et al.*, 1989). En el ciclo de vida de *Trichinella*, el tiempo de la aparición de anticuerpos contra antígenos somáticos de la larva L<sub>1</sub> corresponde al establecimiento de las hembras grávidas en la mucosa intestinal y a la liberación de las LRN, lo que indica que esos antígenos son procesados por los elementos participantes de la respuesta inmune.

Los anticuerpos posiblemente están dirigidos contra los antígenos de superficie de la larva L<sub>1</sub>, descritos previamente por varios autores (Appleton, *et al.*, 1991; Denkers, *et al.*, 1990; McLaren, *et al.*, 1987; Ortega-Pierres, *et al.*, 1984; Parkhouse, *et al.*, 1981). No obstante que el antígeno utilizado es un extracto total, existe la posibilidad que también reconozca el sistema inmune de la rata estructuras internas de la larva L<sub>1</sub>, presentándose la positividad a la segunda semana de infección (Takahashi *et al.*, 1990a; 1990b).

No obstante que la rata M-4 (véase las figuras 6 y 8) presentó un antígeno de aproximadamente 40 kDa, es posible que sea inespecífico debido a una reacción cruzada, identificada ya sea por el antígeno utilizado para revelar el IET o por anticuerpos propios de la rata experimental, debido a que la rata presentó una respuesta desde un día antes de la infección. Por lo anterior, podemos concluir

que las bandas presentadas en el IET no corresponderían a los antígenos libres de *T. spiralis* o del resultado de la ruptura de los complejos inmunes, en el suero de la rata M-4.

En lo que respecta a la carga parasitaria, se pudo observar que la pierna es el tejido muscular por el que larva infectiva de *T. spiralis* tiene mayor predilección, mientras que en el músculo liso, (el intestino delgado), no se encontraron larvas comprobando que *Trichinella* no tiene predilección por este tipo de tejidos para establecerse y el intestino delgado únicamente es utilizado durante la reproducción. Del corazón, que no es un órgano del músculo estriado, fue posible aislar larvas L<sub>1</sub> lo cual podría explicar que algunos pacientes con triquinelosis tengan problemas cardíacos (Stevens, *et al.*, 1993).

La distribución de las larvas en los diversos tejidos musculares de la rata, difiere de lo expuesto por otros autores quienes han registrado que en otros animales como el caballo, los músculos con mayor densidad parasitaria son la lengua y el diafragma, mientras que en el zorro, el diafragma y en algunos los maseteros, son los músculos con mayor carga parasitaria. Por lo tanto, dependiendo de la especie que se infecte será el tejido muscular donde se encuentre una mayor densidad de larvas (Nockel y Vorgt, 1996; Ionescu, 1996; Kapel, *et al.*, 1996).

De todos los tejidos analizados, solamente dos presentaron mayor susceptibilidad con respecto al género, la lengua y los músculos intercostales. Sin embargo, con los resultados expuestos no se puede determinar que exista susceptibilidad de género debido a que los demás tejidos no presentaron ninguna

diferencia. Se puede concluir que no existe diferencia entre hembras y machos. Estos resultados concuerdan con los observados en otros estudios en los cuales se infectaron zorros de manera experimental y no se encontró diferencia de carga parasitaria entre hembras y machos (Nockel y Vorgt, 1996). Sin embargo, los estudios de Martínez-Marañón realizados en cadáveres humanos en 1974, mostraron una mayor prevalencia de larvas infectivas en los cadáveres femeninos que en los masculinos lo que sugirió que el género femenino era más susceptible que el hombre. También se ha observado mayor prevalencia de anticuerpos en las mujeres (De la Rosa, *et al.*, 1998). Sin embargo, existe la posibilidad que las mujeres se infecten al probar los alimentos, en el momento de prepararlos; principalmente en las comunidades rurales donde la mujer es la encargada de prepararlos (Quiroz y Landeros, 1988).

