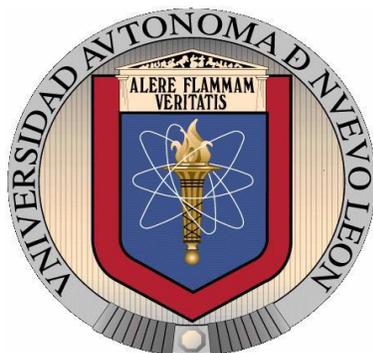


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE GENERADA POR LA  
INMUNIZACIÓN E INMUNOTERAPIA DE UNA PROTEÍNA ANTIGÉNICA DE  
*Trichinella spiralis***

POR

M. C. ELSA GABRIELA CHÁVEZ GUAJARDO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA

ENERO 2014

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE GENERADA POR LA  
INMUNIZACIÓN E INMUNOTERAPIA DE UNA PROTEÍNA ANTIGÉNICA DE**  
*Trichinella spiralis*

Por: M.C. ELSA GABRIELA CHÁVEZ GUAJARDO.

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA

**Comité de tesis**

**Dr. Mario Morales Vallarta**

---

**Director Interno de Tesis**

**Dra. Ma. Alejandra Moreno García.**

---

**Director Externo de Tesis**

San Nicolás de los Garza Nuevo León,

Enero de 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE GENERADA POR LA INMUNIZACIÓN  
E INMUNOTERAPIA DE UNA PROTEÍNA ANTIGÉNICA DE *Trichinella spiralis*

M. C. ELSA GABRIELA CHÁVEZ GUAJARDO

Grado de DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Microbiología.

**Comité de tesis**

---

*Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta*  
*Director Interno*

---

*Dra. María Alejandra Moreno García*  
*Director Externo*

---

*Dra. María Porfiria Barrón González*  
*Secretario*

---

*Dr. Feliciano Segovia Salinas*  
*Vocal*

---

*Dra. María Eufemia Morales Rubio*  
*Vocal*

---

## DEDICATORIA

Para los que cualquier palabra es insignificante por lo mucho que representan, a *mis padres Lucia y Roberto*, por su amor, sus días de trabajo y sobre todo por sus sacrificios, enseñanzas y ejemplo, en todo este tiempo que Dios me ha permitido compartir con ustedes, por ustedes llegue hasta aquí, soy lo que soy y continuare... simplemente GRACIAS.

*A mis Hermanos y Hermanas: Oscar, Julio Cesar, Carla Alejandra, Alicia Elizabeth y Abel*, Gracias siempre por el apoyo recibido.

*Para esas Chiquitas almas, que recorren mi vida de tal manera que ahora hacen entender que los momentos más difíciles no lo son tanto. A mis sobrina(o)s: Marlene Deyanira, Itzel, Diniha Nayeli, Mitzya Alejandra, Ximena, Mishka Alessandra y Roberto Ismael.*

A mis tías Margarita y Elpidia mi primo Ricardo por su apoyo incondicional.

A toda mi Familia por ser lo que son y estar cuando es necesario, pero como siempre gracias por el apoyo y comprensión.

A quien me ha dado el soporte Académico y más para superar esta meta a la Dra. en C. *Alejandra Moreno García*. Gracias por el tiempo, la orientación y ayuda que me dedico para la realización de este trabajo, por el apoyo absoluto y amistoso que me permitieron aprender mucho más de lo estudiado.

A la Dra. en C. *Claudia H. Maldonado Tapia*. Gracias por el apoyo y recomendaciones, pero sobre todo otra vez mi agradecimiento infinito por la confianza y amistad que hicieron que este paso fuera más agradable.

A mi Amiga *Patricia* por que espero siempre contar contigo al igual que tu conmigo y porque tu amistad llego justo cuando en mi vida era necesaria, a *Sofía y Natalia*, Gracias siempre por sus palabras de aliento por que en los momentos más complicados de desánimo siempre fueron un punto positivo, algunas veces por accidente o no coincides en la vida con personas que tienen algo que cambia la monotonía de ciertos momentos que puedo decir María Auxilio.

---

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo beca registro no. 176788.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y Autónoma de Zacatecas por haberme dado la oportunidad de escalar un peldaño más en el campo del conocimiento.

Al Dr. En C. Mario R. Morales Vallarta por la asesoría y tiempo dedicada a este trabajo Dr mi agradecimiento total.

A la Dra. en C. María Porfiria Barron González por el tiempo y consejos brindados.

A todos los Docentes del Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

Al Dr. Feliciano Segovia Salinas, Dra. Licet Villarreal Treviño, Dra. María Eufemia Morales Rubio por el tiempo dedicado

Al Dr. Víctor Manuel Torres de la Cruz del Instituto de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social por el apoyo en la realización e interpretación de la secuenciación del AST por Espectrometría de Masas, así mismo Al Dr. Javier Vargas Villarreal por el tiempo, interés y apoyo dado a este trabajo.

A la M. en BE. Gabriela Reveles y Al MVZ. Sergio Saldívar por la colaboración en el desarrollo experimental de este trabajo.

A los compañeros Alumnos Román y Alejandro por su colaboración más allá de su deber Académico.

A los integrantes del Cuerpo Académico de Biología Celular y Microbiología de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

A la Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas donde se llevó a cabo gran parte de este trabajo.

A todos aquellos que hicieron posible este trabajo GRACIAS.

---

## TABLA DE CONTENIDO

|  | <b>Pagina</b> |
|--|---------------|
| <i>i. Dedicatoria y Agradecimientos.</i> | <b>1</b>      |
| <i>ii. Tabla de contenido.</i>           | <b>3</b>      |
| <i>iii. Lista de figuras y tablas.</i>   | <b>4</b>      |
| <i>iv. Nomenclatura</i>                  | <b>6</b>      |
| <b>1. RESUMEN</b>                        | <b>7</b>      |
| <b>ABSTRACT.</b>                         | <b>9</b>      |
| <b>2. JUSTIFICACIÓN.</b>                 | <b>10</b>     |
| <b>3. INTRODUCCIÓN.</b>                  | <b>12</b>     |
| <b>4. HIPÓTESIS.</b>                     | <b>13</b>     |
| <b>5. OBJETIVOS.</b>                     | <b>13</b>     |
| <b>5.1 Objetivo general.</b>             | <b>13</b>     |
| <b>5.2 Objetivos particulares.</b>       | <b>13</b>     |
| <b>6. ANTECEDENTES.</b>                  | <b>14</b>     |
| <b>7. MATERIAL Y MÉTODOS.</b>            | <b>30</b>     |
| <b>7.1 Material biológico</b>            | <b>30</b>     |
| <b>7.2 Diseño Experimental</b>           | <b>31</b>     |
| <b>7.3 Modelo Experimental</b>           | <b>32</b>     |
| <b>7.4 Técnicas</b>                      | <b>32</b>     |
| <b>8. RESULTADOS.</b>                    | <b>40</b>     |
| <b>9. DISCUSIÓN.</b>                     | <b>66</b>     |
| <b>10. CONCLUSIONES.</b>                 | <b>70</b>     |
| <b>11. ANEXOS</b>                        | <b>71</b>     |
| <b>12. LITERATURA CITADA.</b>            | <b>74</b>     |

---

---

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.

|   | <b>Página.</b> |
|---|----------------|
| <b>Fig. 1.</b> Animales donde se conserva la cepa de <i>T. spiralis</i> , DA y LI de <i>T. spiralis</i>                               | 40             |
| <b>Fig. 2.</b> Procesamiento de LI de <i>T. spiralis</i> con Nitrógeno Líquido.   | 41             |
| <b>Fig. 3.</b> Análisis de Concentración de Proteínas de AST  | 42             |
| <b>Fig. 4.</b> Gel de poliacrilamida donde se muestra la separación por PM del AST. Y análisis por densitometría de bandas obtenidas. | 43             |
| <b>Fig. 5.</b> Diafragma de rata por la técnica de compresión sin presencia del parásito <i>T. spiralis</i>                           | 44             |
| <b>Fig. 6.</b> Técnicas Directas del grupo control infectado  | 45             |
| <b>Fig. 7.</b> Técnicas Directas del grupo con tratamiento de inmunización con AST  | 45             |
| <b>Fig. 8</b> Técnicas Directas del grupo con tratamiento de inmunización con proteína antigénica de 45kDa                            | 47             |
| <b>Fig. 9.</b> Técnicas Directas del grupo con tratamiento de inmunoterapia con AST   | 48             |
| <b>Fig. 10.</b> Técnicas Directas del grupo con tratamiento de inmunoterapia con proteína antigénica de 45kDa                         | 49             |
| <b>Fig. 11.</b> Corte histológico del grupo control infectado procesado por la técnica de hematoxilina eosina                         | 50             |
| <b>Fig. 12.</b> Corte histológico del grupo con tratamiento de inmunoterapia con AST.   | 51             |
| <b>Fig. 13.</b> Corte histológico del grupo con tratamiento de inmunoterapia con proteína antigénica de 45 kDa                        | 51             |
| <b>Fig. 14.</b> Corte histológico del grupo con tratamiento de inmunización con proteína antigénica de 45 kDa                         | 52             |
| <b>Fig. 15.</b> Corte histológico del grupo con tratamiento de inmunización con proteína antigénica de AST                            | 52             |
| <b>Fig. 16.</b> MIDD de sueros de dos semanas posteriores a la infección del grupo de InZ con la proteína antigénica de 45 kDa        | 58             |
| <b>Fig. 17.</b> MIDD en 4 y 6 semanas pi de ratas tratadas por InZ con proteína antigénica de 45 kDa                                  | 58             |

---

|  |    |
|--|----|
| <b>Fig. 18.</b> Se muestra rata hembra del grupo control infectado antes y después de la de la aplicación de AST | 60 |
| <b>Fig. 19.</b> IET de los grupos de tratamiento.  | 63 |
| <b>Tabla I.</b> Manifestaciones clínicas características de la Trichinellosis.                                   | 18 |
| <b>Tabla II.</b> Carga parasitaria en hembras representada en $\mu$ l, LI y %                                    | 54 |
| <b>Tabla III.</b> Carga parasitaria en Machos representada en $\mu$ l, LI y %                                    | 55 |
| <b>Tabla IV.</b> Resultado de MIDD para los distintos tratamientos y tiempos de tomada la muestra de sangre.     | 57 |
| <b>Tabla V.</b> Resultados de la triple reacción de lewis en hembras a los distintos tiempos de revisión.        | 59 |
| <b>Tabla VI.</b> Resultados de la triple reacción de lewis en Machos a los distintos tiempos de revisión.        | 59 |
| <b>Tabla VII.</b> Resultado en % de eosinofilia con los distintos tratamientos en machos.                        | 61 |
| <b>Tabla VIII.</b> Resultado en % de eosinofilia con los distintos tratamientos en hembras.                      | 62 |
| <b>Tabla IX.</b> Características de las proteínas encontradas  | 65 |
| <b>Grafica I.</b> Carga parasitaria en machos  | 54 |
| <b>Grafica 2.</b> Carga parasitaria en hembras   | 55 |
| <b>Grafica 3.</b> % de Eosinofilia en machos   | 61 |
| <b>Grafica 4.</b> % de Eosinofilia en hembras  | 62 |

---

## NOMENCLATURA

|       |  |
|-------|--|
| Ac    | Anticuerpos                                |
| Ag    | Antígenos                                  |
| AST   | Antígeno soluble total                     |
| ATP   | Adenosin tri fosfato                       |
| °C    | Grados Celsius                             |
| CI    | Control infectado                          |
| cm    | Centímetros                                |
| CP    | Compresión en placa                        |
| CS    | Control sano                               |
| DA    | Digestión artificial                       |
| EGPA  | Electroforesis en gel de poliacrilamida    |
| ELISA | Ensayo de inmuno adsorción ligado a enzima |
| g     | Gramos                                     |
| H     | Horas                                      |
| InT   | Inmunoterapia                              |
| InZ   | Inmunización                               |
| LI    | Larva infectante                           |
| LRN   | Larva recién nacida                        |
| L1-L4 | Fases de desarrollo de la larva            |
| M     | Concentración molar                        |
| mg    | Miligramos                                 |
| µg    | Microgramos                                |
| MIDD  | Micro Inmuno difusión doble                |
| µl    | Microlitros                                |
| NC    | Nitrocelulosa                              |
| Nm    | Nanómetros                                 |
| PBS   | Solución buffer de fosfatos                |
| PI    | Posterior a la infección                   |
| Rpm   | Revoluciones por minuto                    |
| SDS   | Dodesil sulfato de sodio                   |
| SNC   | Sistema nervioso central                   |
| T     | Temperatura                                |
| %     | Porcentaje                                 |

---

## 1. RESUMEN

Uno de los parásitos helmintos que continúa causando estragos en varios mamíferos incluido el hombre es el del género *Trichinella* y principalmente la especie *spiralis* aunque se conocen otras especies esta es una de las más importantes, en cuanto a la infección de Trichinellosis en cerdos y humanos. Así se plantea como objetivo de este estudio caracterizar la respuesta inmune generada por la inmunización e inmunoterapia de la proteína de 45 kDa y del Antígeno Soluble Total (AST) de *Trichinella spiralis*, para el estudio se utilizaron ratas cepa Long Evans, divididas en cuatro grupos, control sano, control infectado, grupo inmunización y grupo inmunoterapia estos grupos tanto para hembras y machos y para proteína de 45 kDa y AST, para la inmunización se realizó una aplicación semanal de la proteína correspondiente vía intradérmica, subcutánea, intramuscular e intraperitoneal durante cuatro semanas, posteriormente se retó con *T. spiralis*, se tomó muestra sanguínea de cada animal cada dos semanas por 6 semanas para aplicar las técnicas indirectas, posteriormente se sacrificaron se obtuvo muestra de músculo esquelético para la aplicación de técnicas directas, para la inmunoterapia primero se infectaron los animales y se monitorearon hasta completar el ciclo vital del parásito, posteriormente se aplicó la proteína correspondiente 5 aplicaciones, subcutánea en días consecutivos y concentración ascendente, se realizó la purificación del AST para someterlo análisis por espectrometría de masas, los resultados de las técnicas directas muestra modificaciones a las LI obtenidas por las distintas técnicas, también se obtuvo disminución de la carga parasitaria con respecto al control infectado, al realizar un análisis de varianza para los datos obtenidos la razón de varianza indica que existe diferencia significativa entre el control y los tratamientos, el Western Blot mostro un patrón de bandeo donde se identifica el reconocimiento de la banda de 45 kDa y el tratamiento que muestra esta banda desde las

---

segunda semanas y hasta la sexta semana, los cortes histológicos sometidos a tinción Hematoxilina-Eosina muestran un importante infiltrado celular de células polimorfonucleares, esta reacción se manifiesta exacerbada en muestras procedentes del tratamiento de inmunización con la proteína de 45 kDa, estos resultados muestran que la inmunización con la proteína de 45 kDa confiere protección contra la infección por *T. spiralis*. El análisis por espectrometría de masas muestra más de 100 proteínas de las cuales se identifican dos proteínas identificadas de la Universal Uniprot-SwissProt.

### 1.1 ABSTRACT

One of the helminth parasites that continue to wreak havoc in various mammals including man is the genus *Trichinella* specie *spiralis*, known other species but this one of most important in terms Trichinellosis infection in pigs and humans. The aim of this study was characterize the immune response generated by immunization and immunotherapy of 45 kDa protein and Total Soluble Antigen (AST) of *Trichinella spiralis*, for the study rats were used strain Long Evans, divided into four groups, sound control, infected control group, immunization and immunotherapy group these groups for both males and females and 45 kDa protein and AST for immunization was performed weekly application of the corresponding protein via intradermal, subcutaneous, intramuscular e intraperitoneal for four weeks subsequently challenged with infection with *T. spiralis*, blood samples were taken from each animal every two weeks for 6 weeks to apply indirect techniques subsequently sacrificed, samples of the skeletal muscle for applying direct techniques for immunotherapy first infected animals and were monitored until complete the life cycle of the parasite, subsequently the corresponding protein was applied to 5 applications, subcutaneous and concentration in ascending consecutive days, was performed for

---

consideration AST purification by mass spectrometry analysis, the results of the direct techniques shows modifications to the LI obtained by the different techniques, also obtained parasite load decreased relative to control infected when an analysis of variance for the data obtained variance ratio indicates significant difference between control and treatments, Wester Blot showed banding pattern which identifies the recognition of the 45 kDa band and treatment showing this band from the second week until the sixth week, underwent histological Hematoxylin-Eosin staining show a significant cellular infiltrate of polymorphonuclear cells, exacerbated this reaction occurs in samples of immunization treatment with the protein of 45 kDa, these results show that immunization with the 45 kDa protein confers protection against infection by *T. spiralis*. The mass spectrometric analysis shows more than 100 proteins of which identifies two proteins identified Universal Uniprot-SwissProt.

---

## 1. JUSTIFICACIÓN

En los últimos veinte años se han reafirmado esfuerzos para el control de *T. spiralis* en varios países del mundo afectados por esta parasitosis (Van Burell, 2000). Algunas autoridades consideran que la Trichinellosis debe ser clasificada como una enfermedad emergente/reemergente, particularmente debido al incremento en el reporte del número de casos de algunas áreas donde no se había presentado la infección (Dupouy Camet, 2000). Los cambios en el ecosistema así como socioeconómicos, la exportación de carnes procedente de países con deficiente control sanitario contribuyen al aumento de la incidencia de la enfermedad (Pozio *et al.*, 2001).

La región más afectada en los últimos años ha sido la Unión Europea en 2007 reportan 779 casos, en 2008 reportan un brote en Italia y el último caso reportado en 2009 se dio en las colonias Francesas de Senegal donde se reportan casos de Trichinellosis a causa del consumo de jamón de cerdo (Dupouy-Camet J. 2009). En México el último reporte dado por la Secretaría de Salud es en 2004 reportando 23 casos sin embargo, el boletín de salud pública divulgado por el sector salud en 2011 indican que se calcula que alrededor del 2% de la población en México está afectada con Trichinellosis (México sano 2011) datos publicados por Moreno G., 2005 y Berumen 2007, indican que la parasitosis continúa presente en varias especies animales tales como cerdos, perros y ratas domésticas que comúnmente tienen contacto con desperdicios producidos por humanos, el caso del cerdo es importante ya que se considera el principal transmisor al humano y en este caso un estudio epidemiológico de López en 2012 muestra que la infección fue identificada en sueros de niños analizados en un primer tamizaje por MIDD y confirmados por Western Blot de sueros provenientes de distintas instituciones de salud del estado de Zacatecas (López 2012).

---

En 2013 se han reportado varios brotes en la región de Argentina en Abril del 2013 reportan la infección de 30 personas a causa del consumo de carne de Jabalí ahumado en la población de San Martín de los Andes (ProMED2013), en mayo del 2013 en la región de Corrientes se identificó a un paciente del sexo masculino con serología positiva a Trichinellosis, en julio de 2013 se detectó otro brote en la región de Entre Ríos, afecto a 20 individuos los cuales presentaron sintomatología clínica compatible con la infección por Trichinellosis y la fuente de infección fue el consumo de salamines de producción casera los cuales procedían de una carnicería de la ciudad de la Paz (Alerta Triquinellosis 2013).

Estos datos muestran que la parasitosis por *T. spiralis* sigue vigente, por lo que se considera conveniente contar con inmunógenos y caracterizar la respuesta inmune generada por las proteínas con efecto inmunógeno, para determinar su efecto inmunoprotector tanto en la inmunización como la inmunoterapia

---

## 2. INTRODUCCIÓN.

La Trichinellosis es una infección transmitida por el nemátodo *Trichinella spiralis*, frecuentemente no es identificada, por lo que continua siendo una preocupación de salud pública, a nivel mundial se tiene estimado que aproximadamente once millones de personas alrededor del mundo podrían estar infectadas con el parásito (Liu M. and Boireau P., 2002), La infección se presenta al consumir carne cruda o insuficientemente cocida procedente principalmente de cerdos infectados con larvas infectantes (LI) del parásito (Pozio 2005), las LI ingeridas migran del estómago a intestino mientras sufren una serie de mudas se incrustan en las vellosidades intestinales, en donde se diferencian sexualmente, las hembras fecundadas originan a las larvas recién nacidas (LRN), estas pasan a circulación sanguínea y se alojan en músculo, posteriormente son encapsuladas en ese lugar (Ortega *et al.* 1996) . Los signos y síntomas de la enfermedad son variables depende de la carga parasitaria consumida aunado a las características nutricionales, hormonales y edad del hospedador, por lo tanto se presentan síntomas leves hasta graves, poniendo en riesgo la vida del hospedador (Camet *et al* 2002).

---

## 4. HIPÓTESIS

La proteína inmunodominante de 45 kDa de *Trichinella spiralis*, desencadena una respuesta inmune que tendrá un efecto protector contra Trichinellosis tanto en la inmunización como en la inmunoterapia.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Caracterizar la Respuesta Inmune generada por la inmunización e inmunoterapia de la proteína de 45 kDa y del Antígeno Soluble Total (AST) de *Trichinella spiralis*

### 5.2 Objetivos Específicos:

1. Caracterizar la Respuesta inmune humoral y celular generada por la inmunización e inmunoterapia con la proteína de 45 kDa y AST en ratas machos.
2. Caracterizar la Respuesta inmune humoral y celular generada por la inmunización e inmunoterapia con la proteína de 45 kDa y AST en ratas hembras.
3. Secuenciar parcialmente la proteína antigénica de 45 kDa obtenida del AST de *T. spiralis*.
4. Llevar a cabo un análisis de varianza para la variable carga parasitaria para corroborar si existe diferencia significativa en los tratamientos aplicados.

