



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**ESTUDIOS DE PROTECCIÓN PASIVA CONTRA LA
TRICHINELOSIS (*Trichinella spiralis*) EN RATONES POR
INMUNIZACIÓN CON UN ANTICUERPO MONOCLONAL.**

Tesis presentada como requisito para obtener el título de
licenciado en Biología

Presenta:

pBiol. SALAZAR HERNÁNDEZ PAULA IVETH
201018867

Tutor: Dr. JORGE SARRACENT PÉREZ.

Noviembre del 2015



Agradecimientos

En este apartado quiero agradecer sinceramente a mis asesores de tesis, que gracias a ellos y su orientación pude realizar este trabajo: Dr. Jorge Sarracent Pérez gracias por su paciencia, disponibilidad y ayuda, y Dr. José Lino Zumaqueros Ríos, le agradezco todo el apoyo y ayuda que me dio, además de haberme dejado por casi 3 años colaborar y aprender dentro de su laboratorio (Laboratorio de Parasitología y Vectores).

Agradezco al comité que me fue proporcionado para la evaluación de mi tesis Dra. Guadalupe Guzmán Coli y el M en C. Hugo Molina Arroyo, gracias por tomarse el tiempo necesario para el apoyo en la revisión y corrección del presente trabajo.

También quiero agradecer a Vicerrectoría de investigación y Estudios de posgrado (VIEP), por haber ayudado a que este proyecto se pudiera realizar.

A mis compañeros de laboratorio los cuales considero mis amigos, por echarme porras en el trabajo y por compartir un gusto que es la parasitología: Estefany, Raúl, Diego, Imelda, (demás amigos que tuve oportunidad de trabajar) gracias por hacer más amena la estancia y el trabajo. Mvz. Rocio Heli Bárcenas que en verdad he sentido un apoyo de su parte tanto persona como laboral.

A mis amigos y amigas, que conocerlos fue un placer y un gusto infinito por habernos acompañado y dándonos apoyo toda la carrera, que sé todos sus deseos son realmente sinceros, agradezco su paciencia hacia mí, y gracias por estar ahí cuando las necesito, Nancy, Dalia, Cira, Dulce, Maggi, Karen, Mariana (en verdad a todos mis amigos gracias).

Dedicatoria

A mis padres Víctor Salazar García y Ma. Félix Hernández Ramos gracias por su amor y apoyo incondicional, ustedes fueron el motor que impulsaron que yo saliera adelante y este logro no solo es mío sino que también de ustedes desgastándose física y económicamente, preocupándose siempre por mí y enseñándome a que si tengo un sueño luche por él.

A mi hermana sabemos que no siempre todo sale como lo deseas pero, que siempre vamos a contar una con la otra.

A mis tíos y tías, especialmente a la Lic. Raquel Hernández Ramos por abrir las puertas de su hogar y permitir que yo formara parte de su familia estos 5 años, estaré eternamente agradecida contigo (tia), Luis y angelito. Además que todo este tiempo y siempre cuando podías recibí tu apoyo, eres una persona que siempre busca ayudar a los demás (nunca cambies) eso me gusta y me hace sentir orgullosa de ti.

A mis abuelitos Cira y Ventura, los quiero demasiado con ustedes aprendí también muchas cosas al crecer y convivir siempre con ustedes, mis papis hermosos. Abuelitos Paula e Isidro faltó muy poco para que pudieran compartir este momento conmigo, pero se que estarían orgullosos, los llevo siempre en mi mente.

Índice

1. Introducción	1
1.1 Distribución.....	1
1.2 <i>Trichinella spiralis</i>.....	3
1.3 Ciclo de vida.....	5
1.4 Determinación del parásito.....	6
1.5 Inmunidad.....	7
2. Planteamiento del problema.....	11
3. Hipótesis.....	11
4. Objetivos.....	12
4.1 objetivo general.....	12
4.2 objetivos particulares.....	12
5. Materiales y métodos.....	13
Primera fase.....	13
5.1 Mantenimiento de cepa.....	13
5.2 Obtención de larvas	13
Segunda fase.....	14
5.3 Evaluación.....	15
5.4 Técnica para determinación de Antígeno.....	16
5.5 Análisis estadísticos.....	17
6. Resultados.....	18
7. Discusión.....	23
8. Conclusión.....	25
9. Referencias.....	26
10. Anexos.....	31

Resumen

La triquinelosis es una enfermedad zoonótica que es ocasionada por el nemátodo *Trichinella spiralis*, el contagio principal es por ingerir carne de cerdo infectada, ya sea, cruda o semicocida.

La baja especificidad que tiene el parásito hacia al hospedador ayuda a que se establezca a gran variedad de condiciones. La respuesta inmune que se genera en contra de este parásito, está en gran medida dirigida hacia los antígenos de superficie que se localizan en la cutícula del parásito, así como hacia los antígenos de excreción- secreción.

En este estudio se ensaya un Ac monoclonal con vistas a buscar efectos protectores de éste en las poblaciones humanas, tomando como modelo murino para tal propósito. Se realizaron dos repeticiones de desafío de varios anticuerpos en 50 ratones Balb/C para lo cual se obtuvo como resultados importante el tratamiento vs *T. spiralis* y AcM vs CD25 que mostró una reducción con más del 50% en la carga parasitaria intestinal, lo cual demuestra una efectividad hacia la inmunización contra *T. spiralis*. Este trabajo pionero en los de su tipo pudiera proponer en breve otros estudios que complemente el efecto protector de moléculas de los anticuerpos obtenidos. Se aplicó una prueba de Kruskal wallis con un valor de $p < 0.05$.

El hallazgo en el modelo murino de un efecto protector contra la infección por *T. spiralis* abre caminos por primera vez en la prevención de la trichinelosis animal y humana al encontrar una notable disminución de adultos en intestino.

1. Introducción

La triquinelosis es una importante zoonosis parasitaria de origen alimentaria para muchas especies de vertebrados tanto silvestres, domésticos y humanos que es causada por especies de nemátodos intracelulares del género *Trichinella*, que prácticamente tiene distribución mundial, con la excepción de la Antártida (Martínez et al., 2009) existiendo más de 5 especies en el mundo. Esta enfermedad se presenta en forma de brotes epidemiológicos, relacionado con la carne infestada, cruda o semicocida, el contagio en el hombre tiene que ver mucho con la ingesta de carne de cerdo (Randazzo et al., 2011).

En la infección parasitaria por *Trichinella* se consideran 3 ciclos epidemiológicos el primero silvestre, donde intervienen muchos animales selváticos como: zorros (*Vulpes sp.*), osos (*Ursus sp.*), lobo (*Canis sp.*), roedores como ratones (*Mus sp.*) y ratas (*Rattus sp.*), hasta lechuzas (*Strix sp.*); el segundo ciclo es el doméstico en donde principalmente se encuentra los cerdos (*sus scrofa*) como la fuente principal de infección y por último el ciclo semi-doméstico involucrando perros, gatos, ratas, y animales silvestres, en este caso la principal fuente de infección es la carne de cerdo que puede ser comida por alguno de estos animales o por la práctica de canibalismo entre roedores (Quiroz, 1984).

En la actualidad se conocen 9 especies dentro del género de *Trichinella* y 3 genotipos divididos en dos clados (con cápsula y sin cápsula). Todas las especies son potencialmente zoonóticas, aunque hasta ahora solo 6 se han detectado en el humano (Martínez, 2009).

1.1 Distribución

A nivel mundial, la especie mas abundante es *Trichinella spiralis*. Ha cobrado relevancia *T. nativa*, por su amplia distribución geográfica. *T. murelli* se encuentra ampliamente distribuida en Norteamérica, y es posible que se encuentre en carnívoros silvestres en Mexico (Uribarren, 2014).

En México se ha notificado la infección en varias entidades del país, sin embargo ésta no ha sido reportada para el estado de Puebla en cerdos, pero pruebas directas e indirectas en roedores han demostrado ser positivos al parásito (Angulo, 2014). Los estados con reportes de la existencia del parásito *Trichinella spiralis* en

humanos, porcinos y equinos son: Zacatecas, Durango, Veracruz, Estado de México, Distrito Federal, Jalisco, Michoacán, Aguascalientes, Sonora, Hidalgo, Querétaro, Guerrero, Nuevo León y Guanajuato (Becerril, 2014).