Finalmente, se pudo observar que la carga parasitaria encontrada en el tejido muscular de las ratas es independiente a la producción de anticuerpos, esto es, que las ratas de las cuales se recuperaron más larvas, dieron una respuesta inmunológica similar a las ratas de las que se obtuvieron menos larvas. Cabe resaltar que la rata H-5 fue la que se obtuvo mayor cantidad de larvas que las demás, lo que sugiere que es importante la susceptibilidad individual de cada animal para albergar una mayor o menor número de larvas y esto no influye en la producción de anticuerpos.

La captura de antígenos circulantes de *T. spiralis* es primordial para la confirmación de una parasitosis activa en el diagnóstico, así como, para evaluar tratamiento y en estudios epidemiológicos, definir áreas con riesgo parasitario por

lo que deberán desarrollarse métodos más sensibles que puedan detectar cantidades pequeñas de estas moléculas para lograr este fin.

Por otro lado, estudiar con más profundidad la función bioquímica de las moléculas secretadas por la larva L<sub>1</sub> de *T. spiralis*, en la relación hospedero-parásito que se presenta con la célula nodriza como una forma de sobrevivencia del parásito. También es necesario abundar los estudios para determinar la susceptibilidad por género ya que en el modelo experimental utilizado no se presentó susceptibilidad por género; por lo que será necesario realizar los mismos experimentos pero con un mayor número de animales los cuales deberán ser de la misma edad, así como, en diferentes modelos de animales de experimentación para poder concluir si existe susceptibilidad por género; ya que, en el humano no se sabe si la susceptibilidad, reportada, es debida a condiciones biológicas o por costumbres sociales Así como, determinar si la preferencia para invadir tejidos u órganos musculares esta dada en función a una distribución al azar o a la actividad bioquímica del músculo invadido, dependiendo de la especie del hospedador infectado.

## 8 CONCLUSIONES

Bajo nuestras condiciones experimentales, con el IET, no se pudo demostrar la presencia de antígenos circulantes en los sueros de las ratas infectadas experimentalmente.

A partir de la segunda semana post-infección se detectaron anticuerpos específicos contra el antígeno EC de *T spiralis*.

De los diferentes músculos analizados, el músculo que presentó mayor carga parasitaria fue la pierna, tanto en hembras como en machos.

No se encontró diferencia entre géneros con respecto a la carga parasitaria. No se mostró diferencia entre la carga parasitaria recuperada y la producción de anticuerpos.

## 9 BIBLIOGRAFIA

- ALCANTARA P, CORREA D. 1993. Human humoral immune responses against *Trichinella spiralis*. Int. J. Parasitol. 23; 657-669.
- ALCANTARA P, DE LA ROSA AJL, CORREA D. 1992. Triquinelosis: una parasitosis fuera de serie. Publicaciones Técnica del INDRE # 16 SSa.
- ALCANTARA P, GORODEZKY C, CORREA D, MARTINEZ-MARAÑÓN R, MAGOS C, OLIVO A. 1989. Diagnosis of human trichinosis by the enzyme- linked immunosorbent assay. Rev. Lat-Amer. Microbiol. 30:227-230
- ALIZADEH H, WAKELIN D. 1982. Comparison of rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in mice and rats. Int. J. Parasitol 12:65-70.
- ALMOND M, PARKHOUSE REM, CHAPA R, GARCIA E. 1986. The response of humans to surface and secreted antigens of *Trichinella spiralis*. Trop Med. Parasit. 37:381-384.
- APPLETON JA, BELL RG, HOMAN W, VAN KNAPEN F. 1991. Consensus on *Trichinella spiralis* antigens and antibodies. Parasitology today. 7:190-192.
- ARAKAWA AL, TODD AC. 1971. Comparative development of temperate zone and arctic isolate of *Trichinella spiralis* in the white mouse. J. Parasitol. 57:526-530.