---

## 6. ANTECEDENTES

### 6.1 Clasificación Taxonómica de *Trichinella spiralis*

Hasta el momento se han identificado 12 especies o genotipos que comprenden el género *Trichinella*, las cuales se clasifican en dos grupos con características distintas las cuales radican principalmente en las que presentan capsula y las que no la presentan; (Pozio *et al.*, 2005). El que presenta cápsula se refiere al desarrollo de una capa de colágena alrededor de la LI de *T. spiralis*. Las especies con cápsula, tienen características básicas con relación a la adquisición de nutrientes, eliminación de desechos, la estimulación antigénica de la respuesta inmune del huésped y la transcripción de genes regulatorios, que activan la producción de colágena tipo IV y VI (Pozio *et al.*, 2001). En cuanto a la clasificación se ubica en el Reino Animalia, Phylum Nematoda, Subclase Adenophorea y posee esticosoma, Orden Enoplida, Superfamilia Trichinelloidea ya que el gusano adulto tiene un extremo anterior más adelgazado y son monodelfos pertenece a la Familia Trichinellidae debido a la localización anterior de la vulva y considerando que son Vivíparos, pertenecen al Género *Trichinella*. (Gottstein, *et al.*, 2009; Builes, *et al.*, 2009; Moreno; *et al.*, 2009)

### 6.2 Morfología de *Trichinella spiralis*

*T. spiralis* es un nematodo blanquecino tubular, con la extremidad anterior más delgada que la posterior. El macho mide 1.5 mm de largo por 0.05 mm de ancho, por su parte la hembra mide 3.5 mm de largo por 0.06 mm de ancho, (Despommier, 1974, Lloyd, 2000). La forma Adulta del parásito tiene una boca pequeña redonda sin papilas en su extremo anterior, el tubo digestivo es largo y angosto, el esófago consta de una parte anterior corta muscular, otra posterior larga, que contiene una línea de células de esticocitos llamada esticosoma que

---

la caracteriza, este es un órgano propio del estadio juvenil del parásito. Cada esticosito contiene antígenos (Ag) que reaccionan con los anticuerpos (Ac) presentes en el suero del huésped (Despommier & Muller, 1976). La hembra tiene un ovario, su vulva está situada cerca del punto medio del esticosoma, su extremo posterior es redondeado, mientras que en el macho se presenta una curvatura ventral con dos apéndices caudales lobulares, dos papilas entre ellos, carece de espícula, está compuesto de un solo testículo en el cual se lleva a cabo el proceso de espermatogénesis para la producción de espermatozoides no ciliados (Takahashi *et al.*, 1994, Lloyd, 2000). La LRN tiene un tamaño aproximado de 100 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) de largo por 6  $\mu\text{m}$  de ancho, es forma cilíndrica, la diferenciación sexual se da antes de encapsularse en músculo esquelético, el tamaño permanece constante desde la migración desde el intestino al músculo; posee un espolón cefálico de tamaño pequeño, estilete bucal y un esticosoma formado por 30 a 40 esticocitos que contienen gránulos de distinto tamaño cuya importancia radica en su poder antigénico al ser excretados (Chávez, *et al.*, 2006; Ramírez, 1981; Tay, *et al.*, 2003; Riva, *et al.*, 2006).

### **6.3 Ciclo de vida**

El humano adquiere la infección a través de la ingestión de carne principalmente de cerdo insuficientemente cocida, con LI de *T. spiralis*. El ciclo vital se da en un solo huésped donde se desarrollan los diferentes estadios del parásito. Cuando la carne es consumida los jugos digestivos digieren la carne y las LI se liberan en intestino delgado, penetran la mucosa intestinal y sufren tres mudas de cutícula hasta convertirse en parásitos adultos, se diferencian en hembras y machos adultos unas 30 horas después de la infección.

---

La cópula sucede con los nemátodos contenidos en la mucosa intestinal (en el lumen intestinal); Los machos son eliminados por una reacción de hipersensibilidad inmediata y automática de la motilidad intestinal por el huésped luego de cumplida su función fértil. Las hembras fecundadas se localizan en el interior de la mucosa del duodeno, yeyuno e íleon y éstas son eliminadas poco después de la liberación de las LRN. Esta expulsión se debe en parte a linfocitos Th2 e IgE. Entre el tercero y el quinto día, comienza la postura de LI. Cada hembra coloca alrededor de 60-80 LRN (Moreno, 2009, Li *et al.*, 1998, Chávez *et al* 2006). Estas LRN miden entre 80 y 120µm, ahondan en la mucosa intestinal, penetran a través de los capilares linfáticos y venosos y llegan a la circulación general, diseminándose por todo el organismo, enquistándose sólo en el musculo esquelético. Las LRN se localizan en el interior de las fibras musculares, destruyéndolas parcialmente. La fase muscular se alcanza a los 20 días post- infección.

Cuando las LRN penetran a la célula muscular provocando modificaciones del contenido celular, secretan sustancias que le permiten una simbiosis entre el parásito y el hospedero, transcurridos aproximadamente quince días, quedan rodeadas por un revestimiento constituido por el sarcolema, formando así a la célula nodriza alrededor de 30 días después de haber adquirido la infección (Despommier, 1993; Moreno, 2009, Lloyd, 2000; Muñoz *et al* 2007), la célula nodriza mide de 250 a 400 µm., no se observa a simple vista, aunque puede observarse con microscopio de poco aumento. Su aspecto es alargado, contiene en su interior LI de *T. spiralis* en forma de espiral. En esta fase pueden ser ingeridas por un hospedero distinto e infectarlo (Moreno 1994, Li *et al.*, 1998, Chávez *et al* 2006).

---

## 6.4 Manifestaciones clínicas de Trichinellosis

Existen variables que pueden modificar el cuadro clínico de la Trichinellosis en un sólo individuo, Los síntomas y síntomas son similares a los de otras enfermedades de tipo gastrointestinal. El periodo de incubación depende de la carga parasitaria de LI de *T. spiralis* ingeridas, que a su vez, determina la severidad de la enfermedad.

Los pacientes también presentan variabilidad en la sintomatología de acuerdo con el tiempo transcurrido entre la ingestión de la carne infectada y la infección por *Trichinella*. Además el sistema inmune del hospedero, edad, sexo, estado nutricional y el estado general de salud son factores importantes en el resultado de la enfermedad. En la mayoría de las personas la fase aguda de la enfermedad inicia con malestar general, dolores agudos, incremento de la temperatura, escalofríos y sudoración profusa, El principal síndrome de esta fase consiste en fiebre persistente, edema facial (característicamente periorbital), dolor muscular y astenia grave que perdura por varias semanas. También pueden producirse mareos y náuseas transitorias, de manera menos común se puede presentar diarrea, hemorragias conjuntivales y subungueales. Es en esta etapa durante la cual las LRN están en migración. Las manifestaciones clínicas de cada fase de la infección se presentan en la Tabla 1. (Capo, *et al.*, 1996; Tay, *et al.*, 2003; Chávez, *et al.*, 2006)

---

---

**Tabla 1**

Manifestaciones clínicas características de la Trichinellosis.

| <b>Fase</b>            | <b>Tiempo</b>                                     | <b>Causa</b>   | <b>Manifestación clínica</b>   |
|------------------------|---|--|--|
| <b>Fase enteral</b>    | Posterior a las 24h de la ingestión de la LI      | Penetración de las LI en la mucosa intestinal, fijación y desarrollo de las formas adultas   | Dolor abdominal, diarrea o constipación, malestar general y fiebre   |
| <b>Fase parenteral</b> | Semanas dos a seis post-infección                 | Liberación de sustancias químicas secretadas por las LI y la respuesta inflamatoria muscular | Mialgia difusa, edema, conjuntivitis, fiebre, dolor de cabeza, rash cutáneo, insomnio  |
| <b>Fase muscular</b>   | Durante la tercera a octava semana post-infección | Las LRN dañan los vasos sanguíneos, llegan a musculo estriado y se desarrollan a LI.         | Edema en cara y párpados, cursa con fiebre, hemorragias petequiales, puede haber invasión pulmonar y afección al sistema nervioso central (SNC), polineuritis, encefalitis.<br>Histológicamente se observan LRN en torrente sanguíneo y paso transitorio en el corazón |

### 6.5 Diagnóstico

El diagnóstico de Trichinellosis depende de la combinación del cuadro clínico, datos epidemiológicos, clínicos de laboratorio y/o de biopsia muscular. Los estudios inmunoserológicos, frecuentemente constituyen el único método de diagnóstico de Trichinellosis humana y los más importantes para realizar estudios de vigilancia epidemiológica (Barlasina, *et al.*, 2009). Los Ac anti-gránulos de los esticocitos, son de mayor especificidad para el diagnóstico de la enfermedad. En los resultados de laboratorio

---

se manifiesta principalmente el incremento típico de los eosinófilos circulantes esto es Leucocitosis (12,500 a 18,000 células por milímetro cúbico ( $\text{mm}^3$ ) común en etapas tempranas con predominio de eosinófilos circulantes (1,400 a 8,700 eosinófilos/ $\text{mm}^3$ ) y enzimas musculares por la presencia del parásito, Incremento de Creatina Fosfoquinasa (CPK), Deshidrogenasa Láctica (LDH) y 1,6-difosfofructolasa (35 a 100%) estas enzimas presentes en suero significan, la destrucción muscular y la migración de las LRN (Capo, *et al.*, 1996).

## 6.6 Técnicas de Diagnóstico

Debe demostrarse la presencia de LI, LRN en tejido o sangre o anticuerpos contra el parásito, mediante técnicas directas y/o técnicas indirectas realizadas en el laboratorio.

a) Técnicas Directas: Estas conllevan la detección de LI de *T. spiralis* en tejido muscular, se realiza en la inspección post-mortem en humanos y en vida en animales para el control sanitario tal es el caso de la triquinoscopía la cual consiste en la identificación de LI de *T. spiralis* en el tejido muscular de diafragma, intercostales, maseteros y abdominales (1.0 g), por la compresión de la muestra entre dos portaobjetos y posterior observación en el microscopio. El límite de detección por medio de ésta técnica de 3-10 LI/g tejido. (FAO/WHO/OIE, 2007; Laverde, *et al.*, 2009), Digestión Artificial en esta técnica las LI son liberadas del tejido muscular para luego ser recuperadas por filtración y posterior sedimentación.

---

Mediante observación en microscopio se realiza el recuento de LI, la sensibilidad de éste método depende de la cantidad de la muestra analizada: para una muestra de cinco gramos: <1 LI/g; para muestras de mayor peso: 0,01 larva/g. ; sólo muestras con diez a doce días post-infección, son viables para ser analizadas por medio de esta técnica (Moreno, *et al.*, 2007; FAO/WHO/OIE, 2007; Laverde, *et al.*, 2009; Lamberti, *et al.*, (Rojas 2006; Moreno G *et al.*,2012).

b) Técnicas Indirectas: La detección de respuesta inmunológica (humoral o celular) en el huésped representa una evidencia concreta del contacto con el parásito. las técnicas desarrolladas con la finalidad de detectar esta respuesta son las técnicas indirectas de diagnóstico entre las que destacan la microinmuno difusión doble (MIDD) o técnica de Ouchterlony, esta técnica detecta Ac circulantes que identifican a los Ag del parásito, cuando difunden los Ag y los Ac, ambos sistemas se encuentran y se forma en la zona de equivalencia el complejo Ag-Ac correspondiente, que se hace visible en forma de una línea de precipitación, la técnica posee sensibilidad del 91.0% y es específica; el límite de detección es del orden de los miligramos (mg) de proteína (Labarrere, *et al.*, 2010). Ensayos de ELISA por sus siglas en inglés (Enzyme Lynked Immuno Sorbent Assay) mediante el uso de Ag secretados por el esticosoma de LI de *T. spiralis*, que consisten en un grupo de glicoproteínas estructuralmente relacionadas con pesos moleculares de 45-55 kDa (OIE, 2004), la sensibilidad y especificidad, dependen en gran parte de la calidad del Ag utilizado en la prueba (Soad, *et al.*, 2010) y Western Blot (WB) considerada como prueba de alta sensibilidad y especificidad (100%) y técnica de diagnóstico diferencial (Chávez, *et al.*, 2006; Robert, *et al.*, 1996; Aguilar, *et al.*, 2000), detecta concentraciones del orden de los pico gramos (pg) de proteína, además, es una prueba

---

diagnóstica de especificidad molecular (interacción epítoto-paratoto) que proporciona el perfil del Ag.

### **6.7 Respuesta Inmune del Hospedador**

Para los parásitos helmintos como es el caso de *T. spiralis*, se presenta una respuesta innata a través de distintos mecanismos uno de estos mecanismos es al activar la vía alternativa del complemento ya que células como macrófagos y neutrófilos pueden secretar compuestos sobre la parte superficial del parásito, también los mastocitos y principalmente los eosinófilos son las células que actúan para eliminar y por lo tanto destruir al parásito (Doménech A., *et al*, 1998). La respuesta inmune generada depende del estadio del parásito en el ciclo vital el cual se presenta en tres fases que son la fase intestinal donde el parásito es LI y va sufriendo una serie de mudas hasta llegar al intestino donde se da la diferenciación sexual del parásito, la fase sistémica donde el parásito se presenta como LRN, hasta llegar a la fase muscular donde inicia como LRN hasta que llega nuevamente a LI dentro de su nicho de colágeno es así pues que la respuesta inmune en la fase intestinal es de tipo celular y se manifiesta por la inflamación que se genera cuando la LI penetran las células epiteliales del intestino, también se liberan interleucinas y citocinas de tipo 2, las cuales promueven una respuesta innata, las interleucinas (IL) de tipo 3, 4 y 5 regulan la inflamación y favorecen la infiltración de mastocitos, eosinófilos, así como el aumento de histamina y leucotrienos los cuales afectan la mucosa intestinal, (Moreno *et al* 2003) (Takahashi Y, *et al* 1992) para la fase sistémica al paso a la fase muscular se da la presencia de anticuerpos contra antígenos de superficie, los anticuerpos producidos median una acción citotóxica, la presencia del parásito en las fibras musculares estimula una respuesta

---

de tipo inflamatoria, la cual es insuficiente para combatir y eliminar al parásito, sin embargo se caracteriza también por una respuesta tipo Th2 la cual favorece la producción de IL 5, 10, 13 así como interferón  $\gamma$ , ya enquistada en músculo el infiltrado celular que se presenta alrededor de la capsula de colágena lo constituyen principalmente macrófagos y células T CD4<sup>+</sup>, en menor cantidad células T CD8<sup>+</sup> así como algunos linfocitos B. En la respuesta humoral del huésped se detectan anticuerpos de los isotipos IgA, IgM, IgG (De la Rosa y Correa 1997; Fabre M. et al, 2009; Bruschi F. y Chiumiento L. 2011).

### **6.8 Vacunas y Antígenos de *T. spiralis*.**

Las proteínas son probablemente las principales moléculas que se han evaluado como inmunógenos, debido a su alta inmunogenicidad, a que ha sido posible caracterizar a varias de estas y a que es factible su producción a gran escala.

Lo anterior es importante ya que uno de los objetivos es comercializarlas y desde el punto de vista biológico el interferir con su función puede conducir a la eliminación del parásito. Así mismo se han empleado los glicanos o glicoproteínas como vacunas, en general estas moléculas inducen la producción de anticuerpos que pueden participar en la protección del hospedero contra la infección.

A partir de los años 90's, se han publicado más de 100 intentos con 80 diferentes antígenos recombinantes para 22 especies de helmintos (Geldhof et al., 2007). Sin embargo varios de estas proteínas han fallado principalmente debido a que los sistemas de expresión no han sido los apropiados lo que evita la adecuada presentación de estos antígenos al sistema inmune del hospedero (Smith y Zarlenga, 2006).

---

Existen dos tipos de Ag asociados a *T. spiralis*, los productos solubles de secreción, excreción (S/E) y los productos de superficie externa o dentro del parásito Ag somático, ambos Ag al ser expuestos, inducen una respuesta inmune en el huésped infectado, denominándose Ag naturales, hacen referencia a la necesidad de generar estos antígenos como proteínas recombinantes sin embargo mencionan el problema latente sobre la falta de estimulación en la respuesta de protección que se pretende inducir aunado al riesgo de desarrollo de resistencia (Munn, 1997, Newton and Munn, 1999).

Es por lo tanto que la respuesta inmune del hospedador contra el parásito se dirige a las distintas etapas del ciclo de vida (Appleton 2001). En 1989 fue presentada la patente que registra la vacuna contra Trichinellosis porcina, como adyuvante se utilizó el adyuvante completo de Freud y el extracto soluble e insoluble de LRN, ambos extractos fueron aplicados por vía intraperitoneal en tres dosis cada uno de los extractos, indica el autor una efectividad mayor al 60%, sin embargo el adyuvante utilizado tiene el inconveniente de ser irritante y el protocolo de inmunización indica una aplicación cada semana por tres semanas mostrando disminución de la carga parasitaria después de haber infectado a los cerdos con 2000 LI de *T. spiralis* (Murell *et al.* 1989).

Despommier *et al.*, 1990 fue uno de los primeros que caracterizó los antígenos de *T. spiralis* en modelos murinos con pesos moleculares que se encuentran desde 32 a 109 kDa los cuales son productos de secreción y excreción del esticosoma, los principales son 37, 43, 48, 50/55 y de 45 kDa. También describen los antígenos de secreción excreción de la larva muscular y como se asocian a el grupo terminal de tivelosa (Mc Vay *et al.*, 1998).

---

Gamble en 1985 identifica productos de excreción-secreción provenientes de larvas musculares usando anticuerpos monoclonales con peso molecular de 49 y 53 kDa obtenidos por cromatografía de afinidad, el modelo utilizado fueron ratones los cuales fueron inmunizados con los antígenos, los cuales inducen una respuesta inmune que provoca la reducción de carga parasitaria ya que al realizar la infección experimental de los ratones inmunizados se observó una expulsión acelerada de gusanos adultos en intestino, afectando de manera directa a los parásitos hembras y por consecuencia reduciendo la carga parasitaria en músculo (Gamble 1985).

También según el estadio del parásito se han caracterizado distintos tipos de antígenos, esta caracterización es de acuerdo con la reacción antígeno-anticuerpo presente en los diferentes modelos experimentales como en el murino, conejo, hámster y cobayo, el antígeno de 43 kDa así como los que se encuentra en el rango de 45-50 kDa son específicos de la LI que es el estadio infeccioso de *T. spiralis*, se han identificado también otros antígenos teniendo pesos moleculares de 23, 32, 37, 43, 45, 48, 50, 55, 67, y 90 kDa. (Despommier *et al.*, 1990, Wakelin, 1996, Muñoz *et al.*, 2007). Del Río *et al.* 1986, purificaron 6 antígenos los cuales tienen pesos moleculares de 68, 59, 48, 45, 33 y 28 kDa, los que provienen del extracto soluble total obtenido de ratas de la cepa Sprague-Dawley, las cuales fueron infectadas vía oral con carne infectada que contenía LI de *T. spiralis*, los antígenos fueron identificados por la técnica de inmunoelectrotransferencia.

El ciclo de vida de *T. spiralis* es novedoso ya que es completado en su totalidad en hábitats intracelulares esto ha motivado a dilucidar los mecanismos del parasitismo, las investigaciones enfocadas a la inmunidad han mostrado la influencia de los compuestos N-glicanos en las respuestas a las LI de *T. spiralis* específicamente mencionan que en la fase

---

intestinal de la infección por *T. spiralis* se presenta una respuesta específica para los antígenos de fosforilcolina y que estos antígenos se encuentran en estructuras internas de la Larva como parte interna de la cutícula, epidermis y glándula intestinal, (Appleton y Romaris., 2001).

En el 2002 Goyal y cols., utilizaron un carbohidrato llamado tivelosa, el cual fue comparado con el uso de antígenos de *T. spiralis* en un modelo murino, la inmunización con Tivelosa-BSA no tuvo efecto significativo sobre la polarización de células T y sobre la disminución de número de larvas y fecundidad, con lo cual los autores sugieren que la tivelosa por sí sola no tiene efecto protector.

Yepez-Mulia L., *et al*, en 2007 describen los antígenos TSL-1 que proceden del esticosoma de LI de *T. spiralis* y que se encuentran tanto en productos de E/S como en la superficie de la cutícula del parásito, los anticuerpos anti-TSL-1 reconocen antígenos del rango de 40 a 70 kDa.

Los antígenos de *T. spiralis* son reconocidos por anticuerpos de tipo IgG del hospedero, estos reaccionan con el esticosoma, los anticuerpos de tipo IgM reaccionan con la cutícula del parásito mientras que los anticuerpos de tipo IgA reaccionan con antígenos de la superficie corporal de la larva, con pesos moleculares que oscilan entre 96, 67, 63, 55, 47 y 43 kDa (Moreno *et al.*, 1996). En la superficie del esticosoma de la LI de *T. spiralis*, se han determinado la presencia de glicoproteínas con pesos moleculares de 47 y 55 kDa ambas forman homo dímeros, para la posterior formación de moléculas de 90 y 105 kDa, respectivamente (Yépez and Ortega, 1994, Mc Vay *et al.*, 1998, Despommier and Muller, 1970).

---

Reveles y colaboradores indican que la inmunoterapia con AST de *T. spiralis* induce protección ya que se demuestra la disminución de carga parasitaria esto en modelo experimental murino y además describen que el antígeno de superficie se localiza en la cutícula de la LI y en cavidad celómica esto demostrado por la técnica de inmunofluorescencia indirecta y por inmunoelectrotransferencia (Reveles *et al.*, 2000). Por otro lado se ha utilizado también el AST y el antígeno de 45kD de *T. spiralis* obteniendo un efecto protector de mayor significancia con este último ya que reportan alteración de la célula nodriza que rodea al parásito así como también la ausencia del parásito (Maldonado *et al.* 2007).

