UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

"COMPARACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DEL INMUNÓGENO DE 45KDA DE *Trichinella spiralis* ADMINISTRADO POR VÍA SUBLINGUAL Y VÍA TRADICIONAL EN MURINOS INFECTADOS CON *Trichinella spiralis*"

Por

M. en C. FRANCISCA CHÁVEZ RUVALCABA

Como requisito parcial para obtener el grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Junio 2016

I. AGRADECIMIENTOS

Principalmente a Dios que ha permitido lograr un paso más en mi vida.

A mi familia, lo más importante en mi vida: Rito Chávez, Bertha Ruvalcaba, Isabel, Ángel, Gaby, Mariana, y mis sobrinos: Luis, Leo y Tania.

A la Dra. en C. Isabel Chávez Ruvalcaba por nunca dejarme sóla a pesar de mi mal carácter, por su apoyo, tiempo y paciencia, un día recomepansaré cada esfuerzo que has hecho por mi.

A la Dra. Alejandra Moreno García por permitir que me formara tanto académica, científica y socialmente, culminamos un proyecto más y siempre en mi estará el profundo agradecimiento hacia el esfuerzo empleado en mi.

Al Dr. Mario Morales Vallarta y la Dra. Porfiria Barrón por sus grandes enseñanzas, estén seguros que tienen un lugar no solo en mi mente si no en mi corazón.

Al Dr. Carlos Eduardo Luna por haber aceptado el reto de continuar con el proyecto y por sus valiosas aportaciones.

A todo el comité doctoral por su valioso apoyo para la realización de este proyecto: Dra. Lizet Villarreal, Dr. Francisco Contreras.

Al Dr. José Santos por las facilidades brindadas para la culminación del proyecto.

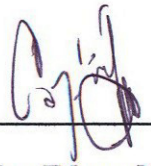
Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo para la realización del Doctorado.

Al Laboratorio de Biología Celular y Microbiología de la Universidad Autónoma de Zacatecas por permitirme formarme durante 7 años.

A mis compañeros y amigos que han hecho que mi camino sea más placentero: Sandra, Bety, Ross, Cynthia, Karla, Olivia, Yersi, Linda, Raúl, Misael, Javier.

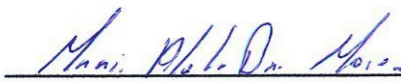
COMPARACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DEL INMUNÓGENO DE 45KDA DE *Trichinella spiralis* ADMINISTRADO POR VÍA SUBLINGUAL Y VÍA TRADICIONAL EN MURINOS INFECTADOS CON *Trichinella spiralis*

Comité de Tesis



Dr. en C. Carlos Eduardo Luna Hernández

Director



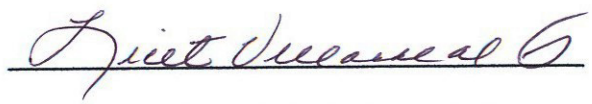
Dr. en C. María Alejandra Moreno García

Director Externo



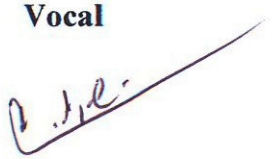
Dr. en C. María Porfiria Barrón González

Secretario



Dr. en C. Licet Villarreal Treviño

Vocal



Dr. en C. Juan Francisco Contreras Cordero

Vocal

II. DEDICATORIA

A mis padres: Bertha Ruvalcaba y Rito Chávez por su invaluable ayuda, cariño y comprensión, a mis hermanos: Isabel, Ángel, Gaby y Mariana y a mis sobrinos: Tanía, Luis y Leo.

III. TABLA DE CONTENIDO

	Tema	Página
I.	**AGRADECIMIENTOS**	iii
II.	**DEDICATORIA**	iv
III.	**TABLA DE CONTENIDO**	v
IV.	**LISTA DE FIGURAS Y GRÁFICAS**	vii
V.	**LISTA DE TABLAS**	x
VI.	**NOMENCLAURA**	xii
1.	**RESUMEN**	1
	1.1 ABSTRACT	2
2.	**INTRODUCCIÓN**	3
3.	**DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**	5
4.	**OBJETIVOS**	6
	4.1 Objetivo General	6
	4.2 Objetivos Específicos	6
5.	**HIPÓTESIS**	7
6.	**ANTECEDENTES**	8
	6.1 Generalidades	8
	6.2 Epidemiología	10
	6.3 Morfología	13
	6.4 Estadios caracteristicos del ciclo vital de *T. spiralis*	14
	6.5 Ciclo de vida	16
	6.5.1 Formación de célula nodriza	18
	6.6 Cuadro clínico	23
	6.7 Inmunología	23
	6.7.1 Proteína 45 kDa	25
	6.8 Diagnóstico	30
	6.9 Tratamiento	33
	6.10 Inmunoterapia	35
	6.11 Adyuvantes inmunólogicos	40
7.	**MATERIAL Y MÉTODOS**	41
	7.1 Material biológico	41
	7.2 Diseño experimental	41
	7.3 Estrategia experimental	42
	7.4 Elaboración inmunógeno 45kDa	43
	7.5 Extracción antígeno soluble total (AST)	43
	7.6 Determinación de proteínas	43
	7.7 Corrimiento electroforético	44
	7.8 Elución del inmunógeno de 45kDa de *T. spiralis*	44
	7.9 Técnicas directas	45