- ARRIAGA C, MORRILLA A, ORTEGA-PIERRES G. 1992 Nuevos métodos para el diagnóstico de la triquinosis porcina. *Asoc. Mex. Vet. Esp cerdos* (ed) *Avances Prod. Porcina*, 1:319-322.
- ARRIAGA C, YEPEZ ML, MORRILLA A, ORTEGA-PIERRES G. 1994, Detection of circulating *Trichinella spiralis* muscle larval antigens in serum samples of experimentally and naturally infected swine. *Proceedings of the Eighth. International Conference on Trichinellosis*. CAMPBELL W. POZIO E. BRUSCHI F. (Ed). Italy. pp.301-306
- ARRIAGA C, YEPEZ ML, VIVEROS N, ADAMEAL, DANTE ZS, LINCHTENFEIS RJ, BENITEZ E, ORTEGA-PIERRES G. 1995. Detection of *Trichinella spiralis* muscle larvae in naturally infected horses. *J. Parasito* 818:781-783.
- AU ACS, KO R, SIMON JW, RIDELL NJ, WONG FW, TEMPLER MJ. 1983. Study of acute trichinosis in Ghurkas : specificity and sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assay *Trichinella* larval antigens in diagnosis. *Trans. Roy Soc. Trop. Med. Hyg.* 77:412-416.
- BAGHERI A, UBELAKER JE, STEWART GL, WOD B. 1986. Muscle fiber selectivity of *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis*. *J. Parasitol.* 72: 277-288.
- BARUCH M, DESPOMMIER DD. 1991. Blood vessels in *Trichinella spiralis* infection: a study using vascular casts. *J. Parasitol* 77:99-102.

- BELOSEVIC M, DICK AT. 1980. Chemical attraction in the genus *Trichinella*. J. Parasitol 56:88-93.
- BRITOV VA, BOEV SN. 1972. Taxonomic rank of various strains of *Trichinella spiralis* and their circulation in natural. Vestrik Akademii Nauk KSSR. 28:27-32.
- CABRAL-SOTO J, VILLACAÑA-FUENTES H, FRAGOSO-URIBE R, CONTRERAS A. 1989. Triquinosis en Zacatecas perfil epidemiológico 1978-1988. Infectología 10:627-636.
- CAMPELL WC. 1983. Historical introduction En: *Trichinella* and trichinosis. Campbell WC (Ed) Plenum Press. New York pp15-29.
- DE BRUTTON, GARCIA E, TALAMAS O. 1988. Sex- related severity of inflammation in paranchymal brain cysticercosis. Arch Intern Med. 148:544-546.
- DE LA ROSA JL, ARANDA JG, PADILLA E, CORREA D. 1998. Prevalence and risk factors associated with serum antibodies against *Trichinella spiralis*. Inter. J. Parasitol 28:317-321.
- DE LA ROSA JL, MORA J, TAPIA R, CORREA D. 1996. Search of circulating antigen in the serum of experimentally infected rats by ELISA and Western blot. Ninth International Conference on Trichinellosis. Mexico DF.
- DENKERS E, WASSON D, KO RC, HAYES C. 1990. The mouse antibody response to *Trichinella spiralis* defines a single immunodominant epitope shared by multiple antigens. J. Immunol. 144.3152-3160.

- DESPOMMIER DD, 1977. Immunity to *Trichinella spiralis*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 26:68-75.
- DESPOMMIER DD. 1983 Biology En. *Trichinella* and Trichinosis. Campbell WC.(Ed) Nws York: Plenum Press. pp 75-142.
- DESPOMMIER DD. 1990. *Trichinella spiralis*: the worm that would be virus. Parasitol. today 6:193-196.
- DESPOMMIER DD, SYMMANS WF, DELL R, 1991. Changes in nurse cell nuclei during synchronous infection whit *Trichinella spiralis* trichinosis. J. Parasitol. 77:290- 295.
- DICK TA. 1983a. Species and infraspecific variation. En *Trichinella* and trichinosis. Campbell WC (Ed) Plenum Press. New York pp.31-73.
- DICK TA. 1983b. Infectivity of isolates of *Trichinella* and the ability of an artic isolate to survive freezing temperatur in rancoon, Procyon lotor under experimental conditions. J. Wild. Dise. 19:176-180.
- DICK TA, CHADEE K. 1983. Interbreedinig and geneflow in the genus *Trichinella*. J. Parasitol. 69:176-180.
- DICK TA, SILVER BB. 1980 Intestinal distribution of *Trichinella spiralis* in rats. J. Parasitol. 66:472-477.
- DUPOUY-CAMET J, VAN KAPEN F, ANCELLET, VOQUANG D, LAVARDE V, LAPIERRE J.1988. Study of specific immunoglobulins (total IgG, IgM, IgA, IgE) indirect immunoflorescence and ELISA in 40 patients whit trichinosis followed over a 9-month period. Pathol 36:803-807.