También se han utilizado péptidos sintéticos y el primer reporte lo da Robinson y colaboradores utilizando una glicoproteína de 43kDa mostrando eficacia como vacuna ya que se demostró la disminución de la carga parasitaria (Robinson *et al.* 1995). También se ha propuesto el uso de vacunas de DNA como en el modelo en ratón, el uso de la vacuna de DNA (PcDNA3-TspE1) que codifica para un antígeno de *T. spiralis* de 31 kDa el cual tiene similitud del 98% a la secuencia del antígeno 45-50 kDa aislado de la LI de *T. spiralis*, esta vacuna indujo una respuesta celular que produjo una protección parcial contra el reto a la infección con la LI de *T. spiralis*, con una reducción del 37.67% en los parásitos adultos (Wang *et al.*, 2006).

En este mismo contexto, un estudio realizado sobre el uso de una vacuna oral a base de DNA denominada TS87 en ratones infectados con *T. spiralis* provocó tanto una respuesta local significativa de IgA como una sistémica con perfil Th1 mediada por INF- $\gamma$  y perfil Th2 mediada por IL-5, IL-6 e IL-10. Lo anterior se correlacionó con la reducción en un 29.8% de parásitos adultos y un 34.2% de LI después del reto con *T. spiralis* (Yang *et al.*,

---

2010). La clonación de la paramiosina de *T. spiralis* (TsPmy) y su empleo junto con el adyuvante completo de Freund's en la vacunación de ratones BALB/c que posteriormente fueron infectados con *T. spiralis*, en estos estudios se observó la producción de anticuerpos específicos de isotipo IgG, así como una respuesta inmune Th1/Th2 concomitante con una reducción de 36.2% en LI de *T. spiralis* (Yang *et al.*, 2008). Se han reportado también la producción de anticuerpos contra esta proteína de 43 kDa que se localizó en núcleo y citoplasma de células de músculo infectadas. Las glicoproteínas 43 – 53 y 45 kDa que forman parte de los antígenos de *T. spiralis* contienen epitopes de tivelosa, estos antígenos son reconocidos preferencialmente por el hospedero durante la infección, lo cual los hace muy útiles en el inmunodiagnostico de Trichinellosis.

Recientemente, estas glicoproteínas han sido bien caracterizadas a nivel molecular y han mostrado que estas proteínas son importantes para la transformación de la célula muscular, la formación de la capsula y continuación de parasitismo debido a *Trichinella spp* (Nagano *et al.*, 2009).

Es importante destacar que la mayoría de los estudios se han centrado en la antigenicidad / inmunogenicidad de las LI de *T. spiralis* y antígenos específicos de LI, ya que los antígenos de las LI se sugiere que tienen un papel funcional en el parasitismo y se liberan dos veces: cuando las LI son ingeridas en el intestino y de nueva cuenta cuando la LI se enquisto en las células musculares, estos antígenos han mostrado su participación en la inducción de respuestas inmunes clave que muestran tener un efecto protector al hospedero infectado por *T. spiralis* (Appleton *et al.*, 1991., Bolás-Fernández and del Corral Bezara, 2006).

---

En 2013 Bien y colaboradores realizaron un estudio para identificar antígenos de *T. spiralis* que son reconocidos por anticuerpos del huésped, utilizaron extractos crudos y proteínas E-S de *T. spiralis* por medio de inmunotransferencia con antisueros derivados de cerdos infectados experimentalmente con 200 o 20,000 LI de *T. spiralis*, el objetivo encontrar antígenos de *T. spiralis* con potencial de diagnóstico, el resultado demuestra que la totalidad de antisueros de *T. spiralis*, independientemente de la dosis infecciosa, reconoció proteínas comunes en cada etapa del ciclo vital reconociendo pesos moleculares de alrededor de 20-27 kDa en la fase intestinal de la infección, 41 kDa y 105 a 195 kDa en la fase de migración y en la fase muscular mostraron además que se presentan proteínas comunes que se detectaron en sueros a lo largo de la infección, la detección se da partir del quinto día después de la infección (dpi) a hasta los sesenta dpi. Estos resultados amplían el conocimiento de los componentes antigénicos específicos de *T. spiralis*. También muestran el hallazgo de componentes comunes entre todas las etapas del ciclo de vida de *T. spiralis* lo que pudiera ser de utilidad para la preparación de antígenos para uso diagnóstico, ya que estos antígenos son relevantes, independientemente de la fase de infección.

Castañeda reporta el uso de AST en cerdos con un esquema de inmunización e inmunoterapia, donde obtiene una mayor disminución de carga parasitaria a los animales tratados por inmunización con AST, reporta que la respuesta inmune de Ac, se detecta a la cuarta semana pi, por MIDD y desde la segunda por IET y por esta técnica reporta un patrón de bandeado de 14 a 97 kDa presentándose con mayor nitidez en el caso de la inmunoterapia, por IFI reporta fluorescencia a nivel del esticosoma aparentemente marcado en la zona que corresponde a los esticositos  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ . (Castañeda 2010).

---

## 7. MATERIAL Y MÉTODO

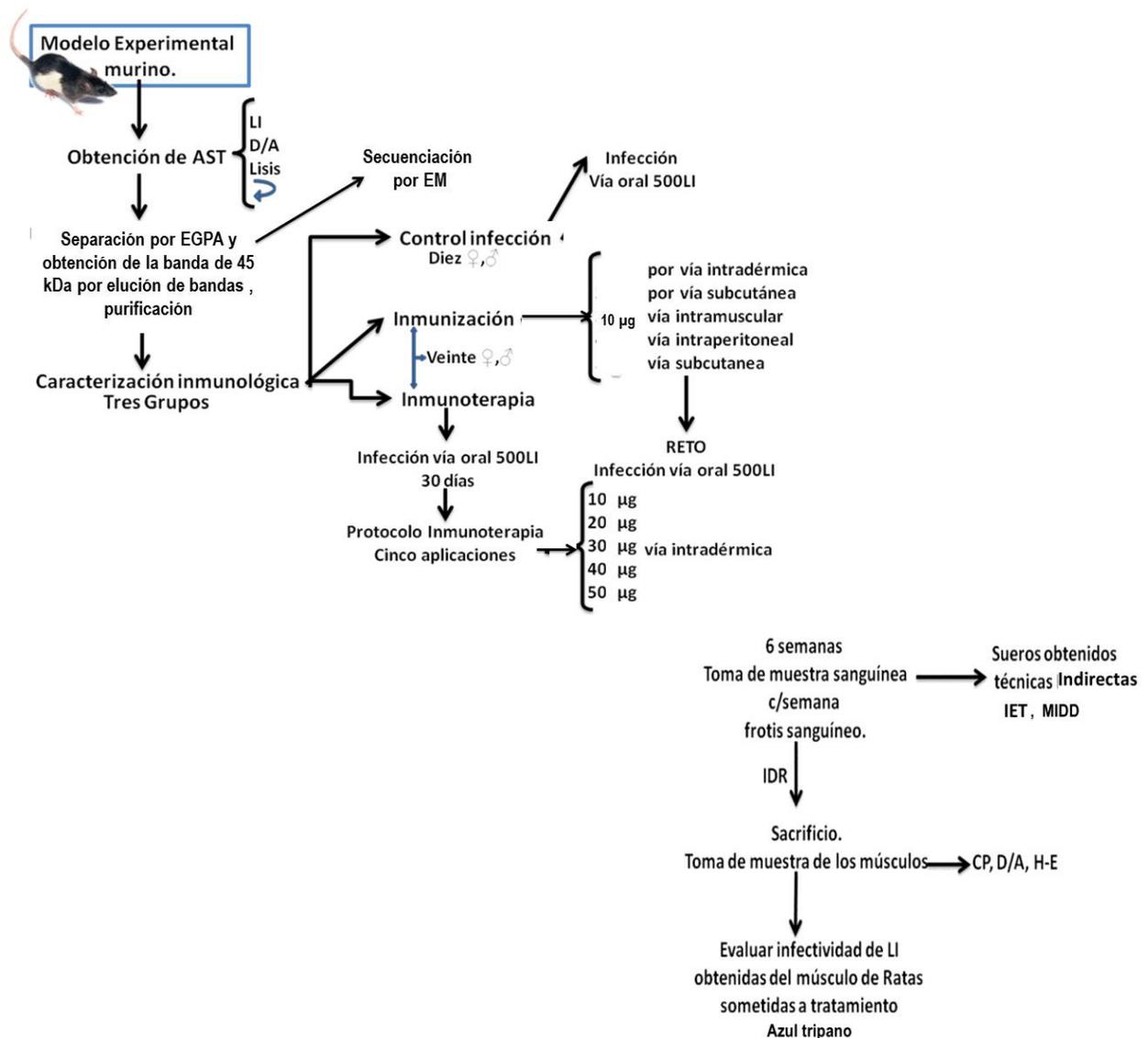
### 7.1 Material Biológico

1. Se utilizaron ratas de la cepa Long Evans de 2.5 meses de edad proporcionadas por el Bioterio de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

2. Se utilizó la cepa de *Trichinella spiralis* conservada en modelos experimentales la cual tiene origen del primer brote reportado en la comunidad de Laguna del Carretero Villa Nueva Zacatecas.

## 7.2 Diseño Experimental.

Se utilizaron ratas cepa Long Evans se obtuvo AST Por técnicas Directas, se realizó EGPA para separar proteínas por PM, las ratas fueron divididas en 4 grupos control sano, control infectado, grupo de inmunización y grupo de inmunoterapia, durante el tratamiento se obtuvo muestra de sangre y posteriormente se aplicaron técnicas indirectas, la proteína de 45 kDa fue separada del gel por elución de bandas para posteriormente analizarla por espectrometría de masas.



---

### 7.3 Del modelo experimental utilizado

Para este estudio se utilizaron Ratas con una edad aproximada de dos meses y medio de edad de la cepa Long Evans tanto hembras como machos.

Los animales se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura y luz, con acceso libre a alimento y agua dentro del bioterio de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas, las ratas fueron divididas en grupos los cuales fueron: control sano, control infectado, grupo de inmunización (InZ) y grupo de Inmunoterapia (InT) cada grupo para hembras y machos. Estos animales fueron tratados bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 que indica las Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

### 7.4 Técnicas empleadas:

#### A. Para obtener los inmunógenos.

Obtención de AST: El AST se obtuvo de la siguiente forma: Se obtuvieron LI a través de la digestión artificial, el proceso se llevó a cabo a 37° C por 24 horas según el método descrito por Del Río y colaboradores en 1986 con algunas modificaciones, las cuales consistieron en que se colocaron 60 g de tejido infectado triturado con un procesador de alimentos, la mezcla obtenida se colocó en un tamiz de tul, en forma de saco; suspendido en una solución al 0.03 % de pepsina (10,000 U) y HCl al 37 % (0.2M) en un litro de agua destilada en un embudo de separación; transcurridas las 24 horas se procedió a separar las LI las cuales se depositaron en el fondo del embudo de separación, se sometieron a tres lavados con solución Buffer de fosfatos (PBS), se aisló

---

el paquete larvario precipitado al fondo del tubo cónico, se adicionó nitrógeno líquido e inhibidor de proteasas y se trituraron por acción mecánica en condiciones en frío. Una vez rotas las LI se centrifugaron, el sobrenadante que se obtuvo contenía el AST de *T. spiralis*. (Muñoz *et al.*, 2007).

Determinación de proteína: Se determinó la concentración de proteínas del AST. Para ello, se realizó una curva estándar usando albúmina sérica bovina (ASB), según la metodología de Bradford, 1976. Ajustando la concentración de proteínas obtenidas a una densidad óptica de 595 nm mediante azul de Commassie al 0.06% preparado en HCl al 2.2%. Se interpoló el valor de la densidad óptica del Ag, a la de la curva estándar de albúmina, y así, se obtuvo la concentración de proteínas contenidas en el extracto antigénico. La medición se realizó con el lector de ELISA Imark Microplate Reader Bio-Rad ®.

### **B. Para obtener la proteína inmunogénica de 45kDa.**

Al AST se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida (EGPA), corrimiento que sirvió para separar las proteínas por peso molecular y preparación de la membrana de nitrocelulosa (NC) utilizada en la IET. Para ésta técnica, se usaron geles de 8x10 cm elaborados con SDS en condiciones reductoras a una concentración de 4.0% para el gel concentrador y al 11.0% para el gel separador, con una micropipeta se midieron 11.0 µl de AST/carril disueltos en buffer con una concentración equivalente de 30 µg de proteína. El buffer es una solución reductora que contenía Tris-HCl 1.0 M, pH 6.8, glicerol, DSS al 2.0%, azul de bromofenol al 0.5%, ácido etilendiaminotetraacético

---

(EDTA), H<sub>2</sub>O, ditioneitol 5 mili molar (Mm) y 2-β mercaptoetanol al 5.0%. La mezcla se calentó a baño María (47°C) durante cinco minutos y posteriormente se midieron los volúmenes para cada carril. El corrimiento electroforético se realizó en una cámara Protean II xi Cell Bio Rad ®, aplicando un voltaje de 50.0 volts (V) durante 30 minutos y 100 V por 90 minutos. Al término, se verificó el frente de corrimiento de la electroforesis para corroborar el desplazamiento y la cámara se apagó. Los geles fueron retirados, se procedió a teñir uno de los geles con azul de Coomassie G- 250 con el fin de visualizar los carriles de corrimiento y verificar la presencia de las bandas proteicas. Finalmente se secó en membranas de celofán. Los marcadores de peso molecular utilizados son provistos por el fabricante, 161-0362 Precision Protein Standards Bio-Rad ® con un rango de 250 a 10 kDa. (Laemmli *et al.*, 1970). Para separar la proteína de 45 kDa se separó del total del gel y por elución mecánica en frío mediante el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% se obtuvo la proteína en solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

### **C. Técnicas Directas.**

Técnica de compresión en placa (CP): Al sacrificio del modelo experimental (ratas Long Evans) se obtuvo la carne de los tejidos, se realizó una mezcla homogénea de los tejidos de diafragma, lengua, pierna, (también se observaron por separado cada uno de los tejidos) se observaron 0.5 g de la muestra, se colocaron en una laminilla de vidrio con otra laminilla se comprimieron, se observaron al microscopio de luz con objetivo x10 (Rossignol *et al.*, 2001). Verificando así la presencia o ausencia de LI en músculo estriado.

---

Técnica de digestión artificial (DA): El proceso se describió para la obtención del AST, variando la recolección de la LI obtenidas las que fueron observadas en el microscopio óptico de luz con los objetivos x10 y x40.

Azul tripano: Se tomó una muestra de tejido se embebió en el colorante el cual tenía una concentración al 2% por un periodo de 15 min. Al obtener los precipitados de DA se tomó una muestra de 50µl y se agregó el colorante por el mismo periodo de tiempo.

Tinción Hematoxilina–Eosina (H-E): Se tomaron muestras de pierna, lengua y diafragma de cada rata, controles y tratamiento. Se fijaron los tejidos en formol amortiguado al 10% por 24-48 horas. Posteriormente se pasaron a alcohol etílico al 70% para su procesamiento automático por aproximadamente 12 horas en dos pasos de OH al 70%, OH al 80%, OH al 96%, OH al 100% y xilol. De éste último paso se sacaron las muestras y se embebieron en parafina formando bloques de soporte para la realización de cortes histológicos de 5-8µm de espesor en un micrótomó Leica Modelo 820. Los cortes se colocaron en un baño de flotación a 50°C y se levantaron en un portaobjetos para dejarse secar, desparafinar por una hora en una estufa y pasar luego al proceso de tinción con la técnica Hematoxilina y Eosina según el criterio de Vilorio, 2000.

---

#### **D. Técnicas Indirectas.**

Frotis sanguíneo y Tinción Wright: Se toma muestra sanguínea de la rata a través del seno retro orbital dejando caer una gota de sangre en uno de los extremos de un porta objetos de vidrio limpio con ayuda de otro porta objetos se hace la extensión en dirección contraria a donde se colocó la gota de sangre con movimiento suave en una sola intención, se deja secar a temperatura ambiente y posteriormente se tiñe con colorante Wright en una bandeja para tinción donde se coloca el colorante por un periodo de 7 min teniendo en cuenta que la laminilla debe quedar impregnada de colorante sin que este se evapore y posteriormente se enjuaga con PBS por un periodo de 5 min, se lava la laminilla con agua potable se deja secar a temperatura ambiente para proceder a la observación en un microscopio óptico con el objetivo de inmersión (Rodak F. 2004)

Micro Inmuno Difusión Doble (MIDD): Se elaboró un gel de bactoagar al 1 % en solución Buffer de fosfatos (PBS) con 0.01 g de azida de sodio; se colocaron 4.0 ml de la solución líquida (50°C) sobre una laminilla de vidrio, una vez que solidificada, se procedió a formar una roseta, a una distancia de 0.5 cm. entre pozo y pozo, se colocó el AST en una cantidad de 10 µL (18 µg ) en el centro, en torno a éste los sueros problema, como control un suero positivo y un negativo, se dejó a temperatura ambiente en cámara húmeda de 24 a 48 horas hasta que se presentaron líneas de precipitación entre el suero control positivo y el antígeno (Ouchterlony O. 1958).

Inmunoelctrotransferencia (IET): El producto que se obtuvo del corrimiento en gel de Poliacrilamida se transfirió a papel de Nitro-Celulosa, de acuerdo a lo descrito por

---

Towbin (Towbin *et al.* 1979), se utilizó un buffer de transferencia que se preparó de la siguiente manera: 6.05 g de Tris 0.025 M, 28.8 g de Glicina 0.19M, 200 ml de metanol al 20% y agua destilada la necesaria para aforar a 1 litro. Se utilizó la cámara de Transblot- Cell (Bio-Rad®) a 35V, durante toda la noche a 4 °C. El papel de Nitrocelulosa (NC) se tiñó con fast green (verde rápido) por 5 min. Con agitación constante, se retiró el colorante y se decoloró para verificar la transferencia de las proteínas, se dejó secar y se cortaron las tiras del ancho aproximado de cada carril. Posteriormente, se procedió a cubrir cada tira con una solución de PBS- leche descremada al 3% y azida de sodio al 0.15% a 4°C, con agitación constante durante toda la noche. Transcurrido el tiempo se lavó tres veces por 10 min con PBS, se continuó con la incubación por 1.5 hrs. con los sueros problemas en una dilución de 1:100 en PBS- leche en polvo al 3% a temperatura ambiente con agitación constante; enseguida se lavaron dos ocasiones con PBS- Tween 20 al 0.3% por 10 min. y tres más con PBS por 10 min. Posteriormente se incubó con el segundo anticuerpo Anti- IgG, de murino, conjugado con peroxidasa 1: 2000 PBS- leche en polvo al 3% por una hora a temperatura ambiente, con agitación; después se lavaron dos veces con PBS- Tween 20 al 3% y se enjuagaron con PBS por 10 min. El patrón de Bando de cada tira se reveló con 3,3-Di-Amino Bencidina, 50 mg. en 100 ml de PBS, usando, como sustrato, peróxido de hidrógeno.

Intra-Dermo Reacción. (IDR): Se administraron 10µg del AST correspondiente en una parte visible del animal generalmente tomando como referencia la columna vertebral, posterior a la inoculación del inmunógeno correspondiente se observó la respuesta inmune generada en intervalos de tiempo comprendidos en 1, 24 y 48 hrs.

---

Secuenciación parcial por espectrometría de masas (EM): La espectrometría de masas se fundamenta en la separación de partículas moleculares o atómicas por su diferente masa.

El proceso de la espectrometría de masas comprende básicamente cuatro etapas:

- Ionización de la muestra.
- Aceleración de los iones por un campo eléctrico.
- Dispersión de los iones según su masa/carga.
- Detección de los iones y producción de la correspondiente señal eléctrica.

Para la muestra que se obtuvo de la electroforesis en gel de poliacrilamida y su posterior elución se procedió a eliminar contaminantes como sales duras y detergentes que pudieran interferir con el análisis el PBS, SDS así como el azul de Coomassie que contenía la muestra se eliminó utilizando filtros MILLIPORE Microcon (centrifugal Filter Devices) adicionando Bicarbonato de amonio ( $\text{NH}_4\text{CO}_3$ ) en cantidad suficiente, se centrifuga a 10,000 rpm (revoluciones por minuto) a 20 °C por 30 min repitiendo los ciclos hasta terminar la muestra, se recuperó la muestra adicionando 100µl de  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  se procedió a verificar a 280 nm la concentración de proteínas en el sistema nanoDrop adicionando en el lector 2µL de la muestra, se procedió a digerir la muestra tomando 100 µL de la , se adiciono 5 µL de ditioneitol (DTT) se incubo durante 1h a 65 °C en agitación lenta con el fin de reducir los puentes disulfuro presentes en la muestra, posteriormente se procedió a la alquilación de grupos sulfhidrilos se adiciono 4µL de Iodoacetamida se incubo 1h a T° (temperatura) ambiente en condiciones de oscuridad, para parar la reacción de alquilación se adiciona 20 µl de DTT. Para neutralizar la Iodoacetamida se incubo 45 min a T° ambiente, finalmente se procedió a la digestión con

---

tripsina, se tomó el liofilizado de tripsina el cual tenía una concentración de 20 µg se resuspendió con 20 µl de NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> de esta mezcla adicióno 10 µl a la muestra se agita en vortex a velocidad constante se incuba a 37°C en baño maría por 18 h posterior a esta incubación se agregó 5 µl de ácido trifluoroacetico (ATFA) se centrifuga a 10,000 rpm por 15 min a 20°C con esta muestra se recuperó la proteína limpia y se procedió a su re- verificación a 280 nm en el sistema nanoDrop, se procedió a la separación cromatográfica con el sistema nano UPLC marca Waters modelo nanoAccquity con una columna de fase reversa C18 300 micras x 150 mm, 2 micras y elución con un gradiente agua + 0.1% Ac fórmico/Acetonitrilo durante 125 minutos, la detección se realizó con un sistema de espectrometría de masas híbrido Cuadrupolo-tiempo de vuelo con resolución experimental aproximada de 10,000 y con interface electro Spray y con inyección de Glucofibrinopeptido como calibrador continuo a 100 fmol/ml, del cual se tomó la masa 785.8426 como referencia para el ajuste de exactitud de masas.