7.10 Carga parasitaria 45
7.11 Tinción azul tripano 45
7.12 Técnica de tinción hematoxilina-eosina 46
7.13 Manejo de animales y obtención de muestra 47
7.14 Técnica intradermorreacción 47
7.15 Técnica microinmunodifusión 48
7.16 Técnica Dot-ELISA 48
7.17 Técnica inmunoelectrotransferencia 49
7.18 Técnica inmunofluorescencia 50
7.19 Modelo estadístico 50

8. **RESULTADOS** 52
8.1 Análisis estadístico 83

9. **DISCUSIÓN** 86

10. **CONCLUSIONES** 100

11. **BIBLIOGRAFÍA** 101

12. **ANEXOS** 115

IV. LISTA DE FIGURAS Y GRÁFICAS

Figura o gráfica **Página**

1. Distribución geográfica de *Trichinella spiralis* 11
2. Fuente de brotes de Trichinellosis 13
3. Esquema de composición de parásitos 15
4. Formación de la célula nodriza 19
5. Ciclo de vida de *Trichinella spiralis* 20
6. Cuadro clínico de *T. spiralis* de acuerdo al tiempo de infección 23
7. Gráfica de curva de absorbancia en determinación de Proteína de AST por método de Bradford 53
8. Secuencia total obtenida del antígeno obtenido en el Laboratorio de Biología Celular y Microbiología, UACB, UAZ (Chávez, 2013) 54
9. Microinmunodifusión y esquema representativo de la Interacción Ag-Ac grupo 1, 2, 4 y 6 55
10. Microinmunodifusión y esquema representativo de la Interacción Ag-Ac grupo 1, 2, 3 y 5 55
11. Dot-ELISA del grupo sano y grupo control infectado a diferentes tiempos con IgA, IgM e IgG 57
12. Dot-ELISA de los grupos 3, 4, 5 y 6 realizadas con IgG 58
13. Dot-ELISA realizada a los sueros de los murinos del grupo 3 58
14. Dot-ELISA realizada a los sueros de los murinos del grupo 4 60
15. Dot-ELISA realizada a los sueros de los murinos del grupo 5 61
16. Dot-ELISA realizada a los sueros de los murinos del grupo 6 62
17. Inmunoelectrotransferencia de los sueros obtenidos de grupos experimentales con anticuerpo IgA 63
18. Inmunoelectrotransferencia de los sueros obtenidos de grupos experimentales con anticuerpo IgM 64
19. Inmunoelectrotransferencia de los sueros obtenidos de grupos experimentales con anticuerpo IgG 65

20. Inmunoelectrotransferencia de los sueros obtenidos de grupos experimentales con anticuerpo policlonal (IgA, IgM e IgG) 65