Tabla 1. Distribución y genotipos del género *Trichinella* en el mundo. (Fuente: Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM)

Genotipo	Distribución	Ciclo	Hospederos	Cápsula (colágeno)	Resistencia congelación
<i>T. spiralis</i> T-1	Cosmopolita	Doméstico, silvestre	Cerdos, ratas, rara vez carnívoros	Sí	No
<i>T. nativa</i> T-2	Ártico, Subártico, áreas del Holoártico	Silvestre	Carnívoros terrestres y marinos	Sí	Sí
<i>T. pseudospiralis</i> T-4	Cosmopolita	Silvestre, rara vez doméstico	Mamíferos, aves	No	No
<i>T. britovi</i> T-3	Áreas del Paleártico, Norte y Oeste de África	Silvestre, rara vez doméstico	Carnívoros, rara vez cerdos	Sí	Sí
<i>T. nelsoni</i> T-7	Etiopía	Silvestre	Carnívoros, rara vez cerdos	Sí	No
<i>Trichinella</i> T8	Sudáfrica, Namibia	Silvestre	Carnívoros	Sí	No
<i>T. murrelli</i> T5	Áreas del Neártico	Silvestre	Carnívoros	Sí	No
<i>Trichinella</i> T6	Canadá, EUA	Silvestre	Carnívoros	Sí	Sí
<i>Trichinella</i> T9	Japón	Silvestre	Osos negros, zorros rojos, perros	Sí	?
<i>T. papuae</i> T10	Papua Nueva Guinea, Tailandia	Silvestre, rara vez doméstico	Cerdos, cocodrilo - agua salada	No	No
<i>T. zimbabwensis</i> T11	Etiopía, Zimbabwe Mozambique,	Silvestre	León, cocodrilo y lagarto monitor-Nilo	No	No
<i>T. patagoniensis</i> T12 (nombre propuesto)	Argentina	Silvestre	Carnívoros (puma)	Sí	Resiste a congelación -5 °C 3 meses; no resiste -18 °C.

Modificado. De: Pozio E, et al. Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of nematodes belonging to the *Trichinella* genus. *Infection, Genetics and Evolution* 2009;9(4):606-618. De: Krivokapich SJ, et al. *Trichinella patagoniensis* n. sp. a new encapsulated species infecting carnivorous mammals in South America. *Int J Parasitol* 2012;42 (10): 903-910. Y de: Pozio E, Zarlenga DS. New pieces of the *Trichinella* puzzle. *Int J Parasitol*, Nov 2013;43(12-13):983-997

La crianza de animales domésticos en diversos municipios del país, forma parte de la economía familiar destacando la de porcinos, estos animales son criados en forma mixta y extensiva, ya que la mayor parte de las comunidades no disponen de áreas adecuadas para el confinamiento de cerdos. Para conseguir su alimento, se desplazan con toda libertad entre las poblaciones rurales e incluso algunas urbanas;

en esencia, su alimentación está constituida por raíces, follaje, roedores, carroña y desperdicios de todo tipo.

Es tradición que en algunas familias en sus domicilios críen cerdos, los cuales utilizan para su consumo durante las festividades o bien los comercializan con intermediarios, quienes los venden directamente a los rastros o a otras familias en poblaciones circunvecinas (Chávez et al., 2006).

Los hábitos alimenticios de la población rural son inadecuados, debido a que cuando muere un animal por enfermedad, disponen de su carne como alimento y los restos son abandonados en la superficie de la tierra a merced de perros, gatos, cerdos y otros animales carroñeros (Chávez et al., 2006).

Un informe realizado en Argentina el 27 de septiembre de 2015, da a conocer otro brote de triquinosis en 100 personas la cual el 20% de ellos son niños, a causa del consumo de embutidos secos provenientes de una granja clandestina (Herriman, 2015).

En e 2011 se realizo un estudio sobre el efecto que tenia a temperatura sobre el parásito *T. spiralis* mostrando que las larvas utilizada en este estudio, se encuentren libres o enquistadas, permanecen vivas cuando son sometidas a temperaturas aún más adversas (tanto de congelamiento como de calentamiento) que las recomendadas. Así por ejemplo, el 40,3 % de las larvas libres y el 45,8 % de las larvas enquistadas permanecieron vivas a la tercera y cuarta semana de tratamiento a -20 °C, respectivamente (Reveles et al., 2011) .

1.2 *Trichinella spiralis*

Trichinella spiralis (Nemata Adenophorea). Es un parásito que fue descubierto por James Paget, estudiante de medicina en el hospital de San Bartolomé en Londres, lo detectó en el diafragma de una persona Italiana que había muerto a causa de tuberculosis. En 1835 el zoólogo británico Richard Owen le dió el nombre de *Trichinella spiralis* (Reveles et al., 2011 y Riva et al., 2007).

Los caracteres morfológicos de *Trichinella spiralis* son similares a otras especies del género: *T. nativa* y *T. nelson*, las cuales se diferencian por características isoenzimáticas y por medio de anticuerpos monoclonales; de igual forma se ha utilizado la morfometría como elemento para diferenciar éstas, en la cual se ha utilizado el extremo anterior delgado, boca carente de papilas, faringe con esticocitos, papilas laterales en los machos, ornamentación de la cutícula y larvas musculares encapsuladas (Gómez-Gonzales, 2009).

Clasificación taxonómica (Llop et al., 2001)

- Reino: Animalia.
- *Phyllum*: Nematoda.
- Subclase: Adenophorea.
- Orden: Enoplida.
- Superfamilia: Trichuroidea.
- Familia: Trichinellidae.
- Género: *Trichinella*.
- Especie: *spiralis*.

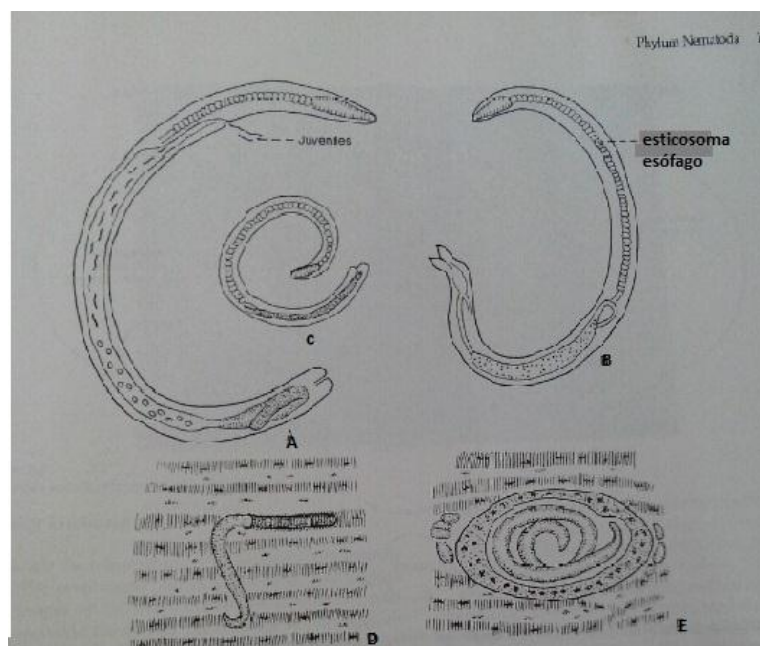


Figura 1. *Trichinella spiralis*. (A) adulto hembra; (B) adulto macho; (C) juvenil recién nacido; (D) juvenil penetrando fibras musculares; (E) juvenil encasado en músculo, “células nodriza”. (Fuente: Murray, 1996)

La trichinelosis, ocasionada por *Trichinella spiralis*, puede acarrear diversos problemas sociales y económicos, debido al sub-registro del diagnóstico en granjas porcinas (Guanera et al., 2006).

La Trichinelosis es una enfermedad cosmopolita de origen alimentario,. Un análisis sobre los brotes ofreció datos reveladores indicando 65,818 casos y 42 muertes en 41 países (Murrell y Pozio, 2011). En China y en Eslovaquia se reportaron varios brotes epidémicos ocasionados en este caso por el consumo de carne de perro. (Pozio y Zarlenga, 2013). Por su parte en México sólo se le da importancia cuando se presentan brotes epidemiológicos, (Reveles et al 2011).

1.3 Ciclo de vida

El ciclo de vida monoxeno (figura 1) se lleva a cabo en un solo hospedador, lo que significa que el mismo huésped alberga a las 3 grandes etapas antigénicas, larvas musculares o infectantes (LI), gusanos adultos (Ad), y larvas recién nacido (LRN), (Caracostantoligo y Martínez, 2009).