Cabe señalar que el control y adquisición de datos crudos se hizo con el software MassLynx vers 4.1, se procedió entonces al Procesamiento de datos. El cromatograma obtenido fue exportado al servidor para ser procesado con el software PLGS vers 2.4.

#### **E. Método estadístico a emplear.**

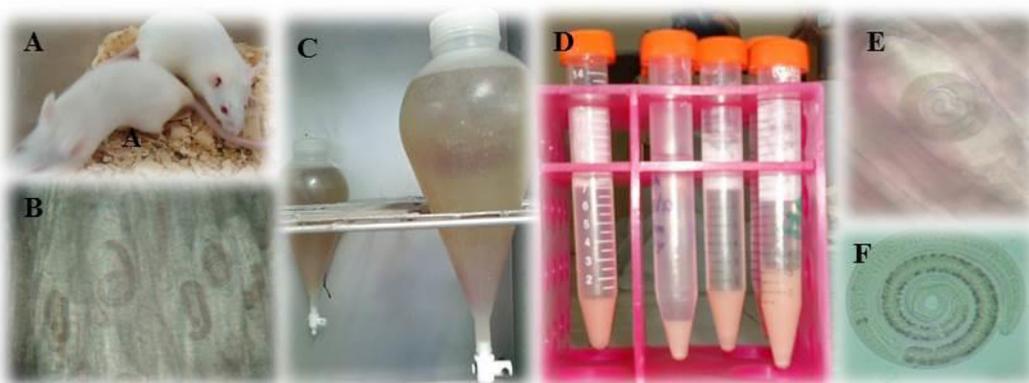
Análisis de varianza para la carga parasitaria obtenida en cada uno de los tratamientos, comparados con respecto al control infectado que se tomó como el 100% de infección, además de la eosinofilia presentada en los distintos tratamientos.

---

## 8. RESULTADOS

### 8.1 De la Obtención del AST

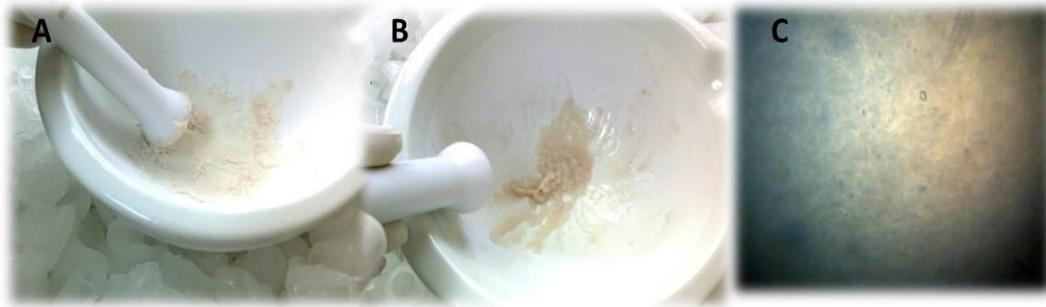
Por medio de la cepa de conserva que se tiene en el Bioterio de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas se proporcionó animales infectados con *T. spiralis* los cuales fueron sacrificados y el musculo obtenido sometido a la técnica digestión artificial con la que se obtuvieron LI viables de *T. spiralis*. Fig 1.



**Fig.1** En **A**). Se observan ratones cepa Balb/c de conserva infectados con LI de *T. spiralis*. **B**). LI de *T. spiralis* en músculo estriado de animales de conserva. **C**). Embudo de separación con líquido digestor de la técnica de Digestión Artificial. **D**) Tubos cónicos con LI obtenidas de la digestión artificial. **E**),**F**). LI de *T. spiralis* enquistadas en musculo estriado que fue sometido a DA, **F**). LI obtenida de Digestión Artificial donde se observan las características físicas viables del parásito.

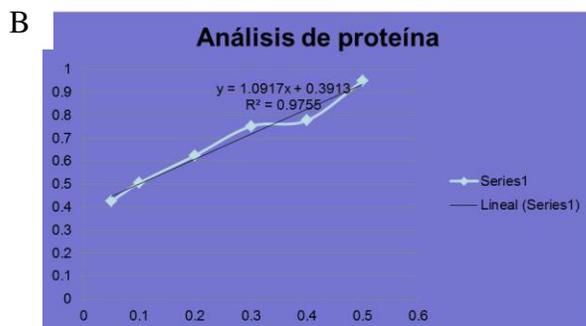
---

Después de obtener el paquete larvario se trituro mecánicamente agregando N<sub>2</sub> Líquido hasta observar la destrucción física del parasito esto se corroboró tomando una alícuota de la muestra y observándola en el microscopio óptico de luz con el objetivo x4 y posteriormente con el x10. Fig.2



**Fig. 2** Se observa en **A)**, **B)**. El concentrado de LI triturado en un mortero de porcelana después de añadir el nitrógeno líquido, en **C)**. Se observan las LI ya trituradas no se observan trazas de formas viables.

Al someterlo a centrifugación se separó el sobrenadante y se obtuvo la concentración de proteínas por medio de una curva patrón de albumina por el método Bradford la cual fue 1.1404 $\mu$ g/ $\mu$ L Fig.3.

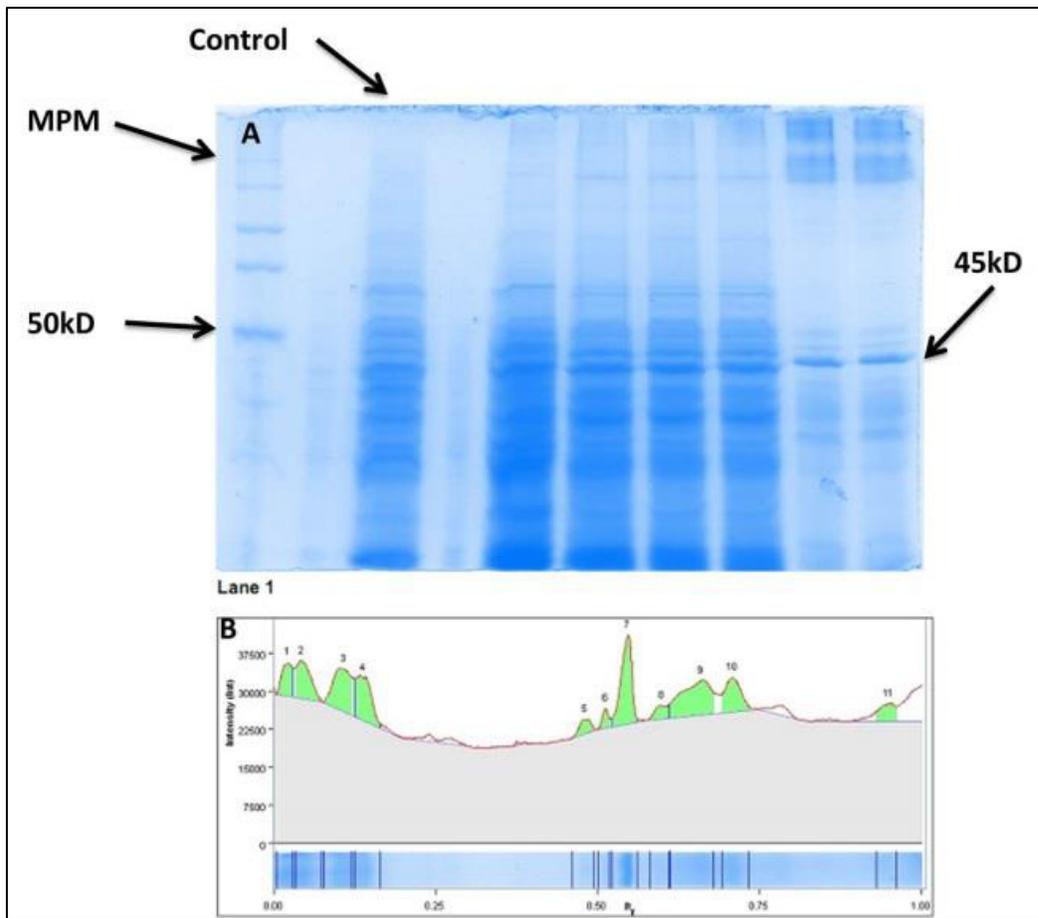


$$x = \frac{y - 0.3913}{1.0917} = \frac{(1.6380 - 0.3913)}{1.0917} = 1.1404$$

**Fig. 3** Se muestra el aparato iMARCK de Bio-Rad (A) donde se realizó la lectura de la microplaca para la determinación de proteínas (B), así como la curva con la corrección de regresión lineal para la determinación de la concentración del AST.

## 8.2 De la EGPA para la separación por peso molecular.

Se realizó la separación por peso molecular de los geles de poliacrilamida los cuales fueron analizados por densitometría con el Software Image Lab Versión 2.0.1 Bio-Rad<sup>®</sup> Laboratorios para verificar la presencia de la banda de interés que en este caso es la de 45kD la cual fue comparada también con el estándar de peso molecular 161-0362 Precision Protein Standars Bio-Rad<sup>®</sup>. Fig 4.



**Fig.4** A). Gel de poliacrilamida donde se muestra la separación por PM del AST. (MPM. Marcador de peso molecular), B). Análisis por densitometría de uno de los carriles obtenidos donde se identifica cada una de las bandas obtenidas de la separación.

---

## 8.3 Técnicas Directas

### 8.3.1 Para el grupo control sin infección

Las técnicas donde se verifica la presencia del parásito resultaron negativas para todos los casos, Fig 5.



**Fig.5** Se observa diafragma de rata por la técnica de compresión sin presencia del parásito *T. spiralis*, se pueden observar también la fibras musculares definidas (flechas), observado con el microscopio óptico de luz a x10 (aumento real 100X)

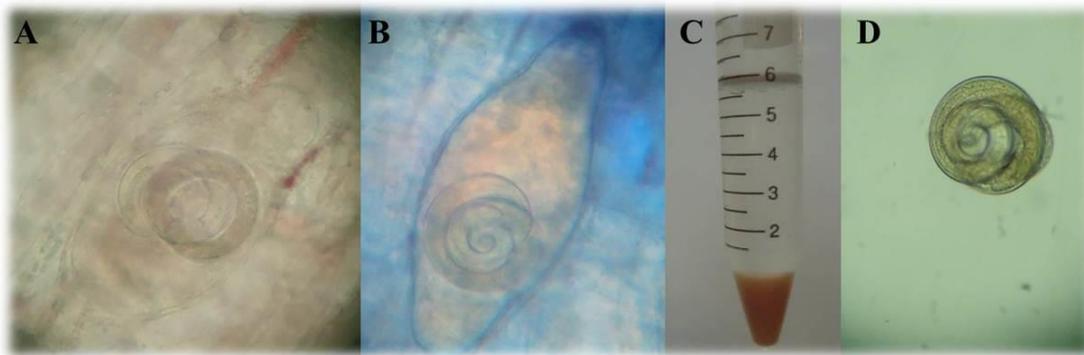
### 8.3.2 Resultados para el grupo control infectado

Las técnicas aplicadas fueron la compresión en placa que resulto positiva ya que se observaron LI de *T. spiralis* en el tejido, la técnica de azul tripano donde se observó viabilidad que resulto positiva ya que el parámetro que se tomó para determinar viabilidad

---

positiva fue el que el colorante permaneciera en la periferia de la célula nodriza de la LI, es decir que no penetrara al interior tanto de la célula nodriza como del parásito en sí.

También para determinar viabilidad por medio de la observación de las características físicas del parásito se observaron los paquetes larvarios obtenidos por DA la cual para este grupo resulto viabilidad positiva ya que se observa el color rosa característico de parásitos viables así como al observar una muestra en el microscopio óptico a x10 se observó al parásito en espiral, hidratado y sin modificaciones visibles a lo largo de la cutícula. Fig 6.

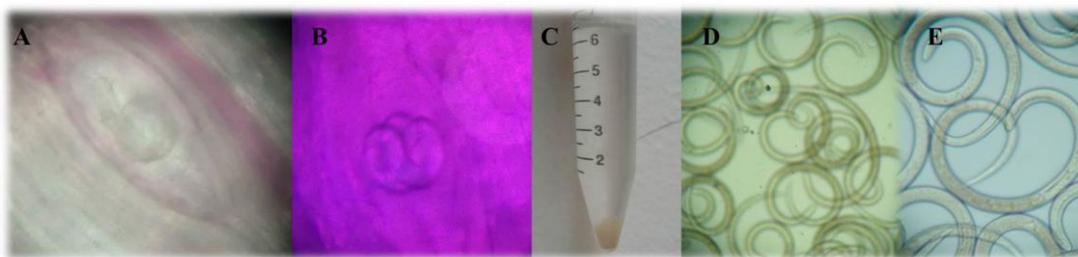


**Fig. 6.** **A.** Se muestra compresión en placa del tejido de rata donde se observa LI de *T. spiralis* dentro de la capsula de colágena bien definida y con características físicas aparentemente viables. **B.** resultado de la tinción de tejido con Azul tripano donde se observa que el colorante se concentró en la periferia de la capsula de colágena lo que permite afirmar que el parásito es viable. **C.** precipitado de LI obtenidas de digestión artificial donde observamos la coloración rosada del paquete. **D.** LI de *T. spiralis* obtenida de digestión artificial y observada en el microscopio óptico de luz a x10 observamos la espiral característica así como la continuidad de la cutícula.

---

### 8.3.3 Resultados de las técnicas directas del tratamiento de Inmunización

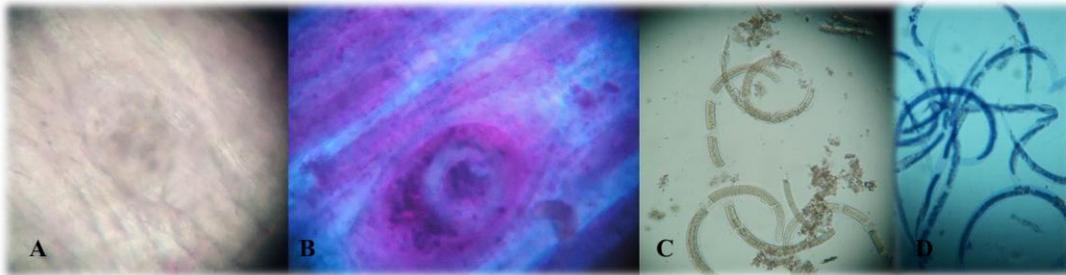
Con AST: Al sacrificio de los animales después del tratamiento de inmunización con AST, se recuperó el tejido el que se sometió a compresión en placa en la que se observó a la LI aparentemente sin ninguna modificación ya que la célula nodriza se observa intacta sin embargo al aplicar la tinción con Azul tripano se observó que el tejido se tiñó de manera uniforme, al observar la características físicas de paquete larvario obtenido por DA se observó de un color café claro al tomar una alícuota y observarla al microscopio óptico se observó que las LI no conservaban la espiral que caracteriza al parásito al aplicar a estas la tinción con azul tripano este no penetra a la LI y se concentró en la cutícula de este fig. 7.



**Fig.7** en **A)** LI de *T. spiralis* aparentemente viable de compresión en placa. **B)** LI teñida con Azul tripano donde se observa la distribución uniforme del colorante a lo largo del tejido. **C)** paquete larvario obtenido de DA en el que se observa un color café claro. **D)** LI obtenidas de DA donde se muestran modificaciones físicas como la pérdida de espiral en la LI. **E)** LI obtenidas de DA sometidas a tinción con azul tripano donde se puede observar acumulado en la cutícula del parásito sin penetrar al interior. Todas observadas con el microscopio óptico de luz a x10 (Aumento real 100X).

---

Imunización con proteína de 45 kDa: Después de la aplicación de la proteína de 45 kDa se sacrificaron los animales se recuperó tejido muscular, el cual se sometió a compresión en placa donde se observó modificaciones en la capsula de colágena así como degradación de la LI, al someter este tejido a tinción con Azul tripano se observa que el colorante penetra tanto a la célula nodriza como al parásito dentro de ella, se observan también ligeros acúmulos de células polimorfo-nucleares principalmente dentro de la capsula de colágena, al observar el precipitado obtenido de DA se observan LI no viables ya que se notan rotas y deshidratadas, al observar la muestra sometida a tinción por Azul tripano se observa una acumulación de colorante dentro de las LI lo que demuestra la no viabilidad de las LI de *T. spiralis* Fig. 8.

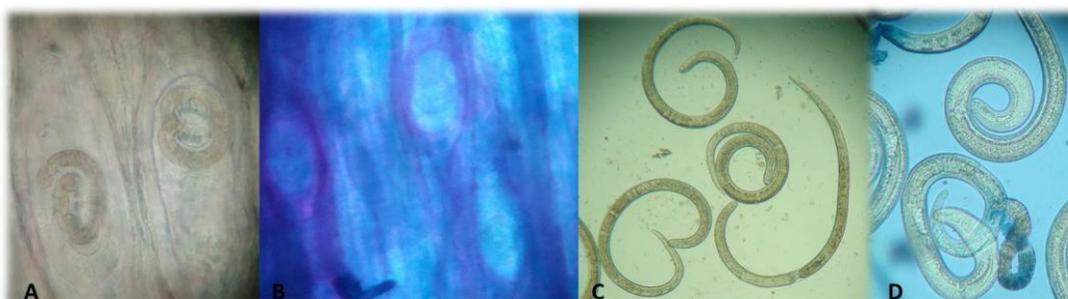


**Fig. 8.** Se observan las características morfológicas de LI por las técnicas de Compresión en placa, DA y Azul tripano. En **A**). Se observa LI en compresión en placa se observa que no hay continuidad en la cutícula, la célula nodriza se observa con bordes no lineales. **B**) se observa el colorante de manera uniforme tanto en el tejido como en la célula nodriza y dentro de esta, así como un aparente acumulo de polimorfonucleares rodeando a la LI principalmente a los extremos interiores de la célula Nodriza. **C**) se observa LI no viables producto de la DA. **D**). se aplicó la LI obtenidas de DA la tinción con Azul tripano donde se observó a las LI con el colorante en el interior del parásito lo que muestra la no viabilidad de las LI. Todas observadas con el microscopio óptico de luz a x10 (aumento real 100X).

---

### 8.3.4 Resultados de las técnicas directas del tratamiento de Inmunoterapia

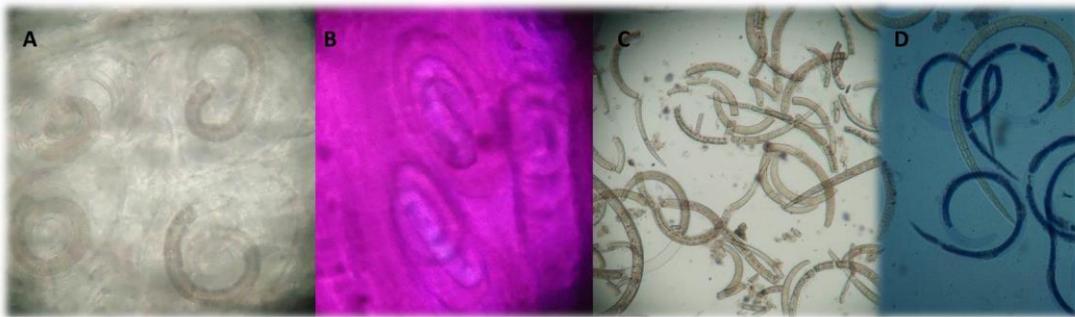
Inmunoterapia con AST: Después de la aplicación del protocolo de inmunoterapia el resultado de las técnicas directas de compresión en placa, DA y Azul tripano se muestran modificaciones en las características físicas del parásito entre estas la modificación de la célula nodriza, la pérdida de espiral, modificaciones en el color así como viabilidad ya que el colorante tiñó de manera uniforme tanto tejido como célula nodriza así como LI dentro de esta Fig. 9.



**Fig. 9.** En **A)** compresión en placa de tejido donde se observa LI de *T. spiralis* con modificaciones en la estructura y en la célula nodriza **B)** tejido teñido con Azul tripano y observado por compresión en placa donde se observan LI de *T. spiralis* tenidas en el interior lo que indica la no viabilidad de las LI. **C).** LI obtenidas de DA se observan parásitos con modificaciones en el contenido interno ya que se nota discontinuo. **D).** LI tenidas con Azul tripano se notal algunos abultamientos a los largo de la cuticula y colorante dentro de las LI principalmente a los extremos. Todas observadas al microscopio óptico a x10 (Aumento real 100X).

---

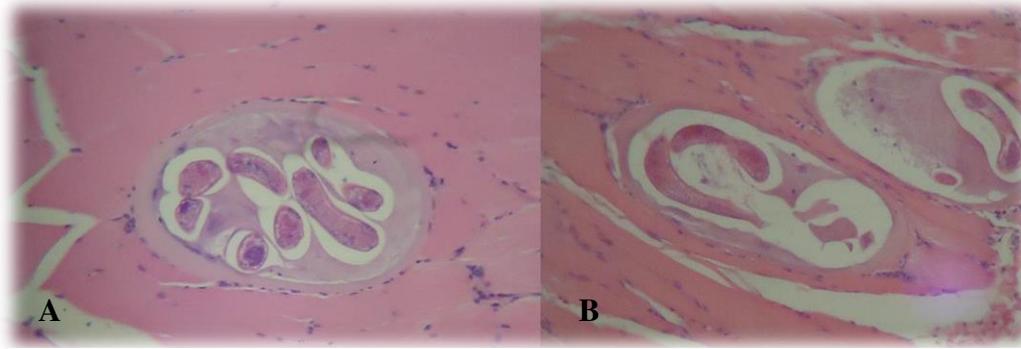
Inmunoterapia con la proteína antigénica de 45 kDa: Al procesar los tejidos por las técnicas directas al término del protocolo de inmunoterapia se observan LI sin célula nodriza, teñidas tanto tejido como LI con Azul tripano, al someter el tejido a DA se observan LI no viables, al observarlas después de aplicar el colorante azul tripano se observan con el colorante en el interior de la LI y se evidencian partes discontinuas de la cutícula fig. 10.