21. Inmunofluorescencia en sueros del grupo 1 (control sano) y grupo 2 (control infectado) 67

22. Inmunofluorescencia en sueros del grupo 3 (inmunizado vía parenteral y retado) 68

23. Inmunofluorescencia en sueros del grupo 4 (infectado e inmunizado vía parenteral) 69

24. Inmunofluorescencia en sueros del grupo 5 (inmunizado vía sublingual y retado) 70

25. Inmunofluorescencia en sueros del grupo 6 (infectado e inmunizado vía sublingual) 71

26. Corte histológico analizado por compresión de tejido de grupo 1 72

27. Corte histológico analizado por compresión de tejido de grupo 2 72

28. Corte histológico analizado por compresión de tejido de grupo 3 73

29. Corte histológico analizado por compresión de tejido de grupo 4 73

30. Corte histológico analizado por compresión de tejido de grupo 5 74

31. Corte histológico analizado por compresión de tejido de grupo 6 74

32. Cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina del grupo 1 74

33. Cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina del grupo 2 75

34. Cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina del grupo 3 75

35. Cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina del grupo 4 76

36. Cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina del grupo 5 76

37. Cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina del grupo 6 77

38. Evaluación de la triple respuesta de Lewis 77

39. Gráfica del edema presentado en cada uno de los murinos 78

40. Gráfica de la temperatura presentada en cada uno de los murinos 79

41. Gráfica del número de larvas por medio de digestión artificial 80

42. Larvas infectantes obtenidas por digestión artificial (DA) del grupo 2 80

43. Larvas infectantes obtenidas por digestión artificial (DA) del grupo 3 81

44. Larvas infectantes obtenidas por digestión artificial (DA) del grupo 4 81

45. Larvas infectantes obtenidas por digestión artificial (DA) del grupo 5..... 81

46. Larvas infectantes obtenidas por digestión artificial (DA) del grupo 6 81

47. Compresión de tejido en muestras obtenidas de ratón BALB/c para reproducción del ciclo biológico de *T. spiralis* 82

48. Compresión de tejido en muestras obtenidas de ratón BALB/c para reproducción del ciclo biológico de *T. spiralis* 83

49. Gráfica de interacción del porcentaje del número de larvas con los diferentes tratamientos por medio de Tukey 84

50. Comparación por Western-Blot de sueros con anti-*T. spiralis* 97

V. LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Relación de los casos de Trichinellosis reportados a nivel mundial	12
2.	Clasificación taxonómica de *Trichinella spiralis*	13
3.	Especies de *Trichinella*, distribución y hospedador en el hábitat natural	14
4.	Tiempo en que pasa cada fase de la infección	21
5.	Esquema de etapas implicadas en el ciclo de vida de *Trichinella spiralis* y respuesta inmunólogica	26
6.	Comparativo porcentual entre los métodos inmunoserológicos empleados para detección de Trichinellosis	33
7.	Comparativo de tratamientos farmacológicos para Trichinellosis	34
8.	Comparación entre los mecanismos de acción en la inmunoterapia	36
9.	Grupos utilizados para el método experimental	42
10.	Absorbancia en determinación de proteína de AST por método de Bradford	52
11.	Caracteristicas de las proteínas obtenidas de antígeno soluble total (AST)	54
12.	Interacción Ag-Ac por medio de microinmunodifusión	56
13.	Interacción Ag-Ac por Dot-ELISA del grupo sano y grupo control infectado a diferentes tiempos	57
14.	Interacción Ag-Ac por Dot-ELISA del grupo sano y grupo control infectado a diferentes tiempos	58
15.	Interacción Ag-Ac por Dot-ELISA del grupo 3 a diferentes tiempos	59
16.	Interacción Ag-Ac por Dot-ELISA del grupo 4 a diferentes tiempos	60
17.	Interacción Ag-Ac por Dot-ELISA del grupo 5 a diferentes tiempos	61
18.	Interacción Ag-Ac por Dot-ELISA del grupo 6 a diferentes tiempos	62
19.	Resultados de inmunofluorescencia del grupo 1 y 2	67

20. Resultados de inmunofluorescencia del grupo 3 68

21. Resultados de inmunofluorescencia del grupo 4 69

22. Resultados de inmunofluorescencia del grupo 5 70

23. Resultados de inmunofluorescencia del grupo 6 71

24. Edema presentado en cada uno de los murinos a diferentes tiempos 78

25. Temperatura presentada en cada uno de los murinos a diferentes tiempos . 78

26. Relación de la reproducción del ciclo de ratones BALB/c 82

27. ANOVA para larvas infectantes por grupo 83

28. Tabla de cuadros medios de número de larvas infectantes con intervalos de confianza del 95% 84

29. ANOVA para la respuesta de hipersensibilidad retardada 85

30. Niveles de protección contra Trichinellosis, obtenidos de diferentes Formulaciones de vacunas 90

31. Interpretación de intradermorreacciones 95

32. Determinación de IgG anti-*Trichinella* en ratones con *T. spiralis* y otros parásitos por ELISA con tres diferentes preparaciones de antígenos 98

VI. NOMENCLATURA

Ac	Anticuerpo
Acs	Anticuerpos
Ag	Antigeno
Ag-Ac	Antigeno-Anticuerpo
AST	Antigeno soluble total
CCDA	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
$CHCl_3$	Cloroformo
CI	Control infectado
CIEF	Contrainmunoelectroforesis
cm	Centímetro
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CS	Control sano
d	Días
DA	Digestión artificial
DAB	Diaminobencidina
RHR	Reacción de hipersensibilidad retardada
EGPA	Electroforesis en geles de poliacrilamida
ELISA	Técnica de ensayo inmuno absorbente con enzima unida
ES	Excretorio-secretorio
FB	Floculación de bentonita
FI	Fase intestinal
g	Gramo
h	Hora
HAI	Hemoaglutinación indirecta
HCl	Ácido clorhídrico

H-E	Hematoxilina-Eosina
hs	Horas
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
IDR	Intradermorreacción
IET	Inmunoelectrotransferencia
IFI	Inmunofluorescencia
IL	Interleucina
INFY	Interferón gama
IgA	Inmunoglobulina tipo A
IgG	Inmunoglobulina tipo G
IgM	Inmunoglobulina tipo M
IMSS	Instituto Mexicano de Seguro Social
IPN	Instituto Politécnico Nacional
IT	Inmunoterapia
kDa	kilodaltons
kg	Kilogramos
LI	Larva infectante
LM	Larva muscular
LRN	Larva recién nacida
PC	Antígenos de fosforilcolina
pH	Potencial Hidrógeno
SIgA	Inmunoglobulina A secretoria
TA	Temperatura ambiente
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante beta
Th	T cooperador
T. spiralis	*Trichinella spiralis*
T. nativa	*Trichinella nativa*

T. britovi	*Trichinella britovi*
T. murelli	*Trichinella murelli*
T. nelsoni	*Trichinella nelsoni*
M	Molar
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
NC	Nitrocelulosa
nm	Nanómetros
NOM	Norma Oficial Mexicana
PBS	Solución básica de Fosfatos
ppm	Pares por millón
PI	Post-infección
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Docecil sulfato de sodio
U	Unidades
V.I.T.S.	Adyuvante comercial para inmunoterapia sublingual
WTB	Western Blot
µ	Micras
µL	Microlitro
µm	Micrometros
%	Porciento
°C	Grados centigrados
+	Positivo
—	Negativo