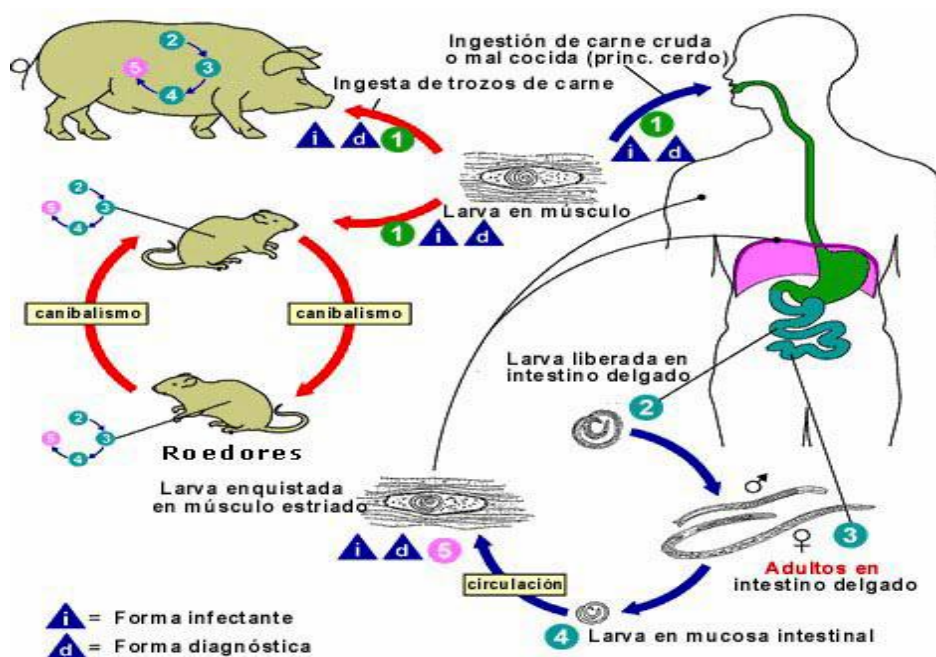


Figura 1. Transmisión y ciclo de vida de *T. spiralis* (fuente: CDC)

Ocurre en carnívoros que se alimentan de carne infectada por el parásito, y sus estadios se desarrollan a nivel enteral, parental y gastrointestinal.

El primer nivel ocurre cuando el huésped se alimenta de carne que contiene larvas infectantes (LI) que se encuentran enquistadas dentro del tejido muscular, en el estómago son liberadas por la acción de enzimas digestivas y son transportadas pasivamente por peristaltismo a las dos terceras partes del intestino delgado, las cuales sufren cuatro mudas tomándose de manera aproximada 30 horas para desarrollar de un estado juvenil a un estado maduro, las dimensiones del macho 1,5 mm de largo por 0,05 mm de ancho, la hembra de 3,5 mm de largo por 0,06 mm de ancho. El parásito adulto (Ad) vive dentro de una fila de células epiteliales del intestino delgado, éste es un estado transitorio. Los machos ocupan una hilera de células adyacentes a las que ocupa la hembra; se cree que cada macho puede fecundar a dos hembras, después que ha ocurrido la cópula, los machos mueren y son expulsados; las hembras aumentan de tamaño penetrando más profundo en la mucosa intestinal, llegando incluso al peritoneo y a los ganglios linfáticos mesentéricos. La embriogénesis dura alrededor de 90 horas, ya que las LRN son liberadas hasta el quinto día post-infección (Moreno-García, 2009 y Reveles, 1997) Fig

En la fase parental las larvas recién nacidas (LRN) del día 8 al día 15 migran dentro de la lámina propia y viajan a través del mesenterio linfático o a través de la cavidad peritoneal, ducto torácico linfático y el torrente circulatorio. Todas las larvas eventualmente entran a la circulación general vía porta y son distribuidas por todo el cuerpo, Al llegar al músculo estriado (diafragma) se observa un proceso mecánico de penetración a la célula muscular a partir del día 10 post-infección de LI (Moreno-García, 2009 y Reveles, 1997). Y por último, en las células musculares las LRN inician un período de desarrollo post-embrionario creciendo y desarrollándose sin mudas; la máxima diferenciación a LI se alcanza entre los días 4 y 20 después de la penetración, dentro de un miocito, la cápsula se convierte en célula nodriza del parásito, esta célula por último es rodeada por vénulas que le servirán para el transporte de nutrientes (Moreno- García, 2009; Luna y Sánchez, 2006).

1.4 Determinación del parásito

Lo podemos identificar con métodos directos o indirectos: y esto nos ayudan a observar si existe una infección o no, dentro de las pruebas directas se encuentran la triquinoscopía basada en la compresión de tejido entre dos porta objetos, o la digestión enzimática una prueba con alta sensibilidad donde se pone a digestión la

carne de cerdo para la obtención de larvas para poder liberarlas de la cápsula protectora de colágeno, análisis histopatológicos utilizando tinciones para el marcaje de la larva muscular en tejido, y dentro de los métodos indirectos está, el ligado a enzimas pruebas de inmunoensayo (ELISA) utilizado para la detección, inmunoflorescencias indirectas, western blot y electroforesis (Luna y Sánchez, 2006; Chávez, 2012; Flisser, 2006).

1.5 Inmunidad

El sistema inmune es un sistema complejo que actúa contra sustancias extrañas que puedan afectarlo, este circula en diversas partes del cuerpo, la mayor parte de las células inmunológicas se encuentra en el sistema digestivo (70%), ya que está expuesto a distintos patógenos todo el tiempo, el sistema músculo-esquelético es proveedor de asistencia al sistema inmune y ayuda al flujo sanguíneo y sistema linfático, el cual este último circula por los nódulos linfáticos que es inspeccionada por las células inmunológicas, si la linfa no circula bien, la habilidad del sistema inmune reduce en su funcionamiento (The Blokehead, 2015).

La respuesta inmune frente a antígenos extraños requiere una coordinación perfecta de todas las células que participan en las diferentes fases de esa respuesta. El objetivo de la respuesta es la destrucción rápida de los microorganismos pero debe garantizar la mínima repercusión sobre la totalidad de las células y tejidos del organismo. Los linfocitos T, , llevan a cabo la regulación de este proceso. Se denominan células colaboradoras (TH1 y TH2) a las células encargadas de coordinar la respuesta inicial frente a los patógenos, y se denominan células reguladoras a las células que velan por el respeto de la integridad de lo propio y, una vez controlada la infección, desmontan la respuesta (Arnaiz et al., 1995).

Las TH1 son muy efectivas en la eliminación de patógenos intracelulares y las TH2 son de gran importancia en la eliminación de microorganismos extracelulares y parásitos. Esta división en 2 subtipos se basó en el panel de citocinas que éstos eran capaces de secretar una vez activados, y con las que modulaban a diversos tipos celulares. Se denominó TH1 a los linfocitos secretores de interferón γ (IFN- γ) e interleucina 2 la cual tiene una sub unidad alfa CD25 que ayuda a su rápida proliferación (IL-2), y se denominó TH2 a los linfocitos que liberan IL-4 e IL-13. La

diferenciación en TH1 o TH2 a partir de los linfocitos quiescentes se determina en la sinapsis inmunitaria, en función de las citocinas que están presentes y que funcionan como terceras señales durante el proceso de activación. La IL-12 promueve la transformación en células TH1 y la IL-4 promueve la transformación en células TH2 (Arnaiz et al., 1995).

Anticuerpos monoclonales anti-CD25 (AcM anti CD25), quiméricos y humanizados, permiten una inmunosupresión selectiva de los linfocitos T, sin producir el síndrome de liberación de citoquinas ni la sobreinmunosupresión, lo que disminuye la incidencia de procesos infecciosos y linfoproliferativos. La utilización de estos anticuerpos monoclonales anti- CD25 frente a placebo, pone de manifiesto una disminución de rechazos agudos a los 6 y 12 meses, con similar supervivencia de paciente e injerto al año del trasplante, sin que por el momento existan datos a más largo plazo (Zamora et al., 2002).

Trichinella spiralis es un parásito que se establece, desarrolla y reproduce en una amplia gama de huéspedes vertebrados. Esta baja especificidad de hospedador implica que dicho organismo tiene la capacidad de adaptarse a una gran variedad de condiciones, con lo que apenas son afectados por aquellos aspectos de la inmunidad natural que imponen una especificidad más rígida en otras especies. Sin embargo, tienen en común con todos los metazoos parásitos, el inducir en el hospedador una fuerte respuesta inmune. Muchos componentes de la respuesta inmune es probable que tengan algún efecto sobre el parásito o el hospedador, pero pueden ser útiles para el diagnóstico, también son capaces de dañar al parásito e inducen una respuesta protectora contra nuevas infecciones, mientras que otros son dañinos para el propio hospedador (Dea Ayuela, 1999).

La respuesta inmune que se genera en contra de este parásito, está en gran medida dirigida hacia los antígenos de superficie que se localizan en la cutícula del parásito, así como hacia los antígenos de excreción-secreción de este mismo (Ortega-Pierres, 1995.). Esto es debido, en gran parte, a que los antígenos presentes en estos compartimentos del parásito, constituyen el primer sitio de interacción entre el parásito y el huésped. Es por esto que la caracterización de estos antígenos de *T. spiralis* reviste gran importancia, ya que pueden participar en los mecanismos

de protección en contra de la infección y también ser útiles en el desarrollo de los métodos de diagnóstico específicos y sensibles.