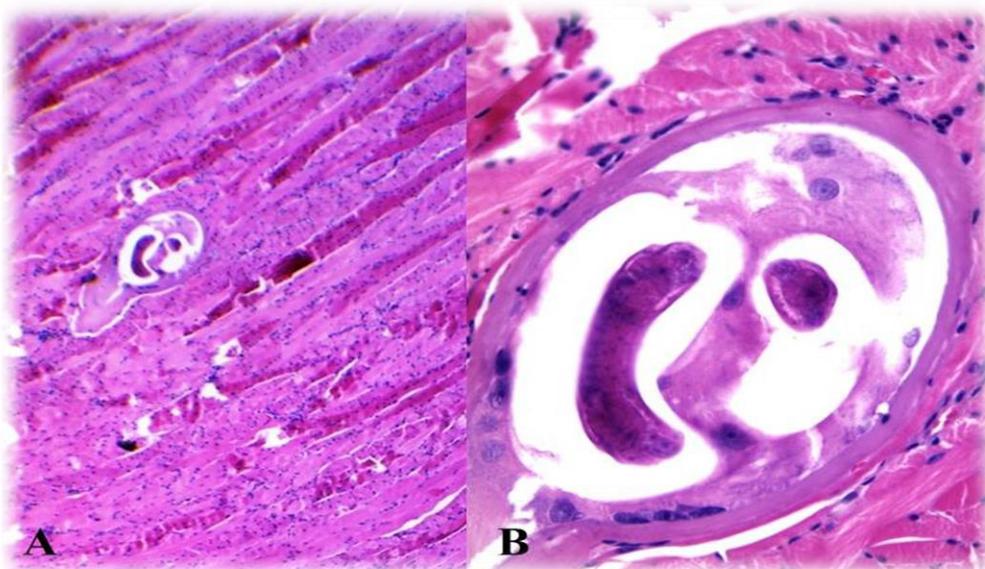
**Fig 10.** A) Compresión en placa donde se observan LI sin célula nodriza y no presentan la espiral característica del parásito, B). Tejido en compresión en placa teñido con azul tripano donde no se observa célula nodriza solo LI. C). LI no viables resultado de la DA. D). LI teñidas con Azul tripano donde se observa el interior de la LI teñido con el colorante. Todas observadas al microscopio óptico a x10. (aumento real 100X).

### 8.3.5 Resultado de la técnica de la tinción de tejido con Hematoxilina- Eosina.

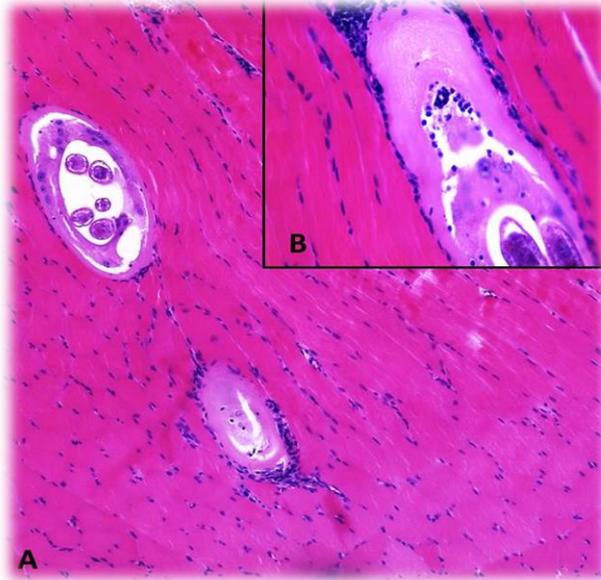
El resultado muestra principalmente mioisitis caracterizada por infiltrados celulares principalmente linfocitos y neutrófilos variando la presencia de estas células con el tratamiento aplicado, destacando en el caso de la inmunización con la proteína de 45 kDa la aparente destrucción de quistes e *T. spiralis*. Fig 11, 12.13.14.



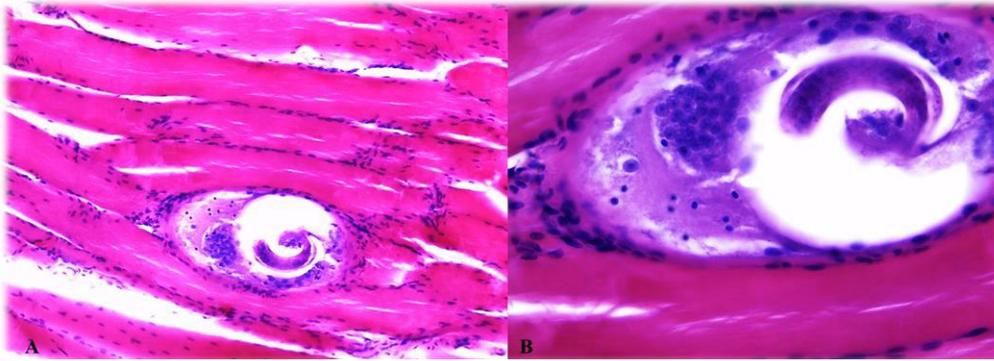
**Fig. 11.** Control infectado. En **A**). Se identifica célula nodriza de *T. spiralis* con poca infiltración celular aparentemente viables. **B**). Quiste de *T. spiralis* circundado por fibras musculares (Aumento real x10)



**Fig. 12.** Tratamiento de inmunoterapia con AST. En **A**). Se observa una línea de epitelio con queratina, por debajo musculo estriado, parcialmente hialinizado, distinguible esta por el color rosáceo pálido, que también tiene infiltrado mononuclear, se identifica una célula nodriza de *T. spiralis*. **B**). Célula nodriza de *T. spiralis* circundado por fibras musculares (Aumento real A x10, B x40)



**Fig. 13.** Tratamiento de inmunoterapia con proteína antigénica de 45 kDa. En A) se observan dos células nodrizas de *T. spiralis*, con infiltrado circundante inflamatorio. B) quiste de *T. spiralis* con infiltrado circundante, macrófagos internos e indicios de calcificación. A x10, B x40



**Fig. 15.** Tratamiento de Inmunización con AST, en A) se observa Miositis aguda e intersticial acompañada de infiltrado de polimorfo nucleares, degeneración hialina parcial, la célula nodriza de *T. spiralis* se observa con células multinucleadas internas. Observado a x10 con el microscopio óptico de luz **B)** Acercamiento del quiste de *T. spiralis* circundado por músculo hialinizado y con infiltrado de células polimorfonucleares. Observado a x40 con el microscopio óptico de luz.

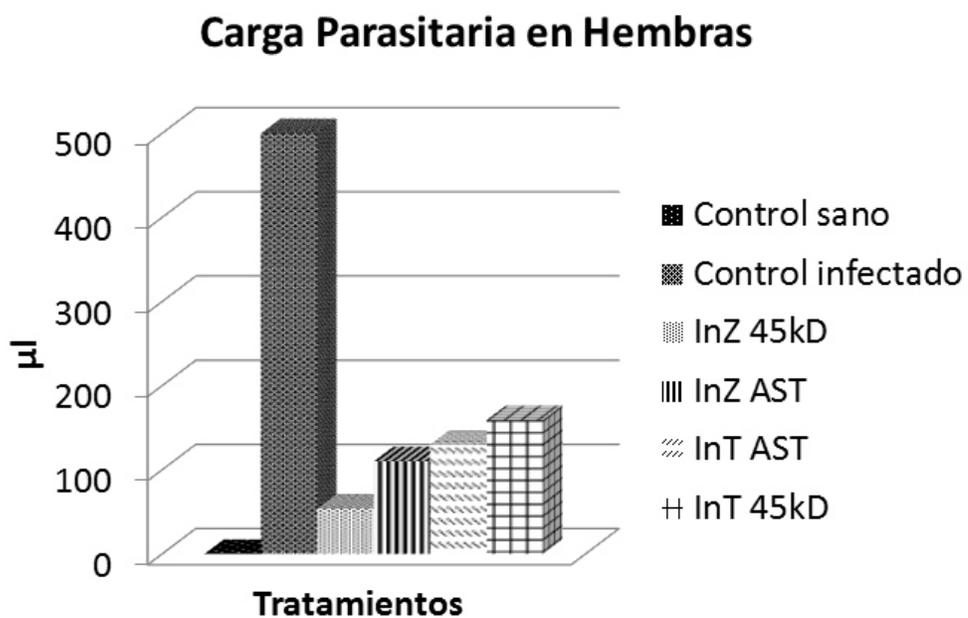
---

### **8.3.6 Resultado de la Digestión Artificial (DA)**

Se observa la disminución de la carga parasitaria con los distintos tratamientos siendo la Inmunización con la proteína antigénica de 45 kDa donde se presenta una mayor disminución de la carga parasitaria comparado con el control infectado, resultando las hembras con mayor disminución aun que se debe de tomar en cuenta que con respecto al control infectado presentaban una mayor carga parasitaria que los machos, los resultado se presentan en LI en 30 g de tejido que es la cantidad que se sometió a DA. Tabla II, III y Gráficas 1,2.

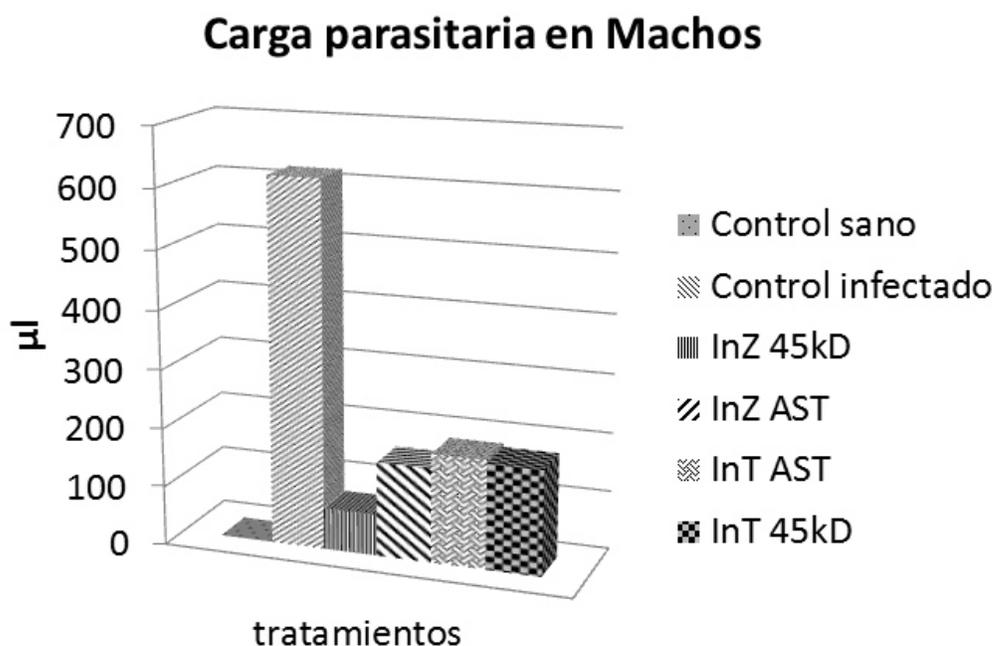
**Tabla II** Gráfica 1. De la Carga parasitaria en hembras.

| Hembras | Control sano | Control infectado | InZ 45kD | InZ AST | InT AST | InT 45kD |
|---------|--------------|-------------------|----------|---------|---------|----------|
| $\mu$ l | 0            | 500               | 54       | 110     | 130     | 159      |
| LI      | 0            | 12500             | 1350     | 2750    | 3250    | 3975     |
| %       | 0            | 100               | 10.8     | 22      | 26      | 31.8     |



**Tabla III** Gráfica 2. De la Carga parasitaria en Machos

| Machos | Control sano | Control infectado | InZ 45kD | InZ AST | InT AST | InT 45kD |
|--------|--------------|-------------------|----------|---------|---------|----------|
| μl     | 0            | 620               | 71       | 160     | 185     | 179      |
| LI     | 0            | 15500             | 1775     | 4000    | 4625    | 4475     |
| %      | 0            | 100               | 1.14     | 25.8    | 29.8    | 28.8     |



Al realizar el análisis de varianza para analizar si existe diferencia significativa entre cada tratamiento en los machos resulta un valor de la Razón de Varianza mayor que  $f$  crítica lo que indica que en los tratamientos existen diferencias significativas, siendo la inmunización con la proteína de 45 kD el de mayor significancia por la diferencia que muestra con respecto al control infectado, esto con un nivel de confianza del 95%. Los cálculos se incorporan en el anexo 1 de cálculos.

---

### 8.3.7 Resultado De la MIDD

En la micro-inmuno-difusión doble se analizaron todos los sueros de todos los tratamientos en la segunda, cuarta y sexta semana después de cada tratamiento, en todos los casos los sueros de animales a la segunda semana pos tratamiento en el caso de la inmunoterapia, y post infección en el caso de la inmunización resultaron negativos, no así a la cuarta semana donde se visualizaron líneas de precipitación características de la reacción Ag-Ac , el comportamiento tanto de hembras como machos fue similar, a la sexta semana también se visualizaron las líneas de precipitación características de la interacción Ag-Ac, solo que con el tratamiento de InZ con proteína de 45 kDa se presentaron sueros en los cuales la precipitación se dio 48 h después de procesada la técnica. Tabla IV, Fig. 16, 17.

**Tabla IV.**

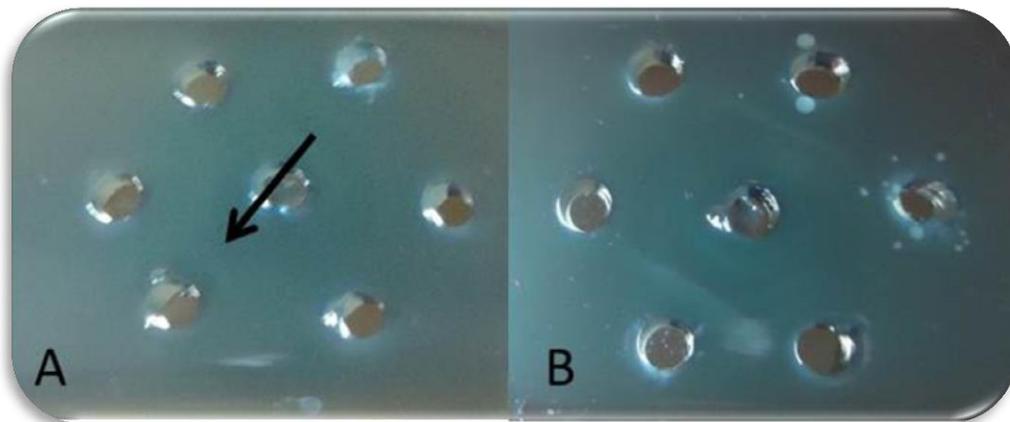
Donde se muestra el resultado de MIDD para los distintos tratamientos y tiempos de tomada la muestra de sangre.

| Tratamiento  | Tiempo en semanas |   |   |   |   |   |
|--------------|-------------------|---|---|---|---|---|
|              | 2                 |   | 4 |   | 6 |   |
|              | ♀                 | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ |
| Control sano | ☒                 | ☒ | ☒ | ☒ | ☒ | ☒ |
| Control Inf. | ☒                 | ☒ | ☑ | ☑ | ☑ | ☑ |
| InZ AST      | ☒                 | ☒ | ☑ | ☑ | ☑ | ☑ |
| InT AST      | ☒                 | ☒ | ☑ | ☑ | ☑ | ☑ |
| InZ45 kDa    | ☒                 | ☒ | ☑ | ☑ | ☑ | ☑ |
| InT45 kDa    | ☒                 | ☒ | ☑ | ☑ | ☑ | ☑ |

♀ Hembras, ♂ Machos, ☒ negativo a la presencia de bandas de precipitación, ☑ positivo a la presencia de bandas de precipitación Características de la interacción Ag-Ac de *T. spiralis*.



**Fig. 16.** MIDD de sueros de dos semanas posteriores a la infección del grupo de InZ con la proteína antigénica de 45 kDa donde se muestra la posición de los sueros problema los controles y el AST, no se observan líneas de precipitación que indiquen la interacción Ag-Ac, estas se observan solo entre el pocillo central y donde se colocó el control positivo (C+).



**Fig. 17** MIDD en A) 4 semanas pi de ratas tratadas por InZ con proteína antigénica de 45 kDa donde se pueden observar líneas de precipitación que indican la interacción Ag-Ac. B) 6 semanas pi de ratas tratadas por InZ con proteína antigénica de 45 kDa.

### 8.3.7 Resultado De la IDR.

Al finalizar los tratamientos se observó de forma cualitativa la triple reacción de Lewis con el fin de evaluar la respuesta celular, al aplicar AST de *T. spiralis* en la parte superior de la columna vertebral donde se observó la presencia de induración, eritema y temperatura a las 2, 24 y 48h posteriores a la aplicación del AST. Tabla V, VI. Fig. 18.

**Tabla V**

Resultados de la triple reacción de Lewis en hembras a los distintos tiempos de revisión.

Observación a las hembras después de la aplicación de AST.

| Tratamiento↓ | induración |      |      | eritema |      |      | temperatura |      |      |
|--------------|------------|------|------|---------|------|------|-------------|------|------|
|              | 2 h        | 24 h | 48 h | 2 h     | 24 h | 48 h | 2 h         | 24 h | 48 h |
| Control Inf. | 0.3        | 0.2  | 0.2  | ☑       | ☑    | ☒    | ☑           | ☑    | ☒    |
| InZ 45 kDa   | 0.2        | 0.5  | 0.3  | ☑       | ☑    | ☑    | ☑           | ☑    | ☑    |
| InT AST      | 0.3        | 0.5  | 0.3  | ☑       | ☑    | ☑    | ☑           | ☑    | ☒    |
| InZ AST      | 0.4        | 0.7  | 0.3  | ☑       | ☑    | ☑    | ☑           | ☑    | ☑    |
| InT 45 kDa   | 0.2        | 0.5  | 0.3  | ☑       | ☑    | ☑    | ☑           | ☑    | ☒    |

Induración en mm, ☑ se observa la característica, ☒ no se observa la característica.

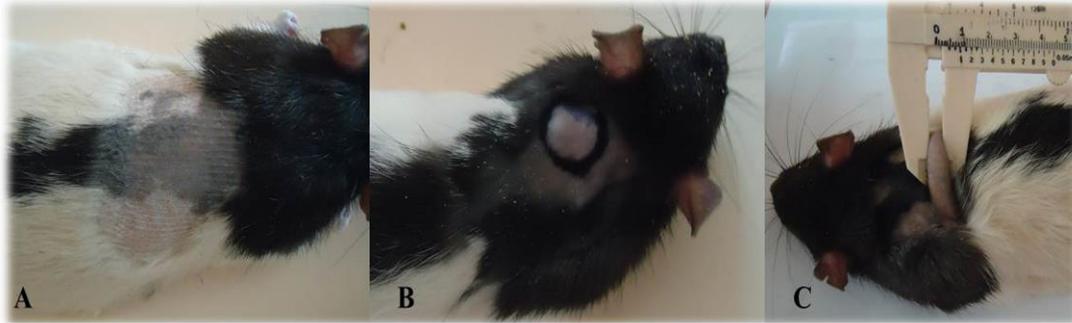
**Tabla VI**

Resultados de la triple reacción de Lewis en Machos a los distintos tiempos de revisión.

Observación a las Machos después de la aplicación de AST.

| Tratamiento↓ | induración |      |      | eritema |      |      | temperatura |      |      |
|--------------|------------|------|------|---------|------|------|-------------|------|------|
|              | 2 h        | 24 h | 48 h | 2 h     | 24 h | 48 h | 2 h         | 24 h | 48 h |
| Control Inf. | 0.4        | 0.2  | 0.2  | ☑       | ☑    | ☒    | ☑           | ☑    | ☒    |
| InZ 45 kDa   | 0.4        | 0.7  | 0.4  | ☑       | ☑    | ☑    | ☑           | ☑    | ☑    |
| InT AST      | 0.4        | 0.5  | 0.3  | ☑       | ☑    | ☑    | ☑           | ☑    | ☒    |
| InZ AST      | 0.5        | 0.6  | 0.3  | ☑       | ☑    | ☑    | ☑           | ☑    | ☒    |
| InT 45 kDa   | 0.4        | 0.5  | 0.3  | ☑       | ☑    | ☑    | ☑           | ☑    | ☒    |

Induración en mm, ☑ se observa la característica, ☒ no se observa la característica.



**Fig. 18.** Se muestra Rata Hembra del grupo control infectado en **A)** antes de la de la aplicación de AST, **B).** 2h después de la aplicación de AST se puede observar induración y ligero eritema, **C).** Medición 48 h después de la aplicación del AST.