1. RESUMEN

La trichinellosis es una enfermedad parasitaria zoonótica y cosmopolita que afecta a mamíferos, entre ellos el hombre. La infestación se debe al consumo de carne deficientemente cocida, proveniente del cerdo en nuestro país. Diversos estudios avalan la eficiencia de la administración de inmunoterapia por vía sublingual, pero aún no se ha demostrado la acción sobre la respuesta inmunitaria. Se ha caracterizado un antígeno inmunodominante la proteína de 45 KDa. En este trabajo se plantea como objetivo comparar el efecto protector del inmunógeno de 45 kDa de *Trichinella spiralis* (*T.* spiralis) administrado por vía sublingual y vía tradicional (parenteral) en murinos infectados con *T. spiralis*. Dentro de los materiales y métodos se utilizaron 36 murinos (hembras de la cepa Long Evans), 6 para la infección y purificación del antígeno de 45kDa, 30 para formar los grupos de trabajo, control sano (6 murinos), control infectado (6 murinos), y 24 para los grupos experimentales, se inmunizaron 2 grupos con 4 dosis (0, 7, 14 y 21 días) del inmunógeno de 45 KDa de *T. spiralis*, uno por vía sublingual y otro por vía parenteral y se retaron con 500 larvas infectantes (LI) de *T. spiralis* 7 días después de la ultima inmunización y dos grupos más se infectaron con 500 LI y se inmunizaron a las 4 semanas postinfección por ambas vías. La respuesta se evaluó por: técnicas directas: compresión de tejido para observar las características morfológicas de la célula nodriza, digestión artificial para cuantificar la carga parasitaria y tinción de azul tripano para viabilidad de LI de *T. spiralis, y* características histológicas por medio de la técnica de tinción con Hematoxila-Eosina y técnicas indirectas como Intradermorreacción (IDR), Dot-Elisa, Microinmunodifusión doble (MIDD), Inmunoelectrotransferencia (IET) e Inmunofluorescencia (IFI) para determinar la respuesta humoral con anticuerpos de clase IgG, IgM e IgA, se concluyo que el antígeno de 45kDa de *T. spiralis* es una alternativa para la prevención, control y tratamiento ya que en cada unos de los grupos experimentales disminuyo la carga parasitaria, siendo la vía sublingual la más efectiva con una disminución del 50% de la carga, además se logro activar la respuesta inmunológica por vía humoral desde la tercera inmunización por ambas vías, el análisis estadístico arrojo que el estudio presenta un P value < 0.05 mostrando que es estadísticamente significativo, con un nivel de confianza del 95%.

1.1 ABSTRACT

The trichinellosis is a cosmopolitan zoonotic parasitic disease that affects mammals, including man. The infestation is due to consumption of poorly cooked meat from the pig in our country. Several studies support the effectiveness of the administration of sublingual immunotherapy, but has not yet demonstrated the action on the immune response. We have characterized an immunodominant protein antigen 45 KDa. This paper therefore seeks to compare the protective effect of 45 kDa immunogen of *Trichinella spiralis* and sublingually administered parenterally infected with T. *spiralis* in murine. Within 42 murine materials and methods (female Long Evans strain) is used, 6 are used for infection and 45kDa antigen purification, 30 to form working groups, healthy (6 murine) Control, infected (6 murine), and 24 for the experimental group, 2 groups with 4 doses (0, 7, 14 and 21 days) of the 45kDa immunogen of *Trichinella spiralis*, a sublingual and another will be immunized parenterally and challenge you with 500 infective larvae (LI) of *Trichinella spiralis* 7 days after the last immunization and two more groups will be infected with LI 500 and immunized at 4 weeks post-infection by both routes. The response was evaluated by compression of tissue to observe the morphological characteristics of the mother cell, artificial digestion and trypan blue staining to quantify the parasitic load and the viability of *T. spiralis* LI, and histologic characteristics by technique Hematoxila-eosin staining and indirect techniques such as intradermal (IDR), Dot-ELISA, double Microinmunodifusión (MIDD), Immunoelectrotrasference (IET) and immunofluorescence (IFI) to determine the humoral antibody response of IgG, IgM and IgA, it was concluded that the 45 kDa antigen of *T. spiralis* is an alternative for the prevention, control and treatment as in each of the experimental groups decreased parasite burden, being the most effective sublingual with a 50 % charge in addition he managed to activate the immune response via humoral from the third immunization by both routes, statistical analysis showed that the study has a P value < 0.05 showing that it is statistically significant, with a confidence level of 95% .

2. INTRODUCCIÓN

La trichinellosis es una enfermedad parasitaria zoonótica que afecta a mamíferos silvestres y domésticos, se trasmite de modo accidental al hombre por ingestión de carne o productos cárnicos insuficientemente cocidos, procedentes de animales infectados (Ilic *et al.,* 2012; Gu *et al.,* 2013; Bruschi y Dupouy-Camet, 2014; Chu *et al.,* 2014; Cui *et al.,* 2014; Ilic *et al.,* 2014; Wang *et al.,* 2014; Wei *et al.,* 2015; Zhang *et al.,* 2016), *Trichinella* puede infectar a más de 150 tipos de animales, incluyendo seres humanos, cerdos, roedores y caninos (Yang *et al.,* 2014).

Es una enfermedad que no sólo afecta la salud pública al afectar a pacientes humanos, si no también representa un problema económico en la producción animal porcina y la seguridad alimentaria (Cui *et al.,* 2014; Gao *et al.,* 2014; Lia *et al.,* 2014; Wang *et al.,* 2014). La Organización Mundial de la Salud (OMS) la clasifica como una de las principales enfermedades parasitarias de transmisión alimentaria de mayor impacto mundial (FAO/WHO, 2014).