Según Becerril (2014) en su libro de Parasitología Médica, existe una activación continua de sistema inmune contra *T. spiralis*. En el ámbito entérico es la inflamación iniciada por la penetración de células epiteliales columnares del intestino. Se ha podido observar liberación de mediadores proinflamatorios, como las interleucinas (IL) B1, IL-8 y ENA-78 desde las primeras cinco horas de infección, en tanto que a las 48 horas de infección se detectan IFN- γ y citocinas de tipo 2 a partir de los nódulos linfáticos mesentéricos, las cuales promueven una respuesta linfocitaria tipo Th, la producción de IL-3, IL4 e IL-5 regula la inflamación y favorece la infiltración de mastocitos, eosinófilos y el incremento en la concentración de histamina y leucotrienos, que dañan a la mucosa intestinal. Las concentraciones peristálticas culminan entre los 10 y 15 días con la expulsión de los helmintos. La respuesta inmunitaria contra la LRN tiene que ver con la presencia de anticuerpos contra antígeno de superficie; los cuales son capaces de mediar una acción citotóxica (ADCC). En la respuesta humoral de los pacientes con triquinelosis se detectaron anticuerpos de los isotipos IgE, IgA, IgM, e IgG, pero el último es el predominante durante el curso de la infección. En orden sucesivo aparece IgG1, IgG3 y luego IgG4, que se relaciona con una respuesta crónica.

Zocevic et al. (2014) caracterizaron a la proteína de fusión L20H-Ts3 para confirmar la antigenicidad (extraída de *E. coli* para la obtención de anticuerpos policlonales) para detectar IgG específica anti-*Trichinella* en sueros de cerdos infectados de manera experimental con *Trichinella*. Con el propósito de tener una detección de triquinelosis en cerdos por medio de un ELISA indirecto. La proteína L20H-Ts3 se encontró siempre presente en el esticocoma del parásito, y es la primera proteína que permite la detección de anticuerpos específicos anti-*Trichinella* antes de 15 días pos-infección y hasta 20 semanas pos-infección en cerdos.

Se ha probado que la profilaxis con antígenos de excreción- secreción derivados de larvas musculares de *T. spiralis*, aplicadas por vía intraperitoneal son capaces de suprimir la respuesta inmune del huésped esto ayudara a que los macrófagos no

sean activados y el factor de necrosis tumoral (TNF) no atacara a los oligodendrocitos de la vaina de mielina así aminora la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). Esto contribuye a que exista un cambio de expansión y en la liberación de CD4, CD25 y Foxp3 acumulándose en bazo (Radovic et al., 2015; Blázquez, 2005).

Moreno-García (2012) realizó efecto protector de 3 inmunógenos en modelo experimental murino y cerdo infectados con *Trichinella spiralis*, que fueron antígeno soluble total de *Trichinella* (AST), anticuerpos anti-*Trichinella* y complejos inmunes (Ag-Ac de Trichinellosis) por técnicas inmunoquímicas. De los 3 inmunógenos evaluados en modelo experimental murino, el que tuvo un mayor efecto protector estadísticamente significativo fue el antígeno soluble total de *Trichinella*, el cual se utilizó para la inmunización de los cerdos, primero en éstos fue capaz de desencadenar una respuesta inmune y posteriormente un efecto protector.

En los mamíferos inmunizados de forma natural, la invasión muscular podría evitarse si los estadios invasivos de *T. spiralis* (Ad y LRN) son interrumpidos. *T. spiralis* afecta al sistema inmune del huésped mediante la expresión de una variedad de proteínas que influyen en la regulación inmune (Shuang Feng, 2013).

2. Planteamiento del problema

Las características conductuales de cerdos (*Sus scrofa*) al comer cualquier alimento provoca ser multiparasitado. En los tiempos de alto consumo, debido a sus bajos costos de producción y la carencia de otros alimentos, la carne de cerdo es una proteína de consumo excesivo sin considerar que la procedencia de la carne puede ser dudosa desde el punto de vista higiénico. A este se unen los hábitos de la población mexicana que la consumen medio cocida, aspecto epidemiológico que predispone el parasitismo por este agente etiológico. De igual forma las evidencias clínicas son inespecíficas por lo que el humano cursa hacia la infección crónica muchas veces sin tratamiento. Esto nos motiva a buscar alternativas protectoras contra la infección del parásito y mejorar o prevenir las mismas.

3. Hipótesis

El Anticuerpo monoclonal anti-*T. spiralis* 3JKB, protegerá al modelo murino (ratones cepa Balb/c) de la infección por *T. spiralis*.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

- Determinar el efecto protector del anticuerpo Monoclonal (3JKB) anti-*Trichinella* sobre la infección por *Trichinella spiralis* en ratones Balb/c, infectados previamente con tejido procesado por digestión enzimática de rata Wistar.

4.2 Objetivos particulares

- Transferir la cepa de *T. spiralis* (Msus/ ME/ 92/ CM- 92) y mantenerla en ratas Wistar.
- Determinar la carga parasitaria de *Trichinella spiralis* en ratas Wistar.
- Realizar conteo de adultos de *T. spiralis* en intestino de raton cepa Ballb/c para observar el efecto protector de anticuerpo Monoclonal.
- Detectar antígenos de *Trichinela spiralis* a través de un Ac monoclonal por medio de ELISA, para la verificación de la infección parasitaria en ratones cepa Balb/c.

5. Materiales y Métodos

Para la realización de este trabajo se consideraron dos fases en el experimento, en la primera fase se trabajó con el pase de cepa de *T. spiralis* en ratas Wistar para después infectar ratones y en la segunda fase se analizó el efecto protector que tenía el Anticuerpo Monoclonal anti *T. spiralis* en ratones balb/c.

Primera fase

5.1 Mantenimiento de cepa

La cepa de *Trichinella spiralis* Msus/ ME/ 92/ CM- 92 se mantuvo por un periodo de 6 meses en ratas de la cepa Wistar mantenidas en el bioterio en condiciones estándar de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad (50%) y luz (fotoperiodo: 12 horas, oscuridad: 12 horas); y con acceso *ad libitum* de comida y agua. El trabajo de pase de cepa se realizó en el Laboratorio de parasitología y vectores de la escuela de Biología, donde se realizaban pases seriados cada dos meses en ratas, realizando digestión enzimática del tejido de la rata sacrificada para poder infectar a los ratones de experimento.

5.2 Obtención de larvas

Para obtener larvas infectantes, se realizó digestión enzimática para la cual se preparó una solución de agua destilada con ácido clorhídrico al 1% (HCl) y pepsina al 1%. Solución mantenida a una temperatura de $37^\circ \pm 40^\circ \text{C}$., en una plancha con calentamiento y agitación constante. La cantidad de solución depende de los gramos de carne que se someten a digestión.

Tablas 2. Técnica de digestión enzimática	
1	Pesar la muestra a analizar.
2	Triturar la carne en una procesadora
3	Colocar la carne en un vaso de precipitado y todos los restos que se puedan recuperar.
4	Agregar 300ml de agua destilada a una temperatura de $37^\circ \pm 40^\circ \text{C}$
5	Colocar 3 gr. de pepsina al 1 % y por último colocar con cuidado 3ml de HCl al 1%
6	Colocar la barra magnética y tapar el vaso de precipitado con papel

	aluminio, colocar en la plancha de calentamiento con agitación. (procurar que la barra magnética tenga una velocidad adecuada formando remolinos.)
7	El tiempo de agitación va de 2 a 3 horas, observando que ya esté digerida la carne se deja reposar, y luego la solución la filtramos en un colador de malla fina (200 micrones).
8	Lo que queda en la malla se re-suspende en PBS al 1X y se deja reposar aprox. Por 15 minutos para que se sedimente.
9	Nos deshacemos del sobrenadante y al sedimento lo suspendemos de nuevo en 5ml de PBS 1x.
10	Montamos la muestra en una porta objetos, aplicando 5 microlitos de la solución y se realiza el conteo en el microscopio óptico al 10x a las larvas musculares. (anexo 1)

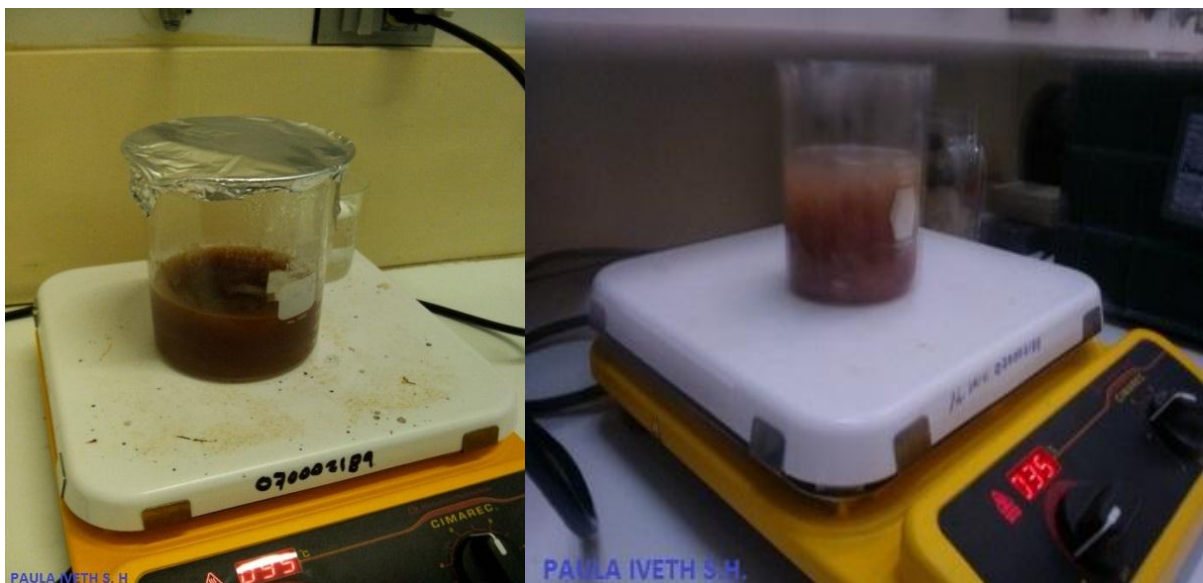


Figura 2. Técnica de digestión enzimática. Solución de digestión enzimática en plancha de calentamiento y agitación.