- ELLIS LA, McKVAY CS, PROBERTMA, BUNDLE DR, APPLETON JA. 1996  
Tyvelose in a glican of *Trichinella spiralis*: unique  $\beta$  linked 3,6-  
Dideoxyhexose in a novel antigen. Ninth international conference on  
trichinellosis. Mexico City
- FRAGOSO R. 1981. Un brote de triquinelosis en Villanueva, Zacatecas. Sal  
pub. Méx. 23: 25-41.
- GANSMULLER A, ANTEUNISA, VENITURIELLO SM, BRUSCHI F, BINAGHI  
RA. 1987. Antibody-dependent *in vitro* citotoxicity of newbron *Trichinella  
spiralis* larvae nature of cell involved. Parasite immunol. 9:281-285.
- GRENCIS RK, RIDLINGER J, WALKELIN D. 1985. L3T4-positiv T lymphoblasts  
responsible for transfer of immunity to *Trichinella spiralis* in mice.  
Immunology 56:213-216.
- IONESCU V. 1996. Aspects regading shape, size and dispersion of *Trichinella  
spiralis* cysts into parasited organisms. Ninth International Conference on  
Trichinellosis. Mexico DF.
- IVANOSKA D, CUPERLOVIC K, GAMBLE RH, MURRELL DK. 1989.  
Comparative efficacy of antigen and antibody detection tests for human  
trichinosis. J. Parasitol. 75:38-41.
- KAPEL CMO, HENRIKSEN SA, NASEN P. 1996. Muscle distribution *Trichinella  
nativa* in naturally infected artic fox. Ninth International Conference on  
Trichinellosis. Mexico DF.
- KATZUNG GB. 1984. Farmacología básica y clínica. El manual moderno.  
México DF. pp. 639.

KIM C. 1983. Epidemiology. II. Geographic distribution and prevalence . En:

*Trichinella* an trichinosis. Campbell CW. (Ed) New York: Plenum Press  
pp. 445-446.

KNAPEN VF, FRANCHIMONT JH, RUITENBERG EJ, BALDELLIB, BRADLEY

J, GIBSON TE, GOTTAL C, HENRIKSEN SA, KOHELER G,

SKOVGARD N, SOLE C, TAYLOR SM. 1980. Comparison of the

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) whit three methods for the  
detection of *Trichinella spiralis* infection in pig. Vet. Parasitol. 7:109-121.

KO RC. 1995. A brief update on diagnosis of trichinellosis. Second seminar on

food-borne parasitic zoonosis: current problems in epidemiology, food  
safety and control. Abstracts. Tailandia.

KOLATA G. 1985. Testing for trichinosis. Science. 227:621-624.

LAMB GA, KAGAN IG, SCHOLTENS R, PREIZLER J. 1964. Evaluation of

intradermal and serologic tests in a large outbreak of trichinosis, Am.J.  
Hyg. 80:235-241.

LAMOTHE AR, GARCÍA L.1988. Helmintiasis del hombre en México. México

DF Editores. pp.74-77.

LEE TDG, BEFUS D. 1989, Effects of rat and human intestinal lamina propia

cells on viability and muscle establishment of *Trichinella spiralis* new  
born larvae. J. Parasitol. 75:124-128.