### **8.3.8 Resultado De la Eosinofilia**

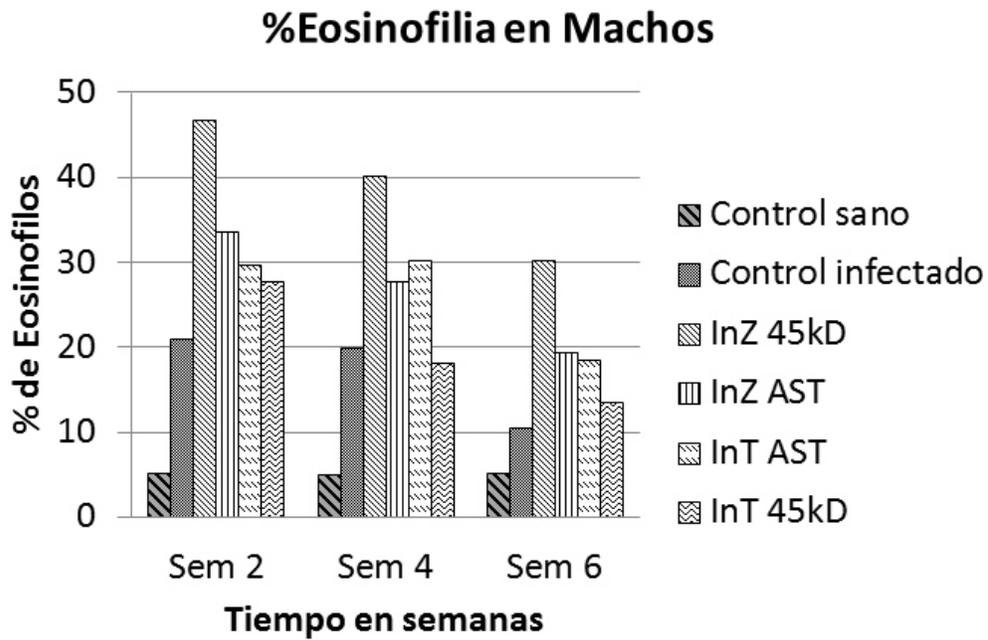
Se tomó muestras sanguínea posterior a la infección en todos los casos en la Tabla 4 y 5 se muestra el porcentaje de Eosinofilia observado después de la segunda semana pi presentándose en ambos casos una Eosinofilia exacerbada principalmente en el tratamiento de inmunización con la proteína de 45 kDa, la Eosinofilia se reporta el promedio total de cada grupo de tratamiento. Tabla VII, VIII, Gráficas 3,4.

**Tabla VII**

Resultado en % de Eosinofilia con los distintos Tratamientos en machos.

| Machos | Control sano | Control infectado | InZ 45kD | InZ AST | InT AST | InT 45kD |
|--------|--------------|-------------------|----------|---------|---------|----------|
| Sem 2  | 5.2          | 21                | 46.8     | 33.6    | 29.8    | 27.8     |
| Sem 4  | 5            | 20                | 40.2     | 27.8    | 30.2    | 18.2     |
| Sem 6  | 5.2          | 10.6              | 30.2     | 19.4    | 18.6    | 13.6     |

**Gráfica 3.** % de Eosinofilia con los distintos Tratamientos en machos.

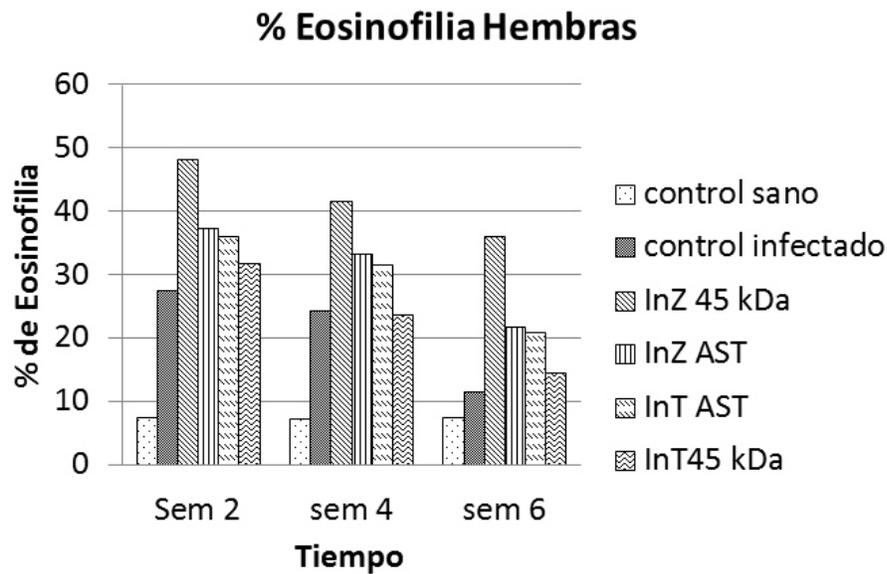


**Tabla VIII**

Resultado en % de Eosinofilia con los distintos tratamientos en hembras.

| Hembras | Control sano | Control infectado | InZ 45 kDa | InZ AST | InT AST | InT45 kDa |
|---------|--------------|-------------------|------------|---------|---------|-----------|
| Sem 2   | 7.5          | 27.6              | 48.2       | 37.4    | 36.2    | 31.8      |
| Sem 4   | 7.2          | 24.4              | 41.6       | 33.4    | 31.6    | 23.8      |
| Sem 6   | 7.6          | 11.6              | 36         | 21.8    | 21      | 14.6      |

**Gráfica 4.** % de Eosinofilia con los distintos tratamientos en hembras.



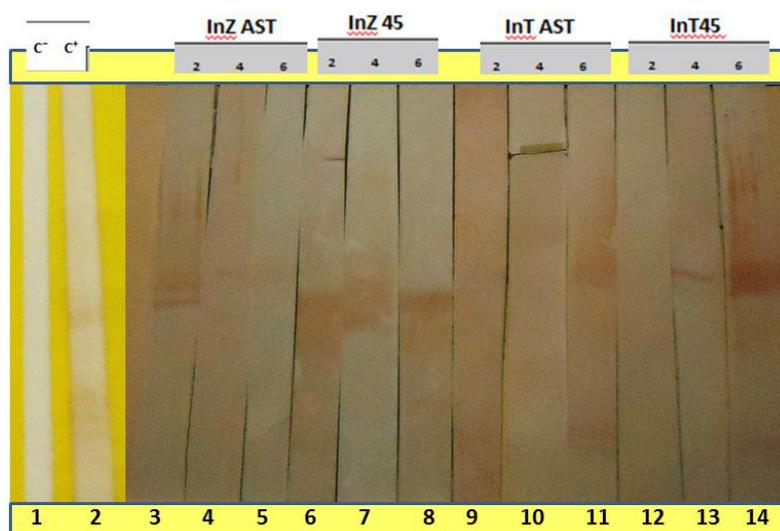
Al realizar un análisis de varianza para determinar diferencia entre dos a mas tratamientos en este caso de los datos obtenidos de Eosinofilia se muestra un valor de  $f$  de 4.48 con un nivel de confianza de 95% estos valores muestran que la diferencia entre el control infectado y los distintos tratamientos tanto InZ como InT así como con AST y con la Proteína de 45 kDa muestran diferencia significativa, mostrándose una mayor diferencia con el tratamiento de InZ con proteína de 45 kDa esto en el caso del tratamiento en ratas hembras

---

aunque cabe destacar que el comportamiento de las ratas machos es similar. Se anexa los cálculos realizados mediante fórmulas con el programa Excel Office 2010 en el anexo 1 se muestran los cálculos realizados.

### 8.3.9 Resultado de la Inmunoelctrotransferencia.

Todos los sueros de los diferentes tratamientos y a los tiempos 2, 4 y 6 semanas se sometieron a la técnica de inmunoelctrotransferencia y el patrón de bandeo nos muestra el reconocimiento de la banda de 45kDa, presentándose el reconocimiento apartir de la segunda semana pi en los grupos tratados por inmunoterapia con la proteína de 45 kDa.



(c+ control positivo, c- control negativo, InZ inmunización, InT inmunoterapia, [2,4,6 semanas pi])

**Fig. 19.** IET de los tratamientos, en los carriles 6, 7,8 se muestra el reconocimiento de la banda de 45 kDa desde la segunda semana de tratamiento del grupo de tratamiento de inmunización con la proteína de 45 kDa

---

### 8.3.10 Para la secuenciación de la proteína

Para obtener la secuencia se usó una base de datos general para verificar el funcionamiento del software ProteinLinx Global Server (PLGS), posteriormente se hizo con un nuevo método de proceso usando la base de datos específica de *Trichinella spiralis*, esta a su vez fue obtenida de la Universal Uniprot-SwissProt. A través de este análisis afirmamos que los péptidos identificados, tienen más del 95% de confiabilidad y masas exactas menores a 10ppm. Se realizó el procesamiento de datos del cromatograma obtenido este fue exportado al servidor para ser procesado con el software PLGS vers 2.4.

La secuencia total del antígeno obtenido fue:

|   |                          |                          |                          |                          |                          |
|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| MFSITLNLFI<br>NKLKLLKPL                 | IAFVNFQLCT               | CSTDNENVAM               | KEMTFSVPIS               | VLQNERQFDE               |                          |
| <b>70</b><br>GKLYKTPSDK<br>VQQAECDDT    | <b>80</b><br>GIPISRTEAT  | <b>90</b><br>LSVEKMMVEL  | <b>100</b><br>NRLIQKEYSF | <b>110</b><br>LYKQYQKLKT | <b>120</b>               |
| <b>130</b><br>TNVYTVTLQN<br>IIGAYCSVHL  | <b>140</b><br>TDCESKPIIE | <b>150</b><br>GSPATNCSDV | <b>160</b><br>ENKHPLSCSI | <b>170</b><br>LSKVASAEK  | <b>180</b>               |
| <b>190</b><br>EESFPKKSIS<br>SKHSNNYRGR  | <b>200</b><br>CKLSRYPGEE | <b>210</b><br>KFKTFVPEDV | <b>220</b><br>SSWFHDAIVY | <b>230</b><br>VPTGNRPQSN | <b>240</b>               |
| <b>250</b><br>QGIAGLGMLP                | <b>260</b><br>HLGAVQMNVV | <b>270</b><br>TIFRKNKTT  | <b>280</b><br>EVLSLINAND | <b>290</b><br>SIEIPKVFVT | <b>300</b><br>NPIQKPFQDE |
| <b>310</b><br>IDRILRKAFFD<br>TEVAGVFDEN | <b>320</b><br>TMELNSDKE  | <b>330</b><br>DKLQKLYNAT | <b>340</b><br>ISTKVKHRAT | <b>350</b><br>PYDTDDAYVI | <b>360</b>               |
| <b>370</b><br>KEHIGSIDKF                | <b>380</b><br>PSDGNLQIGW | <b>390</b><br>KEADKSALRL | <b>400</b><br>KRFKPPKGF  | <b>410</b><br>FQHVFSELQL | <b>LF</b>                |

Dentro de esta secuencia se encontró en la base de datos dos proteínas con secuencias semejantes a las que encontraron en la muestra procesada. En la Tabla IX se muestran las características de las proteínas.

**Tabla IX**

**Características de las proteínas encontradas**

| Características | Proteína 1   | Proteína 2   |
|-----------------|--|--|
| PM              | PM 45940   | PM 46607   |
| No. de péptidos | 31 péptidos  | 21 péptidos.   |
| Descripción     | Multi cystatin like domain protein OS <i>Trichinella spiralis</i> GN mcd 1 PE 2 SV 1 | 53kDa excretory secretory antigen OS <i>Trichinella spiralis</i> GN gp53 PE 2 SV 1 |

En el Anexo 2 se incluye el reporte total de proteínas contenidas en el AST de la cepa de *T. spiralis* conservada en el bioterio de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

---

## 9. DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran un evidente efecto protector mostrado en todos los casos de los tratamientos y los resultados obtenidos al analizar la carga parasitaria obtenida, el mejor efecto protector se da con el tratamiento de inmunización con la proteína de 45 kDa, ya que es el tratamiento donde resultó una mayor disminución de carga parasitaria, aunado a el daño celular que se identifica en los cortes histológicos, lo que concuerda con lo reportado por Maldonado *et. al* 2007 donde reporta la eliminación de parásitos en músculo, lo que se traduce en la disminución de la carga parasitaria, inhibición de la implantación del parásito y daño a la célula nodriza por el efecto del tratamiento de la inmunización con el aislado de 45 kDa esto en animales que se les denomina nutridos por la dieta con la que fueron alimentados durante el estudio y a los que se infectó con 200 LI de *T. spiralis*, se reporta un trabajo previo que es uno de los primeros reportes de inmunización con un antígeno parcialmente purificado procedente del esticosoma de LI de *T. spiralis* esto en tres ensayos la concentración a la que aplican es 500 µg de los componentes solubilizados ellos reportan que se inducen niveles moderados de resistencia al reto y reportan reducción de LI/g de peso analizado siendo esta de entre 43-55 % además indican una pobre y baja potencialización de la expulsión intestinal de los parásitos adultos, comparado con este resultado la disminución que reportamos con el tratamiento de inmunización con la proteína de 45 kDa nos indica una mayor disminución de carga parasitaria sumado a las modificaciones físicas que de los parásitos que se especifican en los resultados (Muller Kd., *et al.* 1984).

Ortega *et al* en 1984 también reportan el uso de la inmunización con antígeno obtenido de esticosomas el cual contenía proteínas con un peso molecular de 72, 65 52 y 47 kDa fueron

---

inoculados vía intraperitoneal y concluyen que se indujo protección contra la infección por *T. spiralis* esto fue valorado tanto por la reducción de carga parasitaria y por el número de parásitos adultos en intestino, lo que coincide con los resultados obtenidos puesto que en el experimento que llevamos a cabo se comprueba la disminución de carga parasitaria en los tratamientos de inmunización tanto con el AST como con la proteína de 45 kDa siendo con esta última con la que se obtiene mayor reducción de la carga parasitaria.

Wang en 2006 utiliza también la inmunización con una proteína clonada del gen T sp E1 realizan la inoculación en ratones BALB/c vía Intramuscular y siendo un antígeno de 31 kDa lo que produce reducción de carga parasitaria y la consecuente protección contra la infección por *T. spiralis*, esto concuerda con los resultados obtenidos. En cuanto a la inmunoterapia existen pocos estudios con respecto al tratamiento de parasitosis la mayoría están enfocados a enfermedades como el cáncer, uno de estos estudios es el reportado por Castañeda en 2010 donde realizan tratamiento de inmunoterapia con AST en modelos en cerdo y reportan efecto sobre la RI contra las LI de *T. spiralis*, también reportan el mejoramiento físico de los cerdos después de haber sido infectados, en cuanto al reconocimiento de anticuerpos reportan varios patrones que se encuentra en el rango de 97 a 30 kDa, otro estudio reportado es el realizado por Reveles y colaboradores donde en modelo murino aplican inmunoterapia a animales con LI de *T. spiralis* enquistadas en musculo después del tratamiento ellos reportan una disminución de la carga parasitaria lo que coincide con los resultados obtenidos en este trabajo tanto por la aplicación de AST como con la proteína de 45 kDa mostrando menor carga parasitaria con esta última, comprobado por la disminución de carga parasitaria, en cuanto a la secuenciación no se tienen reportes para la conformación proteica de la cepa nativa de Zacatecas realizado por espectrometría de masas, pero varias proteínas se aproximan a las reportadas en el banco de

---

datos Universal Uniprot-SwissProt. En cuanto a la utilización de antígenos se reporta el uso de varios la mayoría de excreción secreción y los autores reportan disminución mínima de la carga parasitaria, en nuestro caso utilizamos extracto crudo AST y la proteína separada de este mismo donde en uno y otro caso reportamos disminución de carga parasitaria y modificaciones físicas de la LI que indican la no viabilidad de ésta, así mismo reportamos la protección que confieren estos antígenos al hospedero por la eosinofilia aumentada que se presenta en los grupos de tratamientos que se refleja también en la disminución de la carga parasitaria. Las técnicas directas donde se obtuvieron LI con modificaciones en las características físicas indican que la respuesta contra el parásito está en proceso ya que se observa un acumulo de células polimorfonucleares en la periferia de la célula nodriza y dentro de esta, estos resultados concuerdan con los reportados por Reveles en 2001, Castañeda en 2010 así como por Maldonado en 2007. El reconocimiento de Anticuerpos dado a las 2, 4 y 6 semanas es coincidente con varios autores ya que mencionan el reconocimiento de proteínas inmunodominantes que se reconocen a lo largo del ciclo biológico de *T. spiralis* como lo menciona Blanco *et al*, 2013.

En este estudio la proteína de 45 kDa fue obtenida por elución mecánica de las bandas obtenidas de la separación por electroforesis mostro ser una sustancia que despierta una respuesta inmune en el hospedero que genera protección contra la infección por *T. spiralis*.

La secuenciación realizada en este trabajo por espectrometría de masas es la primera en reportarse para la cepa nativa de esta región del país y que se tiene en conserva en el Bioterio de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas y los resultados muestran una gran cantidad de proteínas de las que se pueden resaltar en particular dos que se encuentran en el rango de los 45 kDa y la secuencia se asemeja a proteínas recombinantes utilizadas por otros autores, un reporte dado por Franco

---

y colaboradores en 2012 indican la similitud en ADN con la cepa de referencia MSUS/MEX/91//EM aislada de cerdos con una serie de muestras aisladas de músculo esquelético de perros que correspondería a una cepa silvestre de esta región del país, pero no a la cepa de conserva ya mencionada con la que se realizaron los ensayos en este estudio. El análisis de las cargas parasitarias por género indica que las hembras generan una mayor respuesta contra el parásito en comparación que los machos.

---

## 10. CONCLUSIONES

1. El tratamiento que confiere mayor protección es la inmunización con la proteína de 45 kDa ya que se provoca una respuesta inmune primaria que luego se intensifica a consecuencia del reto con el parásito de *T. spiralis*, lo que deriva en una disminución de la carga parasitaria que muestra una diferencia de 89.2% con respecto al grupo control infectado.

2. En las hembras se despierta una respuesta inmune más efectiva contra el parásito lo que se observa en una mayor disminución de carga parasitaria 89.2% con respecto a los machos 88.6%.

3. Se identificaron los tres antígenos que caracterizan la infección por *T. spiralis* prevaleciendo el reconocimiento del antígeno de 45 kDa desde la segunda semana de infección en el caso de la inmunización, lo que confirma la importancia del uso de este extracto para la protección contra la infección.

4. La secuenciación por Espectrometría de Masas nos permitió comparar las proteínas contenidas en el extracto y varias concuerdan con las reportadas en el banco de Datos de la Universal Uniprot-SwissProt.

5. El Análisis de Varianza indica que el tratamiento más efectivo es la inmunización con la proteína de 45 kDa.

# ANEXOS

## 1. Del Análisis de varianza

**Carga Parasitaria**

| Machos   | Control sano | Control infectado | InZ AST  | InT AST  | InZ 45d  | InT 45d |
|----------|--------------|-------------------|----------|----------|----------|---------|
| Sem 2    | 21           | 33.6              | 27.8     | 46.8     | 29.8     |         |
| Sem 4    | 20           | 27.8              | 18.2     | 40.2     | 30.2     |         |
| Sem 6    | 10.6         | 19.4              | 13.6     | 30.2     | 18.6     |         |
| Suma     | 0            | 51.6              | 80.8     | 59.6     | 117.2    | 78.6    |
| Promedio | #DIV/0!      | 17.2              | 26.93333 | 19.86667 | 39.06667 | 26.2    |
| suma2m   | 0            | 887.52            | 2176.213 | 1184.053 | 4578.613 | 2053.32 |
|          | 0            | 441               | 1128.96  | 772.84   | 2190.24  | 888.04  |
|          | 0            | 400               | 772.84   | 331.24   | 1616.04  | 912.04  |
|          | 0            | 112.36            | 376.36   | 184.96   | 312.04   | 345.96  |
| suma     | 0            | 953.36            | 2278.16  | 1289.04  | 4718.32  | 2146.04 |

| suma    | promedio |
|---------|----------|
| 159     | 318      |
| 136.4   | 27.88    |
| 235.4   | 30.48    |
| 387.8   | 10025.9  |
| 10885.7 |          |
| 11384.3 |          |

Grados de libertad

| de las columnas de la inte | c-1 | TV-(c-1) |
|----------------------------|-----|----------|
|                            | 5   | 15       |

F 4.305876

**Carga Parasitaria Machos**

| Machos   | Control sano | Control infecta | InZ AST | InT AST | InZ 45d | InT 45d |
|----------|--------------|-----------------|---------|---------|---------|---------|
| 1        |              |                 | 179     | 185     | 70      | 200     |
| 2        |              |                 | 195     | 185     | 80      | 190     |
| 3        |              |                 | 140     | 190     | 60      | 185     |
| 4        |              |                 | 180     | 170     | 55      | 170     |
| 5        |              |                 | 125     | 200     | 80      | 180     |
| Suma     | 0            | 0               | 800     | 825     | 395     | 835     |
| Promedio | #DIV/0!      | #DIV/0!         | 160     | 165     | 79      | 167     |
| suma2m   | 0            | 0               | 128000  | 17125   | 25205   | 162205  |
|          | 0            | 0               | 28900   | 32400   | 4900    | 40000   |
|          | 0            | 0               | 24025   | 34225   | 8900    | 22800   |
|          | 0            | 0               | 18600   | 26300   | 3600    | 34225   |
|          | 0            | 0               | 32400   | 28900   | 3025    | 28900   |
|          | 0            | 0               | 24025   | 44000   | 6400    | 30100   |
| suma     | 0            | 0               | 128500  | 179225  | 26825   | 187225  |

| suma   | promedio |
|--------|----------|
| 620    | 85       |
| 590    | 16       |
| 1200   | 143.75   |
| 2970   | 442931   |
| 484525 |          |
| 488325 |          |

Grados de libertad

| de las columnas de la inte | c-1 | TV-(c-1) |
|----------------------------|-----|----------|
|                            | 4   | 20       |