Segunda fase

Para la realización de este trabajo se llevaron a cabo 2 experimentos en distintas fechas con grupos de 50 ratones machos de la cepa Balb/c de 28 días de edad, procedentes del Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Estos ratones fueron sometidos al reto con *Trichinella spiralis* de la cepa Msus/ ME/ 92/ CM- 92 obtenida del Instituto de Referencias Epidemiológicas (InDRE).

Para los experimentos 1 y 2 se realizó la misma manipulación procediendo de la siguiente manera: los 50 ratones se dividieron en 5 grupos de 10 cada uno. El primer día se seleccionó al grupo 1 y 3 para aplicar por vía intraperitoneal 0.5ml de Anticuerpo monoclonal anti CD25.

Dos días después cuando el AcM antiCD25 cumplió el efecto de inmunodeprimir al organismo, a los 5 grupos de ratones se les sometió al reto de *T. spiralis* por vía oral, inoculando 300 LM por ratón, las que fueron obtenidas experimentalmente por digestión enzimática (pepsina y HCl) de carne de cerdo en primer experimento de 50 ratones y para el segundo experimento las larvas se obtuvieron de carne de rata. Quedando los grupos de la siguiente forma (tabla 3):

Tabla 3. Organización de los grupos experimentales	
Grupo 1	se le aplicó 0.5ml por vía intraperitoneal de AcM vs <i>T. spiralis</i> más el reto y el AcM vs CD25 aplicado dos días antes.
Grupo 2	se le aplicó 0.5ml por vía intraperitoneal de AcM vs <i>T. spiralis</i> más el reto.
Grupo 3	se aplicó 0.3ml por vía intraperitoneal de AcM vs <i>F. hepática</i> más reto y el AcM vs CD25 aplicado dos días antes.
Grupo 4	se aplicó 0.3ml por vía intraperitoneal de AcM vs <i>F. hepática</i> más reto.
Grupo 5	grupo control sólo sometidas al reto con <i>T. spiralis</i>

5.3 Evaluación

Después de 7 días del reto 5 ratones de cada grupo se sacrificaron para obtener conteo de adultos de *trichinella spiralis* en intestino. El procedimiento para obtener *Trichinella spiralis* adultos fue (tabla 4):

Tabla 4. Técnica para la obtención de <i>T. spiralis</i> adultos	
1	Se sacrificó al ratón por medio de sobredosis de anestésico (xilacina-ketamina) respetando la NOM-062-ZOO-1999 seguida por el bioterio Claude Bernard, y se obtuvo el intestino completo.
2	Se seleccionó la parte de intestino delgado y se rasgó y pico en pedazos pequeños.
3	A esa porción del intestino se puso en coladeras pequeñas con solución de PBS 1X a 37°C (simulando a temperatura corporal).
4	Se puso en agitación en una incubadora orbital por dos horas, para que el nemátodo adulto pudiera caer en la solución ya que se encontraba entre las microvellosidades del intestino.
5	se procedió hacer el conteo de adultos que cayeron en el PBS, se vertieron en una caja de Petri y observando al estereoscopio con el lente de 4x se realizó el conteo (anexo 1).

A los 40 días se procedió a sacrificar a los otros 5 ratones para hacer el conteo de larvas en músculo por medio de triquinoscopia que es una técnica sencilla que consiste en hacer compresión entre dos portaobjetos de tejido, en este caso diafragma de los ratones. Después se realizó la serología con el suero de la sangre obtenida por punción cardiaca para la determinación de antígeno.

5.4 Técnica para determinar antígenos.

La técnica que se utilizó para determinar antígeno fue la técnica de ELISA, estandarizada en el laboratorio de parasitología y vectores, de la escuela de Biología, BUAP. Siguiendo la metodología aquí expuesta:

• Recubrimiento:

1. Diluir 10 µg de anticuerpo policlonal por 1 ml de buffer de Recubrimiento.
2. Agregar 100 µl en cada pocillo.
3. Cubrir con papel aluminio y incubar en cámara húmeda por 1hr a 37°C o toda la noche a 4°C.
4. Decantar

• Bloqueo:

1. Colocar 300 µl por pocillo de solución de bloqueo
2. Incubar en cámara húmeda 1hr a 37°C o toda la noche a 4°C.

3. Decantar y lavar con PBS Tween 4 veces.

• **Disolución de las muestras:**

1. Agregar 100 µl por pocillo de la Disolución del suero para antígeno

2. Incubar en cámara húmeda 1hr a 37°C.

3. Decantar y lavar con PBS Tween 4 veces.

• **Anticuerpo monoclonal:**

1. Agregar 100 µl por pocillo de disolución de antígeno monoclonal

2. Incubar por 1hr a 37°C.

3. Decantar y lavar por PBS Tween 4 veces.

• **Conjugado:**

1. Colocar 100 µl de Disolución de conjugado anti ratón por pocillo

2. Incubar en cámara húmeda 1hr a 37°C.

3. Decantar y lavar con PBS Tween 6 veces.

• **Sustrato:**

1. Se añade 100 µl de Solución Sustrato por pozo

2. Se cubre con papel aluminio y se deja reposar por 15 min.

• Se detiene la reacción agregando 50 µl de solución Stop por pocillo.

5.5 Análisis estadístico

Para analizar el efecto protector del Anticuerpo Monoclonal anti *T. spiralis* en el intestino del ratón se comparó el número de adultos de *T. spiralis* de cada uno de los grupos, con la prueba estadística kruskal Wallis -Dunn's con un nivel de significancia $p < 0,05$.

Para la prueba ELISA los casos positivos se determinarán, respecto a los valores obtenidos en el lector de ELISA a 490nm, realizando el valor de cohorte a estos valores negativos sumándole y restándoles dos desviaciones estándar (DS) a la media, al igual que a los valores positivos.

Para ambas pruebas estadísticas se utilizó el programa estadístico software Past Versión 2.17c.

6. Resultados

Respecto a la primera fase de experimento la carga parasitaria de las ratas Wistar se analizó por medio de una triquinoscopias, el tejido analizado se obtuvo de diafragma del organismo. Estas ratas que se utilizarón para el pase de cepa no pasarón por algún tratamiento y siempre se observaba una carga parasitaria alta obteniendo más de 7 parásitos de *T. spiralis* por campo (figura 3).

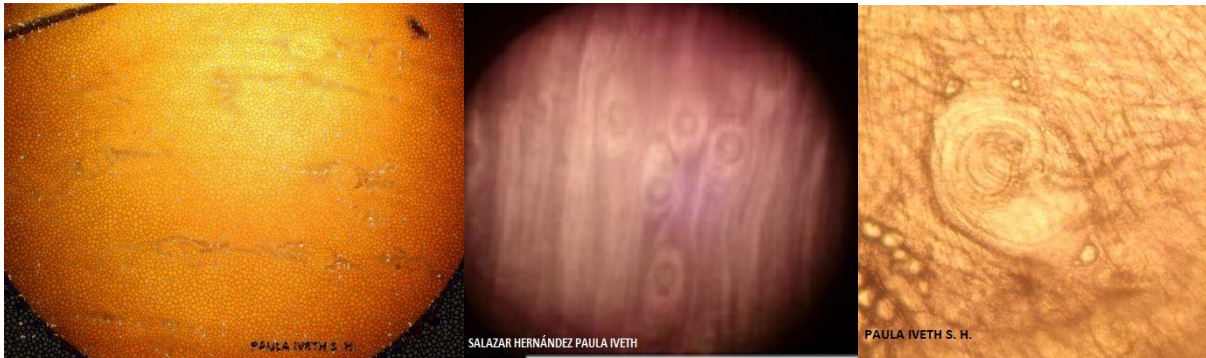


Figura 3. Triquinoscopias positivas observadas con microscopio óptico al 10x.