Debido a la importancia zoonótica, los principales esfuerzos en muchos países se ha centrado en el control y eliminación del parásito en la cadena alimentaria (Gajadhar *et al.,* 2009; Molina *et al.,* 2012). Es importante mencionar la dificultad y baja incidencia de detección de la enfermedad, el ineficiente control sanitario en la canal del cerdo contaminado y la práctica frecuente de matanza clandestina en animales de traspatio.

Trichinella spiralis (*T. spiralis*) se encuentra entre los patógenos con mayor complejidad antigénica, esta enfermedad tiene problemas al diagnóstico en los humanos y animales, pero la técnica de Western Blot (WB) detecta el patrón característico del triplete inmunodominante de la enfermedad de 43, 45 y 48kDa característico de la enfermedad (Maldonado *et al.,* 2007; Salinas *et al.,* 2007), mientras otros autores manejan que el triplete característico es 45, 49 y 53kDa (Ilic *et al.,* 2014).

Las vacunas son la tecnología sanitaria más eficaz, junto con los programas de inmunización, son intervenciones de mayor rentabilidad en salud pública, se logran mayores beneficios (Solórzano *et al.,* 2004).

El predominio global de la enfermedad es difícil de evaluar se calcula que 11 millones de personas pueden ser infectados (Wei *et al.,* 2011; Lia *et al.,* 2014; Yang *et al.,* 2015), mientras que Ilic *et al.,* en el 2014 estiman que el número de casos en el mundo es de 2,500 personas por año. Los estudios en México sugieren que la parasitosis se distribuye en la zona centro del país, sin embargo la situación actual de la trichinellosis humana no refleja la verdadera situación epidemiológica de la enfermedad parasitaria en México, permite mantener al parásito muy cerca de la población humana, en forma de infección de los cerdos de traspatio y otros animales como el caballo, que eventualmente y sin control sanitario, puede usarse como carne de consumo (Medina *et al.,* 2006).

Los hábitos alimenticios de la población son inadecuados, ya que cuando un animal muere disponen de su carne como alimento y abandonan los restos sobre la superficie del suelo dejando que los perros, cerdos, consumidores de carroña y otro tipo de animales se alimenten de ello.

La importancia de este estudio se fundamenta en conocer nuevas alternativas para el control y/o erradicación de la enfermedad parasitaria causada por *T. spiralis*, y como ya se ha mencionado una de las mayores contribuciones para muchas enfermedades son las vacunas, las cuales ayudan a proteger al organismo de patógenos.

En los últimos años, se han realizado muchos esfuerzos para desarrollar una vacuna contra la enfermedad, incluyendo vacunas a base de extractos de larvas crudos, productos de excreción-secreción (ES), ADN, o proteínas recombinantes, los cuales han inducido inmunidad protectora parcial en modelos animales (Gu *et al.,* 2013), como ratones, ratas y cerdos.

3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La patología causada por la trichinellosis ha afectado la calidad de vida de los humanos, pérdidas económicas en la ganadería (principalmente en la porcinocultura) y afección en la vida silvestre de varias especies animales. Es una enfermedad zoonótica, endémica y cosmopolita que sigue estando vigente.

A lo largo del tiempo se ha estudiado la biología de *T. spiralis*, así como el comportamiento inmunológico que presenta el hospedero, para buscar métodos de control, erradicación y tratamiento de la trichinellosis. El desconocimiento por parte de los servicios de salud (diagnóstico inadecuado al no realizar diagnóstico diferencial con otros trastornos gastrointestinales y el desconocimiento en la sintomatología de la enfermedad) ha propiciado que no se haya eliminado o existan mecanismos de control estandarizados para la enfermedad. Además de la resistencia por el manejo inadecuado de los tratamientos que cada vez es mayor a los diferentes fármacos utilizados para el tratamiento, favoreciendo la permanencia de la enfermedad.

La importancia del estudio radica en conocer una nueva alternativa para evitar que se adquiera la enfermedad, así como la disminución de la afección por ésta, y mejoría en la sintomatología, todo esto evitando la toxicidad que presentan muchos fármacos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Comparar el efecto protector del inmunógeno de 45kDa de *Trichinella spiralis* administrado por vía sublingual y vía parenteral en murinos infectados con *Trichinella spiralis.*

4.2 Objetivos Específicos

1. Determinar la cinética de la respuesta inmune humoral en animales al administrar el inmunógeno de 45 KDa vía sublingual y retarlos con LI de *T. spiralis,* por medio de las técnicas de Dot ELISA, Western Blot, Inmunofluorescencia, para determinar los anticuerpos de clase IgG, IgM e IgA.
2. Determinar la cinética de la respuesta inmune en animales a los cuales se les administró el inmunógeno de 45 kDa vía parenteral y retarlos con LI de *T. spiralis,* por medio de las técnicas de Dot ELISA, Western Blot, Inmunofluorescencia, para determinar los anticuerpos de clase IgG, IgM e IgA.
3. Comparar los dos esquemas de inmunización ante la infección por *T. spiralis.*
4. Comparar las modificaciones morfológicas y la viabilidad de la célula nodriza en murinos tratados con el inmunógeno de 45 KDa por medio de Compresión de Tejido y las modificaciones histológicas por Hematoxilina-Eosina.
5. Evaluar el mecanismo inmunológico de hipersensibilidad retardada por la aplicación del inmunógeno de 45kDa de *T. spiralis* por medio de la Triple respuesta de Lewis.
6. Cuantificar la carga parasitaria y viabilidad de LI de *T. spiralis* en control infectado por *T. spiralis* e inmunizados por vía sublingual y vía parenteral con el antígeno de 45 KDa, por digestión artificial y tinción de azul tripano.
7. Verificar de la reproducción del ciclo biológico de los diferentes grupos en ratones BALB/c.