LICHTENFELS JR, MURRELL HD, PILITT PA. 1983. Comparasion of three

subspecies of *Trichinella spiralis* by scannig eletron microscopy. J.  
Parasito 69:1131-1140.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- LJUNGSTROM Y, HAMMARTROM L, KOCIECKAW, SMITH CIE. 1988. The sequential appearance of IgG subclasses and IgE during the course *Trichinella spiralis* infection. Clin. Exp. Immunol. 75:230-236.
- MARTIN L VDL, DAME BJ, ADAMS LC GILLIS DK, LITTELL CR. 1992. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of trichinellosis in swine. Am. J. Vet. Res. 536:877-882.
- MARTINEZ-MARAÑON R. 1979. Un pequeño brote familiar de triquinosis en Naucalpan México. Sal Pub. Méx. 21:161-165.
- MARTINEZ-MARAÑON R. 1985. ¿Está aumentando la triquinosis en México? ¿Podría esto ser una consecuencia inesperada de nuestro "desarrollo"? Sal. Pub. Méx. 27:40-51.
- MARTINEZ-MARAÑON R, TREJO J, DELGADO AGUIRRE B. 1974. Frecuencia de la infección por *Trichinella spiralis* en 1000 diafragma de cadáveres de la Ciudad de México en 1972-1973. Rev. Inv. Salud Pública. 34:95-105.
- MARTINEZ PBO, VIGERAS GRA CARVAJAL GAM, FLORES PA, ABRAHAM JA. 1986. Triquinosis. Bol. Med. Hosp. Infantil Méx. 113:181-183.
- MAZZOTTI, CAVIRA C. 1943. Investigación de triquina en 600 diafragmas humanos de la ciudad de México. Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. 4:343-351.
- MAZZOTTI L, PASTRANA A. 1943. La investigación de triquinosis en tejidos musculares por el método de digestión. Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. 4:337-342.

- MCLAREN DJ, ORTEGA-PIERRES G, PARKHOUSE RME. 1987. *Trichinella spiralis*: Immunocytochemical localization surface and intracellular antigens using monoclonal antibody probes. Parasitol. 6:279-284.
- NOCKEL K, VORGT WP. 1996. Experimental *T. spiralis* infection in the silver fox (*Vulpes fulaua*). Ninth International Conference on Trichinellosis. Mexico DF.
- OLSEN OW, 1974. Animal parasites, the life cycle and ecology. 3d de Baltimore University Park press. pp105.
- ORTEGA-PIERRES G, CHAYEN A, CLARK WT, PARKHOUSE RME. 1984. The occurrence of antibodies hidden and exposed determinants of surface antigens of *Trichinella spiralis*. Parasitol. 88:359-369.
- ORTEGA-PIERRES G, MUÑIZ E, CORRAL-VASQUEZ R, PARKHOUSE RME. 1989.-Protection aganist *Trichinella spiralis* Induced by purified stage-specific surface antigens of infective larvae. Parasitol Res. 75:563-569.
- ORTEGA-PIERRES G, YEPEZ ML, HOMAN W, GAMBLE HR, LIM PL, TAKAHASHI Y, WASSOM DL, APPLETON JA. 1996. Worshop on a detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: a platform for future studies on antigen and antibodies to this parasite. Parasite Immunol. 18:173-284.
- PAIN SP, SRIVIDYA A, KRISHNAMOORTHY K, DAS PK DHANDA V.1997. rapid assessment procedures (RAP) for lymphatic filarisis. Natl. Med. J. India. 10:19-22.

- PARKHOUSE RME, ORTEGA-PIERRES G. 1984 Stage specific of *Trichinella spiralis*. Parasitology. 88:623-627.
- PARKHOUSE RME, PHILIPP M, OGILVIE BM. 1981. Characterization of surface antigens of *Trichinella spiralis* infective larvae. Parasite Immunol. 3:339-352.
- PAWLOWSKI ZS. 1983. Clinical aspects in man In: *Trichinella* and Trichinosis. WC Campbell (Ed) New York Plenum Press pp367.
- PERRIN T. 1942. Algunos estudios sobre triquinosis ignoradas. Ciencia. 3:108-114.
- POZIO E, LA ROSA G, ROSSI P, FICO R.1989. Survival of *Trichinella* muscle larvae in frozen wolf tissue in Italy. Parasitology 75:472-473.
- QUIROZ H, LANDEROS R. 1988. Valoración del tiempo de sobrevivencia de las larvas de *Trichinella spiralis* en chorizo de cerdo. Rev. Méx. Parasitol. 1:22-24.
- RAJAN TV, NELSON FK SHLTS KL, BEAMER WG, YATES J, GREINER DL. 1994. Influence of gonadal steroids on susceptibility to *Brugia malayi* in scid mice. Acta Trop. 56:307-314.
- REASON J, ELLIS A, APPLETON JA, WISNEWSKI N, GRIEVE B, MCHAIL M, WALSSOM L, MORRIS R, DELL A. 1994. Novel tyvelose-containing tri- and-tetra-antennary N-glycans in the immunodominant antigens of the intracellular parasite *Trichinella spiralis*. Glycobiology. 4:593-603.
- SILBERSTEIN DS. DESPOMMER DD. 1985. Effects on *Trichinella spiralis* of host responses to purified antigens. Science. 227:948-953.