F 59.10818



## 2. Péptidos totales EM de AST

| 1  | Accession | Entry        | Description  | mW (Da) | pI (pH)  | PLGS Score | Peptides | Theoretic | Coverage | Precursor | Products | Digest | Pept    | Modified | Products R | Products R | Amount | Amount | Protein ID |
|----|-----------|--------------|--|---------|----------|------------|----------|-----------|----------|-----------|----------|--------|---------|----------|------------|------------|--------|--------|------------|
| 2  | ESSV71    | ESSV71_TRISP | Uncharacterized protein OS Trichinella spiralis GN Tsp 04314 PE 4 SV 1             | 13240   | 4.381    | 10691.02   | 48       | 7         | 85.812   | 5.4607    | 569      | 7      | 0       | 15.4847  | 0.012467   | 0          | 0      | 1822   |            |
| 3  | ESSR93    | ESSR93_TRISP | Sweeten receptor OS Trichinella spiralis GN Tsp 00232 PE 4 SV 1                    | 14074   | 6.1086   | 6864.948   | 6        | 9         | 67.7419  | 6.0323    | 84       | 4      | 0       | 16.6171  | 0.019888   | 0          | 0      | 2340   |            |
| 4  | ESSQ43    | ESSQ43_TRISP | ATP-dependent RNA helicase DDX50 OS Trichinella spiralis GN Tsp 00706              | 4366    | 4.5465   | 5021.74    | 9        | 7         | 74.359   | 8.9921    | 94       | 2      | 0       | 15.1021  | 0.012467   | 0          | 0      | 2427   |            |
| 5  | ESSV53    | ESSV53_TRISP | Uncharacterized protein OS Trichinella spiralis GN Tsp 04280 PE 3 SV 1             | 26284   | 4.5846   | 5997.687   | 22       | 17        | 32.9268  | 7.9802    | 276      | 20     | 0       | 12.7888  | 0.012529   | 0          | 0      | 13271  |            |
| 6  | DHM23     | PH1HTP_TRISP | Polycystin and nodosa related protein OS Trichinella spiralis GN Tsp 01041         | 17307   | 6.8863   | 5088.423   | 62       | 39        | 55.4245  | 5.244     | 690      | 20     | 0       | 16.0199  | 0.013422   | 0          | 0      | 141    |            |
| 7  | ESSG68    | ESSG68_TRISP | Uncharacterized protein OS Trichinella spiralis GN Tsp 08073 PE 4 SV 1             | 27003   | 4.5017   | 4723.549   | 84       | 29        | 71.6233  | 5.0694    | 781      | 23     | 0       | 14.2681  | 0.012687   | 0          | 0      | 1001   |            |
| 8  | ESS141    | ESS141_TRISP | Uncharacterized protein OS Trichinella spiralis GN Tsp 03683 PE 4 SV 1             | 39245   | 4.773    | 4406.475   | 36       | 27        | 33.8256  | 5.0356    | 308      | 14     | 0       | 15.7983  | 0.019504   | 0          | 0      | 861    |            |
| 9  | B7SW4     | B7SW4_TRISP  | Serine protease OS Trichinella spiralis GN SP 12 PE 2 SV 1                         | 39789   | 5.9638   | 3987.285   | 23       | 10        | 33.5463  | 5.7432    | 222      | 8      | 2       | 14.9741  | 0.01316    | 0          | 0      | 10624  |            |
| 10 | ESS4D5    | ESS4D5_TRISP | ATP-dependent RNA helicase DDX18 OS Trichinella spiralis GN Tsp 00712              | 14531   | 4.4075   | 3401.094   | 86       | 9         | 46.0075  | 5.2449    | 163      | 8      | 1       | 12.7265  | 0.012688   | 0          | 0      | 8634   |            |
| 11 | AWMTA7    | AWMTA7_TRISP | DNase I OS Trichinella spiralis PE 2 SV 1  | 37545   | 5.9323   | 3204.14    | 43       | 14        | 34.8627  | 6.9761    | 481      | 11     | 0       | 13.976   | 0.013633   | 0          | 0      | 8246   |            |
| 12 | ESSK27    | ESSK27_TRISP | Uncharacterized protein OS Trichinella spiralis GN Tsp 00591 PE 4 SV 1             | 3370    | 6.8104   | 2446.354   | 11       | 4         | 59.0381  | 6.7497    | 124      | 5      | 0       | 14.8386  | 0.013471   | 0          | 0      | 1372   |            |
| 13 | ESSR88    | ESSR88_TRISP | Protein serpin OS Trichinella spiralis GN Tsp 02613 PE 4 SV 1                      | 27617   | 8.4732   | 2812.219   | 25       | 21        | 52.5896  | 5.8616    | 218      | 12     | 0       | 16.2987  | 0.013366   | 0          | 0      | 14802  |            |
| 14 | ESSR86    | ESSR86_TRISP | Acin 1c OS Trichinella spiralis GN Tsp 00095 PE 3 SV 1                             | 41734   | 5.1478   | 2720.91    | 42       | 34        | 46.8968  | 7.412     | 342      | 14     | 2       | 14.2028  | 0.017665   | 0          | 0      | 4563   |            |
| 15 | ESSR74    | ESSR74_TRISP | Dandrodipate zinc binding dehydrogenase family OS Trichinella spiralis GN          | 41995   | 9.8542   | 2605.526   | 44       | 27        | 58.2889  | 7.4104    | 304      | 17     | 2       | 16.2987  | 0.014123   | 0          | 0      | 3058   |            |
| 16 | ESSL1     | ESSL1_TRISP  | Acin 1c OS Trichinella spiralis GN Tsp 00186 PE 3 SV 1                             | 41995   | 9.8542   | 2605.526   | 36       | 34        | 45.4787  | 7.2052    | 278      | 11     | 2       | 12.8746  | 0.016798   | 0          | 0      | 435    |            |
| 17 | ESSL4     | ESSL4_TRISP  | Uncharacterized protein OS Trichinella spiralis GN Tsp 02784 PE 4 SV 1             | 19543   | 5.0568   | 1962.959   | 85       | 11        | 34.2373  | 5.2116    | 131      | 4      | 0       | 16.5952  | 0.019707   | 0          | 0      | 8265   |            |
| 18 | ESSFR7    | ESSFR7_TRISP | Heat shock protein A OS Trichinella spiralis GN Tsp 06317 PE 3 SV 1                | 6.401   | 1001.884 | 67         | 84       | 37.4875   | 12.7422  | 452       | 33       | 3      | 17.0207 | 0.014614 | 0          | 0          | 10326  |        |            |
| 19 | ESSB2     | ESSB2_TRISP  | Purative trypsin OS Trichinella spiralis GN Tsp 01973 PE 3 SV 1                    | 49982   | 8.8002   | 1039.462   | 19       | 36        | 41.4254  | 3.7489    | 136      | 13     | 2       | 16.0896  | 0.015431   | 0          | 0      | 14002  |            |
| 20 | ESSY2     | ESSY2_TRISP  | Calreticulin family protein OS Trichinella spiralis GN Tsp 01317 PE 3 SV 1         | 41774   | 4.4562   | 1897.321   | 20       | 31        | 44.0607  | 10.1038   | 199      | 11     | 0       | 16.4427  | 0.015215   | 0          | 0      | 10386  |            |
| 21 | CSDT13    | CSDT13_TRISP | H 3.3 protein OS Trichinella spiralis GN H2 PE 2 SV 1                              | 26880   | 4.632    | 1956.603   | 28       | 25        | 61.6     | 8.1882    | 281      | 13     | 1       | 13.3895  | 0.015747   | 0          | 0      | 203    |            |
| 22 | BDF303    | BDF303_TRISP | Purative serine protease OS Trichinella spiralis PE 3 SV 1                         | 47321   | 8.4586   | 1629.586   | 21       | 35        | 45.9207  | 5.6216    | 133      | 15     | 2       | 16.8977  | 0.016279   | 0          | 0      | 14695  |            |
| 23 | F1W423    | F1W423_TRISP | Purative uncharacterized protein (non-TC) Fragment OS Trichinella spiralis         | 54130   | 10.3     | 826.881    | 36       | 38        | 12.2096  | 7.9874    | 264      | 8      | 1       | 16.1745  | 0.014411   | 0          | 0      | 2773   |            |
| 24 | ESSJ4     | ESSJ4_TRISP  | Uncharacterized protein OS Trichinella spiralis GN Tsp 00384 PE 4 SV 1             | 18427   | 4.8785   | 1231.81    | 12       | 11        | 50.5091  | 7.8732    | 89       | 7      | 0       | 16.1474  | 0.013148   | 0          | 0      | 13074  |            |
| 25 | ESSM93    | ESSM93_TRISP | Fruitease bisphosphate aldolase OS Trichinella spiralis GN Tsp 09638 PE 3          | 41080   | 6.8674   | 1245.626   | 30       | 31        | 58.4856  | 5.0802    | 212      | 14     | 0       | 16.4095  | 0.019506   | 0          | 0      | 10746  |            |
| 26 | ESSQ1     | ESSQ1_TRISP  | Enolase OS Trichinella spiralis GN Tsp 01940 PE 2 SV 1                             | 52224   | 5.0763   | 1992.257   | 39       | 39        | 64.5352  | 10.5749   | 268      | 21     | 1       | 16.4777  | 0.020507   | 0          | 0      | 2423   |            |
| 27 | ASS207    | ASS207_TRISP | Multi-subunit histone acetyltransferase OS Trichinella spiralis GN mod 1 PE 2 SV 1 | 45343   | 5.221    | 1978.882   | 31       | 37        | 48.0296  | 6.6876    | 287      | 13     | 2       | 16.023   | 0.014009   | 0          | 0      | 172    |            |
| 28 | ESSJ33    | ESSJ33_TRISP | Purative mopsin head OS Trichinella spiralis GN Tsp 08431 PE 4 SV 1                | 223867  | 6.8224   | 1030.388   | 111      | 85        | 37.6428  | 12.5216   | 823      | 65     | 2       | 16.4344  | 0.014949   | 0          | 0      | 19566  |            |
| 29 | ESSV4     | ESSV4_TRISP  | Purative ppgolipolipidase 1 OS Trichinella spiralis GN Tsp 09036 PE 4              | 26404   | 7.2889   | 1026.361   | 28       | 36        | 48.7395  | 6.0575    | 235      | 10     | 0       | 14.1829  | 0.016939   | 0          | 0      | 10311  |            |
| 30 | ESSR1     | ESSR1_TRISP  | Triosephosphate isomerase OS Trichinella spiralis GN Tsp 05343 PE 3 SV 1           | 30795   | 7.9431   | 1166.203   | 17       | 22        | 59.2724  | 12.528    | 138      | 10     | 0       | 19.1248  | 0.016939   | 0          | 0      | 7442   |            |
| 31 | ESSR18    | ESSR18_TRISP | Superoxide dismutase Cu,Zn OS Trichinella spiralis GN Tsp 11933 PE 4 SV 1          | 18344   | 5.9744   | 3715.477   | 38       | 15        | 81.1111  | 8.6005    | 255      | 16     | 2       | 14.8862  | 0.014446   | 0          | 0      | 7043   |            |
| 32 | BKSEY2    | BKSEY2_TRISP | Secreted from muscle stage larvae 1 OS Trichinella spiralis GN sm 1 PE 2 SV 1      | 31789   | 7.2418   | 877.5779   | 25       | 22        | 41.9295  | 5.7062    | 192      | 10     | 1       | 15.5066  | 0.014614   | 0          | 0      | 10362  |            |
| 33 | ESSR1     | ESSR1_TRISP  | Amylase precursor A1 OS Trichinella spiralis GN Tsp 01811 PE 4 SV 1                | 54384   | 5.7304   | 630.1844   | 14       | 17        | 51.2102  | 7.4879    | 111      | 9      | 0       | 17.3955  | 0.019252   | 0          | 0      | 2339   |            |
| 34 | ESSL47    | ESSL47_TRISP | Phosphoenolpyruvate carboxylase OS Trichinella spiralis GN Tsp 07893 F             | 7102    | 6.616    | 810.7703   | 35       | 57        | 48.2704  | 8.4852    | 241      | 22     | 1       | 17.8639  | 0.014557   | 0          | 0      | 7862   |            |
| 35 | ESSM9     | ESSM9_TRISP  | Nucleoside diphosphate kinase OS Trichinella spiralis GN Tsp 04425 PE 4 SV 1       | 23284   | 5.9342   | 754.6192   | 5        | 10        | 20.5882  | 3.9288    | 40       | 4      | 0       | 16.9544  | 0.019538   | 0          | 0      | 8309   |            |
| 36 | ESSG39    | ESSG39_TRISP | F1D3 domain protein OS Trichinella spiralis GN Tsp 06438 PE 4 SV 1                 | 76389   | 5.6373   | 227.616    | 21       | 50        | 25.2593  | 10.6519   | 143      | 13     | 0       | 16.0329  | 0.017541   | 0          | 0      | 6474   |            |
| 37 | ESSG45    | ESSG45_TRISP | Uncharacterized protein OS Trichinella spiralis GN Tsp 08443 PE 4 SV 1             | 5918    | 5.6845   | 726.7007   | 21       | 31        | 38.149   | 11.9827   | 131      | 11     | 0       | 16.3942  | 0.01587    | 0          | 0      | 16437  |            |
| 38 | G27871    | G27871_TRISP | SLK1a secretory secretory antigen OS Trichinella spiralis GN                       | 44697   | 8.2388   | 706.35     | 21       | 29        | 42.4757  | 12.2221   | 153      | 11     | 0       | 17.6847  | 0.016691   | 0          | 0      | 30     |            |
| 39 | BDF310    | BDF310_TRISP | Purative myoglobin OS Trichinella spiralis GN Tsp 03077 PE 2 SV 1                  | 8245    | 7.043    | 688.9887   | 14       | 11        | 51.0268  | 4.8536    | 114      | 7      | 0       | 17.7644  | 0.014445   | 0          | 0      | 43     |            |
| 40 | ESSL8     | ESSL8_TRISP  | Chromodomain AL1 protein OS Trichinella spiralis GN Tsp 08063 PE 4 SV 1            | 24080   | 6.3588   | 563.8234   | 8        | 18        | 26.3889  | 5.889     | 46       | 4      | 0       | 17.6863  | 0.01388    | 0          | 0      | 9676   |            |
| 41 | ESSS1     | ESSS1_TRISP  | Purative PAN domain protein OS Trichinella spiralis GN Tsp 06191 PE 4 SV 1         | 58739   | 6.9732   | 560.2189   | 16       | 42        | 42.0635  | 12.1747   | 122      | 13     | 0       | 16.5761  | 0.013471   | 0          | 0      | 891    |            |
| 42 | Q9W408    | Q9W408_TRISP | Gluathione S-transferase OS Trichinella spiralis PE 2 SV 1                         | 22661   | 6.187    | 1586.226   | 16       | 15        | 17.561   | 3.6281    | 86       | 4      | 0       | 19.6824  | 0.019589   | 0          | 0      | 16282  |            |
| 43 | ESSF1     | ESSF1_TRISP  | Purative splicing factor arginine rich 7 OS Trichinella spiralis GN Tsp 0          | 96514   | 10.2612  | 548.4894   | 17       | 63        | 12.3595  | 16.3105   | 30       | 3      | 0       | 17.8964  | 0.02006    | 0          | 0      | 1740   |            |
| 44 | EST229    | EST229_TRISP | Purative PAN domain protein Fragment OS Trichinella spiralis GN Tsp 1916           | 29635   | 5.1832   | 643.4034   | 11       | 29        | 63.1899  | 7.632     | 95       | 9      | 0       | 14.4027  | 0.01249    | 0          | 0      | 7829   |            |
| 45 | ESSD3     | ESSD3_TRISP  | Maltase enzyme OS Trichinella spiralis GN Tsp 01941 PE 2 SV 1                      | 63493   | 6.1869   | 4174.6761  | 20       | 42        | 41.557   | 9.3152    | 173      | 10     | 0       | 16.0386  | 0.01646    | 0          | 0      | 14309  |            |
| 46 | ESSN29    | ESSN29_TRISP | Serine protease inhibitor Kazal type 4 OS Trichinella spiralis GN Tsp 08979 F      | 24491   | 8.1149   | 474.5791   | 11       | 16        | 16.2074  | 5.5395    | 145      | 9      | 0       | 16.0803  | 0.014336   | 0          | 0      | 2700   |            |
| 47 | ESSK73    | ESSK73_TRISP | Protein disulfide isomerase A3 OS Trichinella spiralis GN Tsp 10062 PE 3 SV 1      | 55786   | 6.199    | 328.8226   | 14       | 47        | 23.8833  | 19.5288   | 72       | 11     | 0       | 23.4495  | 0.016723   | 0          | 0      | 19433  |            |
| 48 | ESSV8     | ESSV8_TRISP  | Purative vitronectin 5 OS Trichinella spiralis GN Tsp 04883 PE 4 SV 1              | 60767   | 9.3209   | 201.2239   | 14       | 31        | 35.8031  | 7.7638    | 101      | 9      | 1       | 14.463   | 0.015044   | 0          | 0      | 19530  |            |
| 49 | ESSY19    | ESSY19_TRISP | Purative vitronectin OS Trichinella spiralis GN Tsp 07256 PE 3 SV 1                | 71664   | 8.5274   | 273.0903   | 23       | 63        | 39.2804  | 13.8982   | 145      | 17     | 1       | 19.4408  | 0.019519   | 0          | 0      | 8304   |            |
| 50 | ESS707    | ESS707_TRISP | Uncharacterized protein OS Trichinella spiralis GN Tsp 07877 PE 4 SV 1             | 103282  | 9.5782   | 286.8984   | 11       | 61        | 13.9609  | 13.2219   | 53       | 9      | 1       | 24.9052  | 0.016276   | 0          | 0      | 8923   |            |
| 51 | ESSG9     | ESSG9_TRISP  | Purative HEAT repeat containing domain protein Fragment OS Trichinella spi         | 23662   | 8.2581   | 248.3657   | 9        | 25        | 17.2881  | 16.9501   | 59       | 5      | 0       | 16.2262  | 0.01816    | 0          | 0      | 7772   |            |
| 52 | ESS459    | ESS459_TRISP | Gluamate dehydrogenase OS Trichinella spiralis GN Tsp 05806 PE 3 SV 1              | 58407   | 7.6994   | 245.6962   | 19       | 51        | 23.9342  | 3.9314    | 195      | 14     | 2       | 16.5272  | 0.0142621  | 0          | 0      | 10780  |            |
| 53 | ESSV8     | ESSV8_TRISP  | Rab GDP dissociation inhibitor alpha OS Trichinella spiralis GN Tsp 02823 F        | 43804   | 8.2236   | 239.6889   | 3        | 28        | 14.9485  | 8.2791    | 18       | 3      | 0       | 20.5439  | 0.01827    | 0          | 0      | 14804  |            |
| 54 | ESSG93    | ESSG93_TRISP | Tropomyosin OS Trichinella spiralis GN Tsp 10326 PE 3 SV 1                         | 32297   | 4.9494   | 223.0589   | 33       | 28        | 62.9781  | 3.7282    | 207      | 16     | 0       | 16.0189  | 0.019502   | 0          | 0      | 10706  |            |
| 55 | C4FE4     | C4FE4_TRISP  | Calponin like protein OS Trichinella spiralis GN Tsp 05388 PE 2 SV 1               | 36904   | 7.1765   | 621.282    | 10       | 18        | 32.8947  | 8.7246    | 62       | 5      | 0       | 16.5968  | 0.019756   | 0          | 0      | 41     |            |
| 56 | ESSP50    | ESSP50_TRISP | Protein disulfide isomerase 2 OS Trichinella spiralis GN Tsp 08188 PE 3 SV 1       | 54887   | 4.8118   | 218.3732   | 24       | 41        | 36.3595  | 5.6664    | 189      | 12     | 1       | 17.7378  | 0.015181   | 0          | 0      | 14339  |            |
| 57 | BDFJW6    | BDFJW6_TRISP | Cytoplasmic protein OS Trichinella spiralis GN Tsp 10243 PE 2                      |         |          |            |          |           |          |           |          |        |         |          |            |            |        |        |            |

---

## 11. LITERATURA CITADA

Aguilar, F.; Ramón, B.; Rojas, M.; Enrique, de N.; Ixta, R. y Martínez, G. 2000. Experimental Swine Trichinellosis: use of Dot-ELIS and Western Blot with Excretion/Secretion Antigens (ES) from Infective Larvae to detect Anti- *Trichinella spiralis* antibodies. Revista Latinoamericana de Microbiología, **42**: 57-62.

Alerta Triquinosis N°1 año 2013.

Appleton J.A. & Romaris F.A 2001 pivotal role for glycans at the interface between *Trichinella spiralis* and its host. Veterinary Parasitology, **101**: 249–260

Appleton JA, Bell GR, Homan W, van Knapen F 1991. Concensus on *Trichinella spiralis* antigens and antibodies. Parasitol Today **7**: 190-192.

Armed Forces Institute. 1957. Preparation of tissue, preparation of section, routine staining procedures of histologic and special staining technics. Armed forces Institute of Pathology, Washington, D.C. 11-50.

Barlasina MS, Pedevilla C, Kade P, Costantino SN, Taus MR, Venturiello SM. 2009 Trichinellosis serology in blood-donors from a non-endemic area of Argentina. Medicina (Buenos Aires). **69(3)**:297–301.

Berumen de la Torre, V.; Muñoz, E. y Moreno, G. 2002. Trichinellosis en perros callejeros de la ciudad de Zacatecas México. Parasitología Latinoamericana, **57(57)**: 72-74.

---

Bien J, Näreaho A, Varmanen P, *et al* 2013. Comparative analysis of excretory-secretory antigens of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* muscle larvae by two-dimensional difference gel electrophoresis and immunoblotting. *Proteome Science*. ;10

Bolás-Fernández, F., del Corral-Bezara, L., 2006. TSL-1 antigens of *Trichinella*: an overview of their potential role in parasite invasion, survival and serodiagnosis of trichinellosis. *Research in Veterinary Science* **81**: 297–303

Bradford MM. 1976. A Rapid and Sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Anal Biochem*. **72**: 248-254.

Bruschi F, Chiumiento L. 2011. *Trichinella* inflammatory myopathy host or parasite strategy? *Parasites & Vectors*. **4**: 42. 1-6

Builes, C. y Laverde, T. 2009. Triquinellosis una zoonosis parasitaria. *Revista CES/Medicina Veterinaria y Zootecnología*, **4(2)**:130-136.