5. HIPÓTESIS

La aplicación con el inmunógeno de 45 kDa de *Trichinella spiralis,* vía sublingual y vía parenteral confieren protección contra la infección por *Trichinella spiralis* a modelo murino.

6. ANTECEDENTES

6.1 Generalidades

En los últimos 30 años, la humanidad ha observado la emergencia o reemergencia de las enfermedades infecciosas. Los procesos que han conducido a la emergencia de estas infecciones son diversos y complejos destacándose el deterioro del ambiente, el cambio climático, la evolución y resistencia de los microorganismos a las drogas de elección, el deterioro de los sistemas de salud, el incremento de los viajes y de las migraciones y máxime las deficientes condiciones de vida y la pobreza. En el siglo XXI, las enfermedades infecciosas continúan afectando a la población mundial e incrementan la carga de enfermedad, discapacidad y muerte. Más allá de la enfermedad *per se*, los agentes infecciosos pueden desestabilizar las poblaciones, las economías y los gobiernos (Guzmán, 2012).

La prevención y el control de todas estas enfermedades es fundamental para la salud a escala individual, nacional, regional y global. En este contexto, el desarrollo de la ciencia, y en particular de los nuevos conocimientos con relación a la patogenia de las infecciones, la relación huésped-parásito, el desarrollo de drogas y vacunas, el desarrollo de mejores sistemas de vigilancia y políticas de salud, la aplicación de los avances científicos, la capacitación del personal y el intercambio de información a todos los niveles son fundamentales para la mejor prevención y el enfrentamiento de estas entidades. En este sentido, las sociedades científicas desempeñan un papel fundamental, aunando especialistas muchas veces de diferentes disciplinas, pero con un objetivo común, el enfrentamiento de las enfermedades infecciosas y parasitarias, así como la facilitación del intercambio científico y el desarrollo de la ciencia (Guzmán, 2012).

El número de enfermedades producida por helmintos excede al de la población humana; y de ésta, se estima que más de 11 millones de individuos podrían estar infectados por *T. spiralis* en todo el mundo (Wei *et al.,* 2011; Lia *et al.,* 2014; Yang *et al.,* 2015), los parásitos del género *Trichinella* son algunos de los patógenos zoonóticos más extendidos en el mundo (Tolnai *et al.,* 2014), la modulación de la respuesta inmune por helmintos implica las proteínas excresión-secresión liberados

por estos parásitos, incluyendo proteasas, inhibidores de proteasa, homólogos de alérgenos, las enzimas glucolíticas, lípidos y glicanos (Wang *et al.,* 2014). *T. spiralis* es el agente etiológico de la mayoría de las infecciones humanas y muertes causadas por trichinellosis a nivel mundial (Bien *et al.,* 2012).

La trichinellosis es una enfermedad endémica y zoonótica en todo el mundo (Mitreva *et al;* 2011; Bien *et al.,* 2012; Yera *et al.,* 2013) y una de las más importantes trasmitidas por alimentos (Wei *et al.,* 2011; Gu *et al.,* 2013; Yang *et al.,* 2015), una enfermedad que no sólo es considerada como un problema de salud pública (Correa, 2006; Gottstein *et al.,* 2009; Wang *et al.,* 2014) sino que también representa un problema económico en la producción animal porcina y la seguridad alimentaria (*Gu et al.,* 2013; *Lia et al.,* 2014; Yang *et al.,* 2015), por eso los principales esfuerzos en muchos países se ha centrado en el control y eliminación de *trichinella* en la cadena alimentaria (Gottstein, 2009). La trichinellosis a causa de su baja especificidad para reproducirse y mantenerse en todos los ambientes, su amplio rango de infección ha sido posible por la adaptación y evolución de distintas especies y genotipos dentro del género (Steffan, 2006).

Se conocen tres ciclos epidemiológicos:

1. Silvestre. Se presenta en carnívoros que se alimentan de presas vivas o de cadáveres de animales infectados, el hombre puede ser involucrado como hospedero accidental.
2. Doméstico. Está relacionado principalmente en la porcinocultura, su principal vía de transmisión es por la ingestión de cerdo, ratas y animales salvajes.
3. Sinatrópoco. Que es una combinación entre el sílvestre y el doméstico, en él intervienen gatos, perros, zorros, así como algunos otros animales silvestres (Martínez, 1998).

En México se sabe que la enfermedad tiene una frecuencia de hasta del 8.1% de la población en general (Correa, 2006). El nemátodo *T. spiralis* es la causa más común de la trichinellosis humana (Mitreva *et al.,* 2011).

6.2 Epidemiología

Trichinella fue observada por primera vez en el año 1828, en músculos procedentes de autopsias de cadáveres humanos en el hospital Guy de Londres en Peacok y por Hilton en 1833 sin que llegaran a establecer la naturaleza del agente, el descubrimiento se le atribuye a James Paget estudiante del primer año de medicina en el hospital San Bartolomé de Londres en 1835. El zoólogo británico Richard Owen en 1835, estudió porciones de músculo pertenecientes a Paget y descubrió el parásito al cual llamó *Trichina spiralis* (Ramírez, 1981; Lloyd, 2000).