- SNYDER DE, ZARLENGA DS, LA ROSA G. POZIO E. 1993. Biochemical, biological, and genetic characterization of sylvatic isolate of *Trichinella*. J. Parasitol. 79:347-352.
- SSa. 1987. Brotes. Epidemiología 1:10.
- SSa. 1988 Brotes . Epidemiología 2:17.
- SSa, 1990. Brotes. Epidemiología 2:18.
- SSa. 1992. Triquinosis. Epidemiología. 2:25.
- STEVENS C, CONNIE LC LEE C, TOMHSON D, SUMI S, RFRITSCH T. COOMS WR. 1993. Trichinosis with ventilatory failiure and perstent myocarditis. Clinical 6:500-504.
- STEWART GL, 1983. Biochemistry En: *Trichinella* and Trichinosis. Campbell WC (Ed) New york Plenum Press. pp.75.
- STEWART GL. GIANNINI SH, 1982. *Sarcocystic, Trypanosoma, Toxoplasma, Brugia, Ancylostoma* and *Trichinella* spp: Review of the intracelular parasites of striated muscle. Exp. Parasitol. 53:407-447.
- SUKHNEO MVK, MEEROVITCH E. 1973. A comparison of the antigen characteristics of three geographical isolates of *Trichinella*. Int. J. Parasitol. 9:571-576.
- TADEUSZ H, DZBENSKI, ELZBIETAB, WOJCIECH P. 1994. Detection of circulating parasitic antigen in acute infections with *Trichinella spiralis*: diagnostic significance of findings. Zbl. bakt 281:519-525.

- TAKAHASHI Y, MIZUNO N, UNO T, AISAKA A, ARAKI T. 1990a. A spectrum of antibody response with time after *Trichinella* infection rats. J. Parasitol. 76:230-239.
- TAKAHASHI Y, MIZUNO N, UNO T, SUZUKI H, SHIMAZU K ARAKI T. 1990b. *Trichinella spiralis*: the *in situ* localization of muscle larva antigens recognized by humans. Exp. Parasitol. 70:107-110
- TAKAHASHI YUZO. 1997. Antigens of *Trichinella spiralis*. Parasitol today. 13:104-106.
- TOWBIN H, STAEBELI T, GORDON J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheep. Procedure and some applications. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 76:4350-4354.
- VEGA N. 1991. Triquinelosis porcina. En: Zoonosis parasitaria, México DF. Facultad de Medicina Veterinaria Zotecnica UNAM. pp. 200.
- WAKELIN D. AND GOYAL PK. 1996. *Trichinella* islates parasite variability and host responses. Int. J. Parasitol 26: 471-481.
- WAKELIN D, WILSON MM. 1980. Immunity to *Trichinella spiralis* in irradiated mice. Int. J. Partasitol. 10:37-40.
- WIEGGER LH, ANJA CG, KNAPEN VF. 1991, Identification of diagnostic antigens from *Trichinella spiralis*. Parasitol Res. 78 :112-119.
- YÉPEZ L, ARIZMENDI N, ORTEGA-PIERRS G. 1995. Utilidad de preparados recombinantes y sondas de DNA en el diagnóstico de triquinelosis. Avances y perspectivas 14:16-20.

- YÉPEZ L., ORTEGA-PIERRES G. 1994. Aspectos actuales sobre el diagnóstico de la triquinelosis . Rev. Lat-Amer. Microbiol 36:127-138
- ZIMMERMANN WJ. 1983. Control II: Surveillance in swine and other animals by muscle examination. En *Trichinella* and Trichinellosis. Campbell WC (Ed) New York Plenum Press, pp515-528.