Para obtener a *T. spiralis* en su etapa infectante y poder someter a los ratones al reto de infección, se realizó la técnica de digestión enzimática de tejido del rata, las cuales habían sido infectados experimentalmente para realizar estudios posteriores de acuerdo a la enfermedad y mantener la cepa.

Las larvas infectantes (LI) ya fuera de su capsula de colágeno es más fácil que se establezcan en el intestino delgado y lleguen a su etapa adulta para poder reproducirse (figura 4).

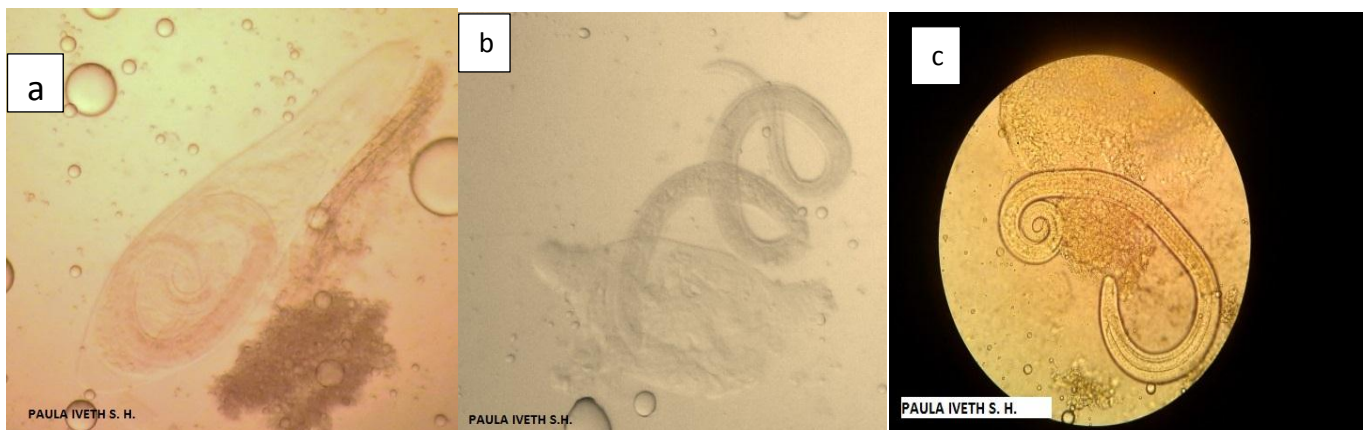


Figura 4. Obtención de LI por digestión enzimática vista a 40x. en microscopio óptico. Larva infectante encapsulada en digestión enzimática (a), larva infectante saliendo en capsula de colágeno (b), larva infectante en digestión enzimática fuera de sus cápsula de colágeno (c).

En la segunda fase tanto para el primer y segundo experimento de los ratones, después de someterlos al reto y aplicación de los anticuerpos, 7 días después se sacrificaron 5 de cada grupo obteniendo los siguientes resultados.

Para el primer experimento se obtuvo, respecto a la acción del efecto protector en intestino del Anticuerpo monoclonal anti *T. spiralis*, que existe una probabilidad de el 0.4 % que el anticuerpo monoclonal no tenga un efecto protector en intestino, teniendo $Kruskal = (X^2_{4,4} = 15.03133, p = 0.004817)$.

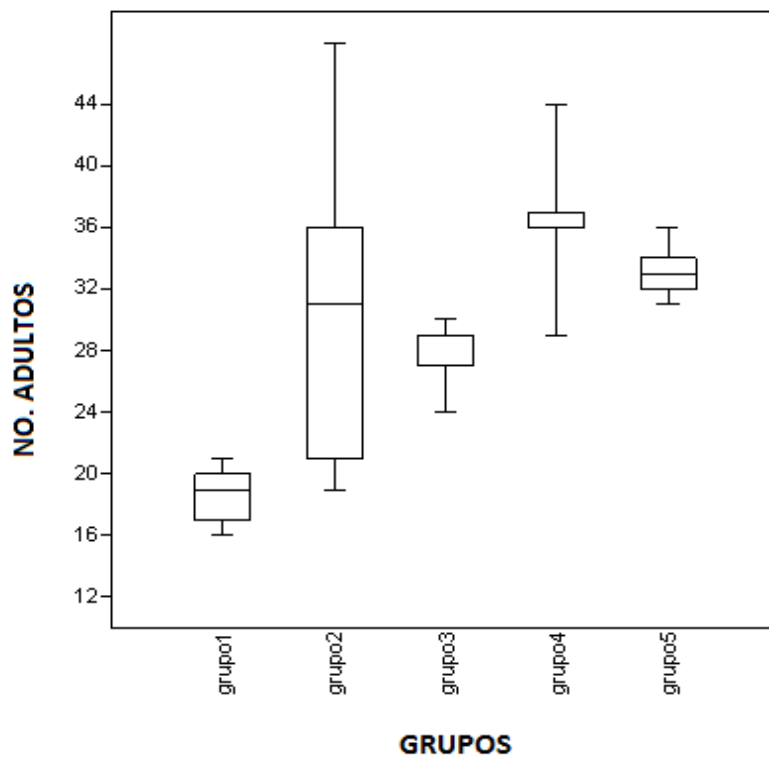


Figura 5. efecto que tiene el anticuerpo monoclonal según la cantidad de adultos encontrados

Tabla 5. Conteo de adultos de <i>T. spiralis</i> en intestino de cada grupo, del primer experimento	
Grupo	Numero Promedio de adultos
Grupo 1	18
Grupo 2	31
Grupo 3	27
Grupo 4	36
Grupo 5	33

Para el segundo experimento los resultados fueron muy similares a los del primero, en este caso la probabilidad de que el Anticuerpo monoclonal anti *T. spiralis* no tenga un efecto protector en intestino fue del 0.007%; $\chi^2_{4,4}=19.24$, $p=0.0007042$), encontrando para ambos experimentos que el grupo 1 tratado con el Anticuerpo monoclonal anti CD25 y Anticuerpo monoclonal anti *Trichinella spiralis* difiere de los demás grupos por lo tanto el Anticuerpo probado está dando resultados favorables.

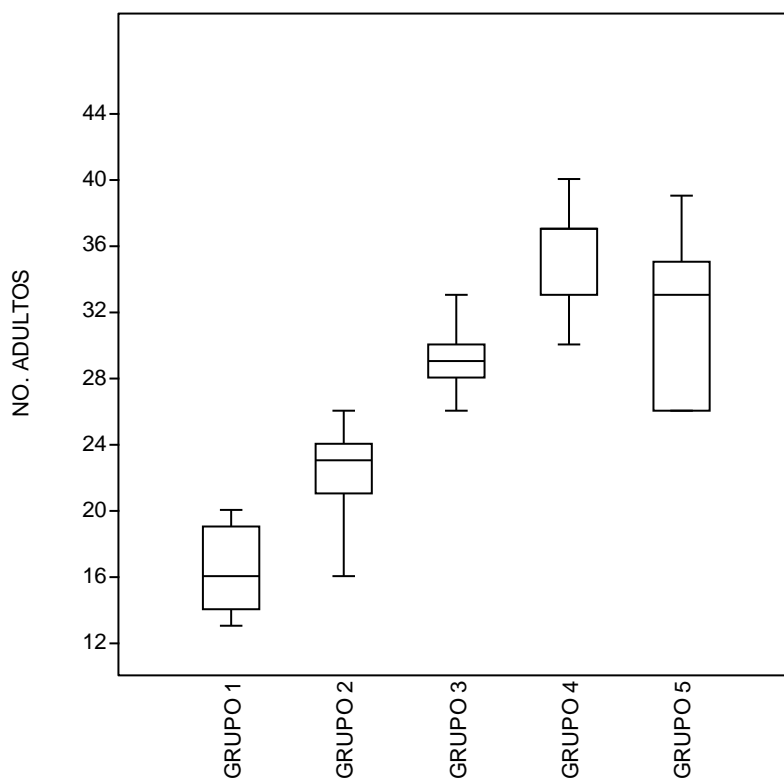


Figura 6. Efecto del Anticuerpo monoclonal en el segundo experimento.

Tabla 6 . Conteo de adultos de <i>T. spiralis</i> en intestino de cada grupo, del segundo experimento.	
Grupo	Numero Promedio de adultos
Grupo 1	16
Grupo 2	22
Grupo 3	29
Grupo 4	35
Grupo 5	31

Los nemátodos adultos que se encontraban en intestino se obtuvieron, por medio de una técnica de agitación por 2 horas con PBS 1X a una temperatura de 37 grados centígrados, para la simulación de la temperatura corporal (figura 7).