La trichinellosis ha sido documentada en 55 países y es considerada como una enfermedad emergente/reemergente, en las últimas décadas, muchos brotes de triquinelosis humana han sido reportados (Figura 1) (Wei *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2014), la infección tiene una tasa de mortalidad del 0.2% (Lia *et al.*, 2014).

Herbst en Alemania en 1845 observó la *trichinella* en el gato y fue el primero en señalar que un animal que come carne infectada desarrolla el parásito en los músculos; logró infectar un tejón con carne de cerdo infectada y posteriormente alimentó con la carne de tejón a tres perros jóvenes, reproduciendo la enfermedad (Ramírez, 1981). Leuckart en 1856 y Virchow en 1859 que en el nuevo huésped las larvas de *trichinella* son liberadas de los quistes por la digestión, después de la ingestión de carne contaminada y se desarrollan posteriormente en el intestino. En 1863, debido a los severos brotes en Alemania (Arriaga *et al;* 1995, Jansen *et al;* 2008). El género fue reclasificado con el nombre actual de *T. spiralis*, por Raillet en 1985 debido a que el primero ya había sido dado a otro organismos (Steffan, 2006).

En la Unión Europa las infecciones por *Trichinella,* se relacionan con el consumo de animales importados y las prácticas de consumo del hombre, las infecciones de los últimos años en Francia e Italia ha sido por el consumo de carne de caballo (Lloyd, 2000).

En Estados Unidos menos de 100 casos ocurren al año, esto de manera esporádica en casos aislados por el consumo de animales salvajes y por la costumbre de algunas personas de consumir carne mal cocida, en los últimos 80 años afectó a cerca de 10 a

15 millones de personas y su prevalencia es muy similar a Europa y Asia, al igual que en Japón y China, donde de 1990 a 1999 se presentaron 5 412 casos, de los cuales 24 murieron. Las infecciones por *Trichinella* en países de Latinoamérica principalmente Argentina, Chile, Uruguay, México y en las Islas Bahamas es considerada endémica y evoluciona en brotes esporádicos, la existencia del parásito se ha demostrado en estudios necrópsicos con un porcentaje aproximado entre el 4 y el 15%, la infección es rara en países que han adoptado leyes que limitan la alimentación de desperdicios crudos en cerdos criados comercialmente (Chávez *et al.*, 2006).

En México, la infección por *Trichinella* fue descrita por primera vez en 1981 por Zúñiga. Por otra parte, se ha reportado una incidencia de alrededor de 2.5% de la población general, por lo que es considerado un problema de salud pública (Latin salud, 2001). Se reportaron casos esporádicos en pacientes con afiliación al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) entre 1976 y 1985, especialmente en algunos estados como Zacatecas, Durango, Estado de México, Guanajuato y Distrito Federal (Fig. 1), estos casos fueron ocasionados por la ingestión de carne de cerdo cruda o mal cocida y salchichas (Carrada, 1992).

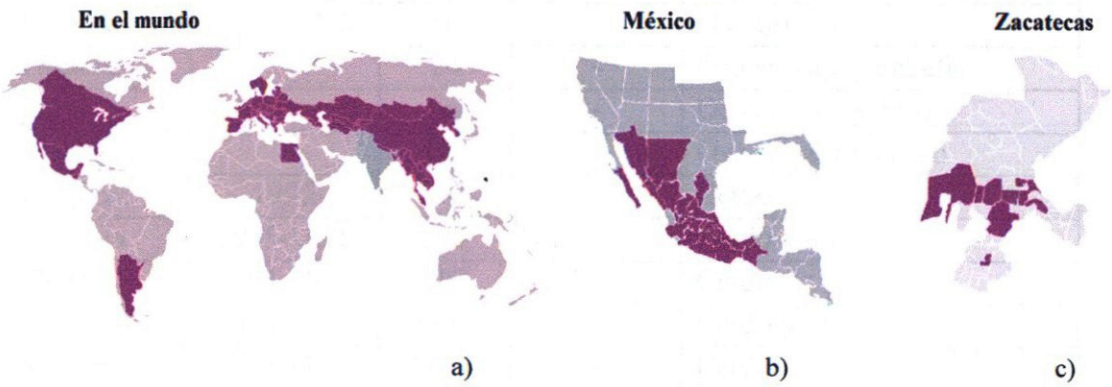


Fig. 1. Distribución Geográfica de *T. spiralis*: en las tres imágenes se aprecia en color morado obscuro la distribución geográfica del parásito, a) En el mundo, b) México y c) Zacatecas (Chávez, 2012).

La trichinellosis es una enfermedad que constituye un problema de salud pública (Valencia, 2003; Cui *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). Es una zoonosis cosmopolita,

sobre todo en aquellos países en vías de desarrollo, estrechamente relacionada a hábitos culturales ya a la dieta (Valencia, 2003).

En la Tabla 1, se muestra la relación de casos de trichinellosis reportados a nivel mundial en el periodo de 1992 a 1997 en donde la fuente principal es el cerdo (Venturiello *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2014), que concuerda con el reporte publicado por ProMed-mail (Fig. 2), donde el 64% de los brotes de trichinellosis proviene del cerdo, 16% de caballo y 12% de Jabalí (Bruschi y Dupouy-Camet, 2014; Cui *et al.*, 2014).

Tabla 1.

Relación de casos de trichinellosis reportados a nivel mundial (Chávez, 2012).