Camet J., 2002. Opinion on the diagnosis and treatment of human trichinellosis, *Expert opinion Pharmacother*, pp. 1117-1130.

---

Capo V, Despommier DD, Silberstein DS. 1984. The site of ecdysis of the L1 larva of *Trichinella spiralis*. J Parasitol. Dec;**70(6)**:992-4.

Capo, V. y Despommier, D. 1996. Clinical aspects of infection with *Trichinella* spp. Clinical Microbiology Reviews, **9(1)**, 47-54.

Chávez, G.; Muñoz, E.; Reveles, H.; Rivas, G. y Moreno, G. 2007. Efecto de la Temperatura en la viabilidad e infectividad de *Trichinella spiralis*. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica, **26(2)**:105-109.

Chávez, G.; Saldívar, E.; Muñoz, E. y Moreno, G. 2006. Trichinellosis una zoonosis vigente. Veterinaria REDVET, VII (05), 1-19.

Del Río A, Herrera DR. 1981, Primer hallazgo de *T. spiralis* en el diafragma de un cadáver en Zacatecas. Salud Pública de México. XXIII (1): 25-41.

Del Río A, Herrera R M, Herrera R. 1986, Triquinosis experimental I. Extracción de antígenos y procedimientos para detectar anticuerpos. Archivos de Investigación Médica. 17: 359-367.

De-la-Rosa J L, Alcantara P, Correa D. 1995, Investigation of cross-reactions against *Trichinella spiralis* antigens by enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme-

---

linked immunoelectrotransfer blot assay in patients with various diseases. *Clin Diagn Lab Immunol.* **2**:122–124.

De-la-Rosa J L, Aranda J, Padilla E, Correa D. 1998, Prevalence and risk factors associated with serum antibodies against *Trichinella spiralis*. *Int J Parasitol.* **28**:317–321.

De-la-Rosa J L, Correa D. 1996. Longitudinal analysis of the humoral immune response of rats experimentally infected with *Trichinella spiralis* by western blot. In: Ortega-Pierres G, Gamble H R, van-Knapen F, Wakelin D, editors. Proceedings of the Ninth International Conference on Trichinellosis. México City, México: Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional; pp. 333–337.

Despommier, D.D. 1973. A circular thermal migration device for the rapid collection of large numbers of intestinal helminths. *J. Parasit.* **59**: 933-935.

Despommier, D.D. 1974. The stichocyte of *Trichinella spiralis* during morphogenesis in the small intestine of the rat. In: *Trichinellosis*.(ed. C. Kim), Intext Publishers, N.Y.C. pp. 239-255

Despommier, D.D. 1990. *Trichinella spiralis*: The worm that would be *Virus Parasitology Today.* **6**: 193-196.

---

Despommier, D.D. 1993. *Trichinella spiralis* and the concept of niche. J. Parasitol. **79**: 472-482

Despommier, D.D., and M. Muller. 1970. Functional antigens of *Trichinella spiralis*. J. Parasit. 56: Sect. II. Part 1. 2nd Internat. Cong. Parasitol. p. 76.

Despommier, D.D., and M. Muller. 1970. The schistosome of *Trichinella spiralis*: Its structure and function. J. Parasit. 56: Sec. II. Part 1. 2nd Internat. Cong. Parasitol. pp. 76-77.

Despommier, D.D.; W.F. Symmans; and R. Dell. 1991. Changes in Nurse cell nuclei during infection with *Trichinella spiralis*. J. Parasitol. **77**: 290-295.

Domenech Ana, Gibello Alicia, Collado Victorio., Porrás M Rebeca. 2008 El sistema Inmune innato II: la respuesta frente a la infección. Revista complutense de ciencias Veterinarias. **2 (1)**: 17-30.

Dupouy-Camet J, 2000. Trichinellosis: a worldwide zoonosis. Vet Parasitol **93**: 191–200.

Dupouy-Camet J, 2006. Trichinellosis: still a concern for Europe. Euro Surveill **11**: 5.

Dupouy-Camet J, Olesen OF, Dei-Cas E, Loiseau PM, Mas-Coma S. 2009; Perspectives for parasitology and parasitology networks in Europe. Trends Parasitol. Jul;25(7):293-5. doi: 10.1016/j.pt.2009.03.010. Epub 2009 Jun 17.

---

Fabre M V., Beiting D P., Bliss S K y Appleton J A 2009. Immunity to *Trichinella spiralis* Muscle Infection. *Vet Parasitol.* **159 (3-4)**: 245-248.

FAO/WHO/OIE 2007. Guidelines for the surveillance, management, prevention and control of Trichinellosis.

Franco Sandoval LO, Caballero García ML, Reveles Hernández G, Moreno García MA, Jiménez Cardoso E; 2012. Molecular similarities and differences between *Trichinella* spp., isolated from canine skeletal muscle in Zacatecas, Mexico *Experimental Parasitology.* Volume 131, Issue 2, June, Pages 148–152

Gamble HR 1987. Monoclonal antibody technology in the development of vaccines for livestock parasites. *Journal of Animal. Science.* **64**: 238 -246.

Gamble, H.R. 1985. Comparison of immune effects in mice immunized with adult and larval *Trichinella spiralis* . *Journal of Parasitology* **71**: 680 682.

Gamble, H.R. 1985. *Trichinella spiralis*: Immunization of mice using monoclonal antibody affinity isolated antigens. *Experimental Parasitology* **59**: 398 404

García ME, Herrera RM, Muñoz EJ, Moreno GMA. 1997 Antibodies detection to *T. spiralis* in experimental models. *Trichinellosis.* *ICT* 9; 481-488.

---

Geldhof P, Maere V, Vercruyse J, Claerebout E. 2007. Recombinant expression systems: the obstacle to helminth vaccines? *TRENDS in Parasitology*. **23(11):527-532**.

Gold, A.M.; D.D. Despommier; and S.W. Buck. 1990. Partial characterization of two antigens secreted by the larva of *Trichinella spiralis*. *Mol. Biochem. Parasit.* **41**: 187-196

Gottstein Bruno, Pozio Edoardo y Nöckler KARsten 2009 Epidemiology Diagnosis Treatment and Control of Trichinellosis. *Clinical Microbiology reviews* **22 (1)**: 127-145.

Goyal PK, Wakelin D. 2002. Tyvelose and protective responses to the intestinal stages of *Trichinella spiralis*. *Parasitol.* **52**:1. 91-98.

Herrera R; Del Rio A; Avalos E. and Herrera R. M. 1987. *Trichinella spiralis*: Immunochemical Characterization Of Antigens In Experimental Infections. *Experimental Parasitology* **63**:233-236.

<https://dtoepidemiologia.wordpress.com/category/alertas-epidemiologicos/>

Labarrere, S.; Labrada, R.; Pauste, R.; Guervara, A. y Fasenda, R. 2010. Medios diagnósticos para la identificación de nuevos agentes causales de neumonitis por hipersensibilidad. *Revista Cubana de Salud y Trabajo*, **11 (1)**,17-20.

---

Laemmli U. K., Favre M. 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4 DNA packing events. *Journal Molecular Biology* **80**:5757.

Laemmli UK, Cheng SH, Adolph K, Paulson JR, Brown J, Baumbach WR. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* **227**:680-685.

Lamberti, R.; Gino, L.; Pombar, A. y Calvo, C. (s/a). Técnicas de diagnóstico de la Trichinellosis. En Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de la Pampa s/a. Disponible en [http://www.vet.unlpam.edu.ar/cursos/pdf/diagnostico\\_de\\_triquinosis.pdf](http://www.vet.unlpam.edu.ar/cursos/pdf/diagnostico_de_triquinosis.pdf). Santa Rosa: Argentina.

Laverde, T.; Builes, C. y Masso, C. 2009. Detección de *Trichinella spiralis* en cerdos faenados en dos plantas de beneficio en el Municipio de Bello. *Revista CES/Medicina Veterinaria y Zootecnología*, **4(2)**:47-56.

Li CFK, Chung KKK, Ko RC. 1999. The distribution of Excretory Secretory antigens during the muscle phase of *T. spiralis* infections. *Parasitology Research.*; **85**: 993-998

Li KFC, Seth R, Gray T, Bayston R, Mahida YR, and Wakelin D. 1998. Production of Proinflammatory Cytokines and Inflammatory Mediators in Human Intestinal Epithelial Cells after Invasion by *Trichinella spiralis*. *Infection and Immunity*. **66**:5. 2200 -2206.

---

Liu M, Boireau P, 2002. Trichinellosis in China: epidemiology and control. Trends Parasitol **18**: 553–556.

Lloyd JR. 2000, *Triquinelosis*; Centro Regional Universitario Bariloche; Universidad Nacional del Comahue.

López Bernal Susana Carolina 2012 Epidemiología De *Trichinella spiralis* En Población Infantil Abierta De Calera, Zacatecas, Zac. Tesis De Licenciatura En Químico Farmacéutico Biólogo Unidad Académica De Ciencias Químicas Universidad Autónoma De Zacatecas

Maldonado TC, Reveles HRG, Salivar ES, Muñoz EJJ, Morales VM, Moreno GMA. 2007. Evaluación del efecto protector de 2 inmunógenos de *Trichinella spiralis* en ratas Long Evans con modificación nutricional e infectado con *T. spiralis*. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica. **26(2)**: 110-114

México Sano, 2011 año 4, número 24, pag 14.

Mc Vay SC, Bracken P, Gagliardo FG, Appleton J. 2000. Antibodies to tyvelose exhibit multiple modes of interference whit the epithelial niche of *Trichinella spiralis*. Infection and Immunity. **68(4)**. 1915- 1918.

---

Mc Vay SC, Tsung A, Appleton J. 1998. Participation of Parasite Surface Glycoproteins in antibody Mediated Protection of epithelial cells against *Trichinella spiralis*. Infection and Immunity. **66(5)**: 1941- 1945.

Moreno G. Alejandra, Maldonado T. Claudia, Chávez Ruvalcaba Isabel, Reveles H. Rosa G., Quiroz Nuñez Zuleika, Muñoz E. José J. 2012. El estudio de *Trichinella spiralis* en modelos Experimentales REDVET. Revista electrónica de Veterinaria. **13 (7)**: 1-12.

Moreno GA, Reveles HG, Castañeda CV, Saldívar ES, Muñoz EJ. 2001. Características de la Respuesta Inmune en la Infección por *T. spiralis* en Cerdo. Memorias del XIX Congreso Nacional de Investigación Biomédica. Monterrey Nuevo León.

Moreno García María Alejandra, Maldonado Tapia Claudia H, García Mayorga Elda Araceli, Reveles Hernández Rosa G, Muñoz Escobedo José J. 2009 Fase intestinal de *Trichinella spiralis* en modelo murino. Acta Bio. Colombiana **14 (1)**: 203-210.

Moreno GMA, Avalos ED, Muñoz EJ, Herrera RE. 1996. Detección de Antígenos Inmunodominantes de *Trichinella spiralis* en Conejo como Modelo Experimental, Investigación Científica. UAZ. Vol. 1

Moreno GMA, Muñoz J, Rumayor A. 1996 (b) The 45 kDa of *Trichinella spiralis* induced protection in experimental infections. TRICHINELLOSIS ICT9. 261-265.

---

Moreno, G.; Muñoz, E.; Reveles, H.; Saldívar, E. y Vacio de la Torre, M. 2007. Utilización de técnicas directas e indirectas en el diagnóstico de Trichinellosis en cerdo. Sitio Argentino de Producción Animal, 1-9.

Moreno, GMA, 1994. Característica de la Respuesta Inmune a *Trichinella spiralis*; Tesis Doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina. 4-9.

Moreno, GMA, Muñoz EJ. 1993. Característica de la Respuesta Inmune a *Trichinella spiralis*. Investigación Científica: 5.17-28.

Munn EA. 1997. Racional design of nematode vaccines: hidden antigens. Int. J. Parasitol. 27: 359-366.

Muñoz EJ, Muñoz CR, Del llano TE, Ramos LP, Flores CG, Alvarado FE, Moreno GMA. 1998. Uso de Complejos Inmunes para conferir Protección en Trichinellosis. Parasitología al Día FLAP. 22:79-84.

Muñoz, EJ, Saldívar ES, Reveles HG, Muñoz MY, Moreno MAG. 2007. Característica de la célula nodriza en diferentes modelos experimentales infectados con *Trichinella spiralis*. REDVET. VIII:1. 1-10.

Murrell, K.D., Leiby, D.A., Duffy, C.H., Schad, G.A., 1986. Comparative infectivity of *Trichinella spiralis* (domestic swine) and *T. spiralis* nativa (polar bear) for arctic foxes. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 53: 286–288.

---

Murrell, K.D., Stringfellow, F., Dame, J.B., Leiba, D.A., Schad, G.A., 1987. *Trichinella spiralis* in an agricultural ecosystem. II. Evidence for natural transmission of *T. spiralis* from domestic swine to wildlife. *J. Parasitol.* **73**: 103–109.

Nagano I, Wu Z, Takahashi Y 2009. Functional genes and proteins of *Trichinella spp.* *Parasitol Res* **104**:197-207.

Newton, S.E., Meeusen, E.N., 2003. Progress and new technologies for developing vaccines against gastrointestinal nematode parasites of sheep. *Parasite Immunol.* **25**:283–296.

Newton, S.E., Munn, E.A., 1999. The development of vaccines against gastrointestinal nematode parasites, particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitol. Today* **15**:116–122.

Núñez G. 2011 Trichinellosis respuesta inmune y Actualización en el Diagnostico Inmunoserológico [Triptico] Arg.

OIE 2004. Chapter 2.2.9: Trichinellosis. En *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals* (5a ed). OIE: OIE.

Olvera G. 1896. Triquinosis en México contribución de dos casos para la historia en la capital de México. *Gaceta Médica de México.* **33**: 167.

---

Ortega MG, Arriaga C, Yopez ML. 2000; Epidemiology of Trichinellosis in México, Central and South America. *Veterinary Parasitology*. **93**: 201-225.

Ouchterlony O. 1958. Diffusion in Gel Methods for Immunochemical Analysis in: *Progress Allergy*. Vol. V. Ed. Kellos, P., Basel and New York, Krager, New York. USA. 123-57

Pozio E, La Rosa G, Burell KD, Lichtenfels R. 1992. Taxonomic revision of the genus *Trichinella*. *J. Parasitol.* **78(4)**: 654-659.

Pozio E, La Rosa G. 1996. Biology Aspects of Speciation in The Genus *Trichinella*. *TRICHINELLOSIS ICT* 9. 19-22.

Pozio E, Murrell KD. 2006; Systematics and epidemiology of *Trichinella*, *Advances in Parasitology*. **63**:367-439.

Pozio E, Zarlenga DS, 2005. Recent advances on the taxonomy, systematics and epidemiology of *Trichinella*. *International journal of Parasitology* 35:1191–1204.

Pozio E, Bruschi F. 2001; The importance of correct terminology in describing the muscular stage of *Trichinella* infection. *Trends Parasitol.* Aug; **17(8)**:362.

---

Pozio E. 2005; the broad spectrum of *Trichinella*: from cold to warm-blooded animals.  
Veterinary Parasitology. **32**:3-11.

Pozio E. 2007; Distribution of *Trichinella spp* infections in animals and humans.  
Veterinary Parasitology. **149**: 3-21.

Pozio E. 2008; Epidemiology and control Prospects of food borne parasite zoonoses in the  
European Union. Parasitology. **50**: 17-24.

Pozio E. Factors 2000; affecting the flow among domestic synanthropic and sylvatic cycles  
of *Trichinella*. Veterinary Parasitology. **93**: 241-262.

Pozio E. 200.1 New patterns of *Trichinella* infection. Vet Parasitol. Jul 12; **98(1-3)**:133-48.

Pozio ED, Sacchini P, Boni, Tamburri A, Albericci F, Paterlini F. 1998. Brote de  
Triquinosis humana asociada al consumo humano de carne de caballo en Italia.  
Eurosurveillance.3:8/9. 1-3.

PRO/AH/EDR> Trichinellosis - Argentina: (NQ) wild boar meat 2013-04-26 08:55:05  
<http://www.promedmail.org/direct.php?id=20130426.1673669>

Ramírez, Valenzuela M. 1981. Epidemiología de la Triquinelosis, Ciencia Veterinaria, **3**:  
278-325.

---

Reveles HG, Muñoz EJ, Saldívar SE, Moreno GMA (a). 2000. Efecto de la inmuno terapia sobre las larvas infectantes (LI) de *T. spiralis* implantadas en músculo estriado en modelo experimental. Boletín Internacional Biotecnología aplicada. Vol 17

Reveles HG, Muñoz EJ, Saldívar SE, Moreno GMA (b). 2000. Efecto del antígeno soluble total sobre larvas infectantes (LI) de *T. spiralis* implantadas en músculo estriado en modelo experimental. Revista de Investigación Científica.UAZ. II:2. 51- 57.

Riva, E.; Steffan, P. y Fiel, C. 2006. Trichinellosis: Aspectos Múltiples de una Zoonosis Global, 94-109. Disponible en [www.trichi.iss.it](http://www.trichi.iss.it) [www.senasa.gov.ar](http://www.senasa.gov.ar).

Robert F, Weil B, Kassis N, Dupoui CJ. 1996. Investigation of Immunofluorescence Cross Reactions Against *Trichinella spiralis*. Clinical and Laboratory Immunology. **3 (5)**: 575-577.

Robinson, T. Bellaby, W. C. Chant & D. Wakelin. 1995. High levels of protection induced by a 40-mer synthetic peptide vaccine against the intestinal nematode parasite *Trichinella spiralis* Immunology. **86**:495-498.

Rodak F. 2004 hematología fundamentos y aplicaciones clínicas. 2da Ed. Editorial Médica Panamericana Buenos Aires Arg. pp. 179

Rojas Espinoza O. 2006 Inmunología de la memoria 3aEd. Editorial Medica Panamericana México pp 224-228

- 
- Rosignol JF, Ayoub A, Ayers MS. 2001. Treatment of diarrhea caused by *Giardia intestinalis* and *Entamoeba histolytica* or *Entamoeba dispar*: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of nitazoxanide. *J Infect Dis*; **184**:381–4
- Silberstein DS, Despommier DD. 1984. Antigens from *Trichinella spiralis* that induced a Protective Response in the Mouse. *Journal of Immunology*. **132**:2.898-903
- Smith WD, Zarlega DS. 2006. Developments and hurdles in generating vaccines for controlling helminth parasites of grazing ruminants. *Vet. Parasitol*. **139**: 347-357.
- Soad, E.; Faragalla, M.; El, Moghazy y Nagwa, I. 2010. Comparison of two Antigens for diagnosis of Trichinellosis in pig. *World Applied Sciences Journal*, **8(4)**, 457-461.
- Takahashi Y, Goto C, Kita KK. 1994. Ultrastructural study of *Trichinella spiralis* with emphasis on adult male reproductive organs. *Journal of Helminthology* **68**: 353-358.
- Takahashi Y, Mizuno N, Shimazu K, Araki T. 1992. Ultrastructure, antigenicity and histochemistry of stichocyte granules of adult *Trichinella spiralis*. *Journal Parasitol* 78. 3. 518-523.
- Takahashi Y, Uno T, Mizuno N, Suzuki H, Shimazu K, Araki A. 1989. Morphological study of the stichocyte granules of *Trichinella spiralis* muscle larvae. *J. Parasitol*.**38**:2.77-88

---

Takahashi Y, Uno T, Mizuno N, Suzuki H, Shimazu K, Araki T. (b) 1990. *Trichinella spiralis* the in situ localization of muscle larva antigens recognized by humans. *Experimental Parasitology*. **70**:107-110.

Tay Zavala Jorge; Manuel Gutiérrez Quiroz; Rubén López Martínez; Eugenia Manjarres Zavala; José Molina López, 2003. *Microbiología y Parasitología Médicas*. 3a. edición, Méndez Editores, México.

Tay, Z.; Sánchez, V.; Ruiz, S.; Calderón, R.; García, Y.; Alonso, T.; Martínez C. y Rivas, C. 2004. Estado actual de nuestros conocimientos sobre Trichinellosis en la República Mexicana, reporte de nuevas localidades infectadas. *Revista de la Facultad de Medicina*, **47(3)**:96-100.

Tobwin HT, Sthahelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proct. Natl. Acad Sci. USA* **76**: 4350.

Viloria Calvo Mario J. 2000. *Manual de Laboratorio de Histología practica no. 2*. Preparación de tejidos muertos. Técnica histológica Ed. MC Graw Hill pp 11-14.

Von Borell E. 2000 Assessment of pig housing based on the HACCP concept- critical control points for welfare, health and management. Improving health and welfare in animals production. Proceedings of sessions of the EAAP commission on animals

---

Management and Health. EAAP publication No. 102, 2000 The Hague, The Netherlands 21-21 August 2000.

Wakelin D. 1996. Immunology and Genetics of Zoonotic Involving Parasites; Department of Life Science, University of Norttingham, U.K. Comp- Immunol-Microbiol-Infect-Dis. Sep; **19**:4. 255-65.

Wakelin D. 1998. Helminthes Infections. In genetics of resistance to bacterial and parasitic infection; eds. D. Wakelin & JM. Blacwell 153- 224. Taylon Fransis, London.

Wang ZQ, Cui J, Wei HY, Han HM, Zhang HW, Li YL. 2006. Vaccination of mice with DNA vaccine induces the immune response and partial protection against *T.spiralis* infection. Vaccine. **24**:1205-1212.

Yang J, Yang Y, Gu Y, Li Q, Wei J, Wang S, Boireau P, Zhu X. 2008, Identification and characterization of a full-length cDNA encoding paramyosin of *Trichinella spiralis*. Biochemical and Biophysical Research Communications. **365**: 528-533.

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

Yépez LM, Ortega MGP. 1994. Actualidades sobre la respuesta inmune hacía *Trichinella spiralis*. Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias-

---

Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI y departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV, IPN, Ciencia Desarrollo; XX: 117.