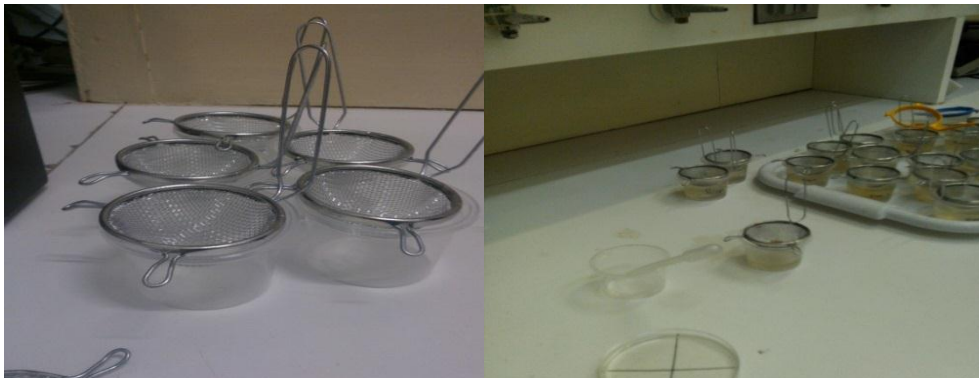


Figura 7. Material utilizado para la Técnica de obtención de adultos de *T. spiralis* en intestino.



Figura 8. Nemátodo adulto *T. spiralis* obtenido de intestino y observado en estereoscopio al 4x.

Al sacrificar los ratones restantes, después de 40 días para observar y realizar conteo de larvas musculares de *T. spiralis*, no se pudo observar la presencia del parásito en ninguno de los grupos.

Al no encontrar larvas musculares en los 25 ratones restantes tanto de primer y segundo experimento, ocasiono un dilema dentro del estudio debido que fundamentalmente estaba formulada posibilidad del hallazgo de algunas larvas. Esto nos condujo a desechar la prueba de oro (Gold test) en este caso la triquinoscopia y realizar un estudio inmunoenzomático practicado con anterioridad en ratas (Angulo 2015). Los sueros fueron testados con el Ac monoclonal quien reconoció el 100% de casos infectados, al menos una argumento positivo para excluir los grupos no desafiados, los cuales si dieron negativos en este caso al igual que los sueros controles de ratas no infectada

Los casos se determinaron positivos si los valores resultantes sobrepasaban al valor de cohorte negativo que fue igual a: ± 0.042 obtenido de la suma de dos desviaciones estándar (DS) más la media de los casos negativos (anexo 2).

7. Discusión

En base a los resultados obtenidos con la aplicación de anticuerpo monoclonal anti-*T. spiralis* en ratones Balb/c, inmunodeprimidos con anti CD25, el anticuerpo al parecer tiene un efecto favorable para el combate de *Trichiella spiralis* en la fase de larvas intestinales, al no apreciarse posinfección de estos estadios juveniles.

Las infecciones por Helmintos están asociadas con el desarrollo de un efecto protector del hospedador contra algunas afecciones patológicas y desarrollan una respuesta inmune dominante por los mecanismos de Th2. Estudios en *Nippostrongylus brasiliensis* y *Trichuris muris* (Travassos 1914) .

Una limitación del estudio es el hecho de no haber medido los niveles de IgG en los ratones, aspecto que de mejor manera pudiera explicar la no existencia de larvas o la presencia de anticuerpos en nivel bajo. Sin embargo los adultos de ambos sexos sí fueron observados. En otros estudios se ha realizado valoraciones de los niveles de anticuerpo posinfección, Sin embargo por la prolongación del estudio, este no fue realizado en su momento aspecto que se puede resolver al conservar las muestras del material biológico del ensayo.

En prácticas de inmunoterapia con Helmintos se han estudiado el potencial de las infecciones parasitarias como una importante alternativa en el control de la diabetes tipo I.(Méndez-Samperio y de la Rosa. 2015), de manera semejante otros estudios discuten la utilización de anticuerpos en el control o prevención de enfermedades. Se investigó la posible asociación entre la enfermedad Espondilitis Anquilosante (AS) y la presencia de anticuerpos contra *Toxocara* en pacientes mexicanos. Se encontró una seroprevalencia mayor de *Toxocara* en los pacientes con AS que en los individuos sanos, pero los anticuerpos no se asocian al antígeno HLA-B-57 ni con la discapacidad causada por la AS (Jiménez- Balderas et al. 2015).

Uno de los ejemplos que pudieran explicar este fenómeno es el incremento de la producción de interferones – γ (IFN- γ) al aplicar el adyuvante de Freud en infecciones con el trematodo *Fasciola hepatica* el cual se obtuvo un 86% de protección contra la infección experimental (de la Rosa, 2012). Sin embargo los gusanos adultos del trematodo digenético *F. hepatica* produce una variedad de moléculas que inciden directamente sobre la respuesta inmune no protectora por

Th2 mediada por una regulación ambiental similar a los antígenos de ES que han sido ampliamente estudiados (Gutiérrez Sánchez et al 2015).

En el estudio experimental al buscar LM en tejido no se pudieron observar, probablemente por la baja cantidad de larvas que se administraron, las cuales no se pudieron establecerse por el sistema de defensa que el mismo organismo tiene, otra causa por la que se puede suponer no haber encontrado LM depende del modelo animal con el que se esté trabajando.

Según Medina Lerena et al., (2008), mencionan que la eficiencia para reproducción en parásitos provenientes de tejido de cerdo es baja, por lo que podemos coincidir ya que usando ratas como modelo experimental pasando las cepas en ratas Wistar para poder mantenerla, a los 40 días claramente ya se podía observar el tejido infectado.

Con la ayuda de la prueba ELISA, se analizó la infección de los ratones y se pudo comprobar que sí estaba el parásito presente, ya que el organismo arroja una respuesta de defensa y contra el antígeno extraño. Esta detección de antígeno es 100% segura ya que, el anticuerpo utilizado tiene una alta especificidad. Y se puede utilizar antes de los 40 días pos-infección.

Al inmunodeprimir al ratón con el anti CD25 la respuesta de Th2 de citosinas se inhiben por lo que el organismo no da respuesta para defender a su sistema por lo que al aplicar el anticuerpo monoclonal anti *T. spiralis*, va a cumplir la función de respuesta y atacar al parásito desde la fase intestinal y ayudara a dar inmunidad contra el parásito.

Esta protección probable, fue señalada por Zumaquero et al., (2012) cuando analizaban la acción protectora del AcM ES-78 de inducir citotoxicidad sobre células Raji cubiertas con AgES de adulto de *F. hepatica* en presencia de esplenocitos y células peritoneales de ratones no estimulados. Después de 18 h de cultivo se encontró citotoxicidad específica en las diferentes relaciones células efectoras/células blanco. A mayor relación, células efectoras/células blanco, se encontró mayor porcentaje de lisis por citotoxicidad mediada por anticuerpo (CMA) sobre células raji.

Una observación que no estaba considerada dentro del experimento fue la viabilidad de las larvas cuando se congelaba la carne a menos 4 grados por mas de 4 semanas, estas larvas despues de la congelación aun presentaba movimiento y con ellas se podía realizar pase de cepa estableciéndose en el hospedador sin ningún problema.

8. Conclusiones

El efecto protector que tiene el anticuerpo monoclonal anti *T. spiralis* han sido favorable encontrando una baja cantidad de nematodos adultos en intestino y el cual también ayuda a que el parasito no se pudiera establecer en el musculo

El pase de cepa de *T. spiralis* (Msus/ ME/ 92/ CM- 92), se mantuvo por un periodo de más de 6 meses en ratas Wistar y la cantidad de larvas musculares fueron altas, siempre encontrando la triquinoscopía positiva.

La prueba de ELISA de detección de antígeno dio 100% positivo en ratones Balb/c infectados y sometidos al experimento.

9. Referencias

- Arnaiz, A; Regueiro, J; López, C.(1995). *Inmunología* .Editorial Complutense. España.
- Angulo R., (2014) *Inmunodiagnóstico de Trichinella spiralis Owen 1838 (Nematoda Adenophorea) y otros parásitos en roedores sinantrópicos, Mercados del estado de Puebla, México*. Tesis (Lic. En biología). Puebla, México. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Blázquez E., (2005), *Fundamentos moleculares de medicina*. Real academia Nacional de Medicina. Madrid, España.
- Becerril, M .(2014). *Parasitología médica*. (4° ed.). Mexico: McGraw Hill.
- Darwin Murrell K, Pozio E. (2011). Worldwide occurrence and impact of human trichinellosis, 1986-2009. *Emerging Infectious Diseases*, 17(12): 2194-2202.
- Chávez Guajardo E., Saldivar Elías S., Muñoz Escobedo J., Moreno García M., (2006). Trichinellosis una zoonosis vigente. *Revista Veterinaria*; 7(5).
- Chávez F., (2012). *Caracterización de la Respuesta Inmune e Histológica en Ratas Long Evans Inyectadas con Trichinella spiralis y Tratadas con Albendazol e Ivermectina*. Tesis (Maestría en Ciencias). Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Caracostantogolo J., Martínez M. (2009) Epidemiología de la Trichinellosis y situación en la Argentina. *Revista veterinaria de Argentina, Temas de Zoonosis IV*. Editorial Asociación Argentina de Zoonosis: 43.
- Dea Ayuela M. (1999) *Caracterización Inmunobiológica de las Especies Quísticas de Trichinella*. Tesis (Doctorado en farmacia). Universidad

Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, Departamento de Parasitología.

- Gómez Gonzales B. (2009). *Determinación de la posible actividad nematocida de cinco nuevos compuestos híbridos del bencimidazol y la nitazoxanida*. Tesis (Maestro en ciencias quimicobiológicas). México, D.F. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
- Flisser A., Pérez R. (2006). *Aprendizaje de la Parasitología basado en Problemas*. Editores de textos Mexicanos. México, D.F.
- Guanera E., Krivokapich S., Peralta J., Trabattoni E., Paoletti C., Baravalle A., Bono F., Molina V. (2006). Sistema de Diagnóstico Inmunológico de Trichinellosis Porcina ante-mortem. *Sitio Argentino de Producción Animal*. Recuperado de: <http://produccion-animal.com.ar/>
- Gutiérrez-Sánchez M., Luna-Herrera J, Trejo-Castro L, Montenegro- Cristino N., Almanza-González A, Escobar-Gutiérrez A., de la Rosa-Arana J. (2015). Influence of levamisole and Freund's adjuvant on mouse immunization with antigens of adults of the liver fluke *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758. *Folia Parasitologica*; 62: 47
- Herriman R., (2015). *Brote de triquinosis en Argentina afecta a más de 100*. Outbreak News Today. Recuperado de: <http://outbreaknewstoday.com/trichinosis-outbreak-in-argentina-affects-more-than-100/>
- Llop Hernández A., Valdés-Dapena V., Zuazo Silva J., (2001). *Microbiología y Parasitología Médica, tomo III*. La Habana. Editorial Ciencias médicas.
- Luna B., Sanchez S., (2006) Triquinosis humana. *Archivos de medicina*; 2 (4).

- Jiménez-Balderas F., Méndez-Samperio P., Tapia-Romero R., de-la-Rosa-Arana J., (2015). Relationship between antibodies to *Toxocara* and the disability of the human ankylosing spondylitis. *American journal of infectious diseases*;11(1).
- Marcet Sánchez R., Figueredo Pino M., Sarracent Pérez J. (2004) Mecanismo de acción del anticuerpo monoclonal ES-78 contra la fasciolosis. *Revista cubana medicina tropical*; 56(3): 203-207.
- Martínez-Gómez F., Santiago-Rosales R., Bautista-Garfias C.,(2009). Effect of *Lactobacillus casei shirota* strain intraperitoneal administration in CD1 mice on the establishment of *Trichinella spiralis* adult worms and on IgA anti-T. spiralis production. *Veterinary Parasitology*; 162: 171–175.
- Medina-Lerena M., Ramirez-Álvarez A., Kühne M., Gómez-Priego A., de-la-Rosa J., (2008) Influence of different processing procedures on the reproductive capacity of *Trichinella spiralis* in pork meat. *Trop Anim Health Prod*; 41:437–442.
- Moreno, M., García, E., Saldívar, S., Reveles, R., Escobedo J., (2012). Evaluación del efecto protector de 3 inmunógenos en modelo experimental murino y cerdo infectados con *Trichinella spiralis*. *Revista veterinaria*; 13(2).
- Moreno M., Maldonado Tapia C., García Mayorga E., Reveles Hernández R., Muñoz Escobedo J., (2009) Fase intestinal de *Trichinella spiralis* en modelo murino, *Acta biol. Colomb.*, Vol. 14 (1), 203 – 210.
- Murray D. (1996). *Essentials of Parasitology* (6° ed.). McGraw-Hill Science. United States of America.
- Ortega Pierres M.G., (1995). La caracterización de los antígenos de superficie del nematodo parásito *Trichinella spiralis*: estudio de su participación en los mecanismos de protección y su utilidad en el diagnóstico de la triquinosis. *Gaceta Médica México*; 131(1), 2-12.

- Pozio E, Hoberg E, La Rosa G, Zarlenga DS (2009). Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of nematodes belonging to the *Trichinella* genus. *Infection, Genetics and Evolution*;9(4):606-616.
- Quiroz, H. (1984). *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domesticos*. Mexico D.F: Limusa.
- Radovic I., Gruden A., Ilic N., Cvetkovic J., Mojsilovic S., Devic M., Sofronic L., (2015). Immunomodulatory effects of *Trichinella spiralis*-derived excretory–secretory antigens. *Immunol Res*; 61:312–325
- Randazzo V., La Sala L., Costamagna S. (2011). Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de larvas de *Trichinella spiralis*. *Revista Argentina de Microbiología*; 43: 256-262.
- Reveles R., (2011). Evaluación de la infección de *Trichinella spiralis* en cerdos gonadectomizados, Zacatecas, México. *Acta méd. peruana*; 28(4). 211-216.
- Reveles R., Villalobos R., Saldívar S., Moreno M. (1997). Implante Histológico de *Trichinella spiralis* Experimental. *Parasitología al día*; 21(4), 114-118.
- Riva E., Steffan P., Fiel C. (2007). *Trichinellosis: Aspectos múltiples de una zoonosis global*: 94-109.
- Sánchez S., Luna B., (2006), Triquinelosis: modelo de estudio y técnicas de diagnostico clínico, *Archivos de medicina*; 2 (6).
- Shuang Feng *et al* (2013). Vaccination of Mice with an Antigenic Serine Protease-Like Protein Elicits a Protective Immune Response Against *Trichinella spiralis* Infection. *Journal of Parasitology*; 99(3):426-432 .

- The Blokehead. (2015). Súper inmunidad y súper alimentos. Estados Unidos. Babelcube Inc.
- Tortora G., Funke B., Case C., (2007) *Introducción a la microbiología*. (9ªed). Buenos Aires, Argentina: Panamericana.
- Uribarren T. 2014. *Trichinelosis o Triquinelosis*. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Recuperado de: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trichinelosis.html>
- Zamora I., Berbel O., Simón J., Sanahuja M. (2002). Anticuerpo monoclonal anti-CD25 frente a anticuerpos policlonales en el trasplante renal pediátrico. *Nefrología*; 22 (1). 66-70
- Zocevic, A., Lacour, S., Mace, P., Baldissera, G., Grasset A., Vallee, I., Boireau P.(2014). Primary characterization and assessment of a *T. spiralis* antigen for the detection of *Trichinella* infection in pigs. *Veterinary Parasitology*; 558–567.
- Zumaquero Ríos J., García Juárez J., de la Rosa Arana J., Marcet R., Sarracent Pérez J. (2012). *Trichinella spiralis*: Monoclonal antibody againsts the muscular larvae for detection of circulating and fecal antigens in experimentally infected rats. *Experimental parasitology*; 132: 444-449.

Anexo 1

- La obtención de cantidad de larvas musculares por mililitro se obtiene con una regla de 3 teniendo:

$$\frac{5 \mu\text{l} \text{-----} n \text{ \# de larvas}}{5000 \mu\text{l} \text{-----} x}$$

- Cuantificando:

1. Se suspende las LM en 5ml de PBS
2. Se toman 5 μl de la suspensión, se colocan en un portaobjetos
3. Se realiza el conteo a 10x en el microscopio óptico
4. se repite el conteo en diferentes muestras para obtener una media del conteo.
5. Y por último se estima la cantidad de larvas con la regla antes mencionada.

- Conteo de adultos en intestino

1. Antes de meterla a la incubadora orbita se a agrega la misma cantidad a cada bote.
2. Después de agitación se vierte a una caja de Petri, dividida en cuadrantes.
3. Y se procede a realizar el conteo.

Anexo 2

Tabla 7. Valores positivos de detección de Antígeno por medio de ELISA experimento 1.

1	0.406 nm
2	0.224 nm
3	0.191 nm
4	0.207 nm
5	0.208 nm
6	0.207 nm
7	0.222 nm
8	0.160 nm
9	0.145 nm
10	0.240 nm
11	0.543 nm
12	0.353 nm
13	0.306 nm
14	0.277 nm
15	0.219 nm
16	0.154 nm
17	0.145 nm
18	0.144 nm
19	0.219 nm
20	0.124 nm
21	0.178 nm
22	0.213 nm
23	0.229 nm
24	0.190 nm
25	0.299 nm

Tabla 8. Valores positivos de detección de Antígeno por medio de ELISA experimento 2.

1	0.207 nm
2	0.300 nm
3	0.278 nm
4	0.258 nm
5	0.271 nm
6	0.266 nm
7	0.170 nm
8	0.160 nm
9	0.177 nm
10	0.214 nm
11	0.223 nm
12	0.133 nm
13	0.202 nm
14	0.173 nm
15	0.266 nm
16	0.270 nm
17	0.403 nm
18	0.354 nm
19	0.240 nm
20	0.146 nm
21	0.214 nm
22	0.213 nm
23	0.180 nm
24	0.189 nm
25	0.142 nm