País	Fecha	Casos	Muertes asociadas	Fuente de Infección
Alemania	1999	1	-	Cerdo (embutidos)
Argentina	1995-1997	1274	3	Cerdo
Canadá	1995	9	2	Animales salvajes
Chile		169	1	Cerdo
China	1992-1996	776	4	Oso salvaje, carnero y cerdo
China	2004-2009	1387	4	
Eslovaquia		7	-	Cerdo, animales salvajes
España	1995-1996	86	-	Oso salvaje
Francia		24	-	Oso salvaje y caballo
Italia		36	-	Oso salvaje y cerdo
Letonia		142	-	Oso salvaje y cerdo
Líbano	1995	200	-	Cerdo
Lituania	1995-1996	593	1	Cerdo y oso
México	1993-1995	282	-	Cerdo
Polonia	1992-1997	5711	-	Cerdo y oso
Rumania	1997	2027	-	Cerdo
Rusia	1993-1997	3092	2	Cerdo (80%), perro y oso
Tailandia		104	1	Cerdo
USA		36	-	Animales salvajes
Yugoslavia	1995-1996	11806	2	Cerdo

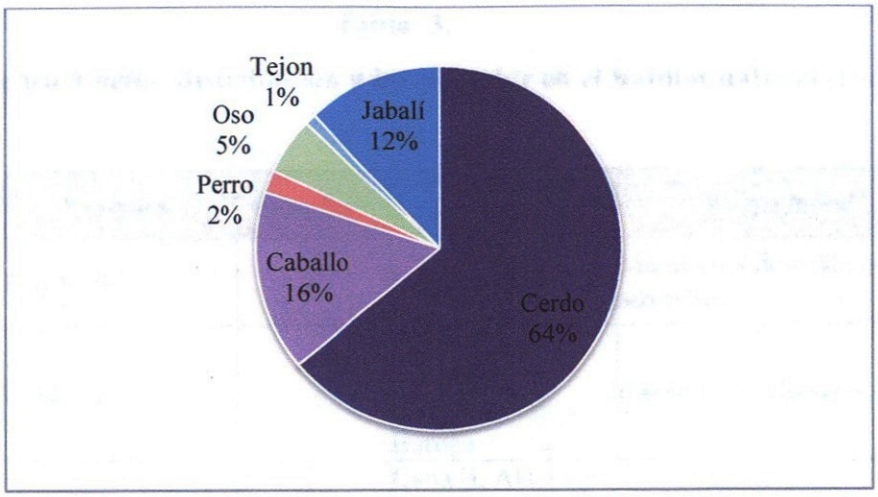


Fig. 2. Fuente de brotes de trichinellosis informados en ProMed-mail (1993-2000)

6.3 Morfología

Actualmente, el género consta de 12 especies distintas y/o genotipos (como se muestra en la Tabla 2) (Lia *et al.,* 2014) que se clasifican además como encapsulado o no encapsulados, de acuerdo a la formación o no de una envoltura de colágeno alrededor de la célula de músculo infectado, además que ya se cuenta con información acerca de la distribución geográfica y del hospedador que afecta (Tabla 3) (Mitreva *et. al.* 2011, Brushi y Dupouy-Camet, 2014).

Tabla 2.

Clasificación taxonómica de *Trichinella spiralis* (Lia *et al.,* 2014).

Familia	Clase	Orden	Género	Especie
Nemathelmintos	Nemátoda	Enpoplida	*Trichinella*	*spiralis* *nativa* (T2) *britovi* (T3) *pseudoespiralis* (T4) *murrelli* (T5) *nelsoni* (T7) *papua* (T10) *zimbabwensis* (T11) T6 T8 T9

Tabla 3.

Especies de *trichinella*, distribución y hospedador en el hábitat natural (Bien *et al.*, 2013)

	Especies	Genotipos	Distribución geográfica	Hospedador
Con cápsula	*T. spiralis*	-	Cosmopolita	Mamíferos domésticos y silvestres
	T. nativa	-	Áreas árticas y subárticas de América, Asia y Europa	Carnívoros silvestres
	Trichinella	T6	Canadá, Alaska y algunas zonas de EUA	Carnívoros silvestres
	T. britovi	T3	Zonas templadas de Europa, Asia y África	Mamíferos silvestres y raramente cerdos domésticos
	Trichinella	T8	Sudáfrica y Namibia	Carnívoros silvestres
	T. murelli	T5	Estados Unidos y el sur de Canadá	Carnívoros silvestres
	Trichinella	T9	Japón	Carnívoros silvestres
	T. nelsoni	T7	África	Mamíferos silvestres
	T. patagoniensis	T12	Argentina	Puma
Sin Cápsula	*T. pseudoespiralis*	T4	Cosmopolita	Mamíferos silvestres, aves y cerdos domésticos
	T. papuae	T10	Papúa, Nueva Guinea y Tailandia	Cerdos salvajes y cocodrilos de agua salada
	T. zimbabwensis	T11	Zimbabue, Mozambique, Etiopía y Sudáfrica	Cocodrilos del Nilo y lagartos

6.4 Estadios característicos del ciclo vital de *T. spiralis*

En la Figura 3, se muestran las características estructurales del parásito en los tres estadios: larva recién nacida (LRN), parásito adulto (hembra y macho) y larva infectante (LI) (Bien *et al.*, 2013; Lia *et al.*, 2014).

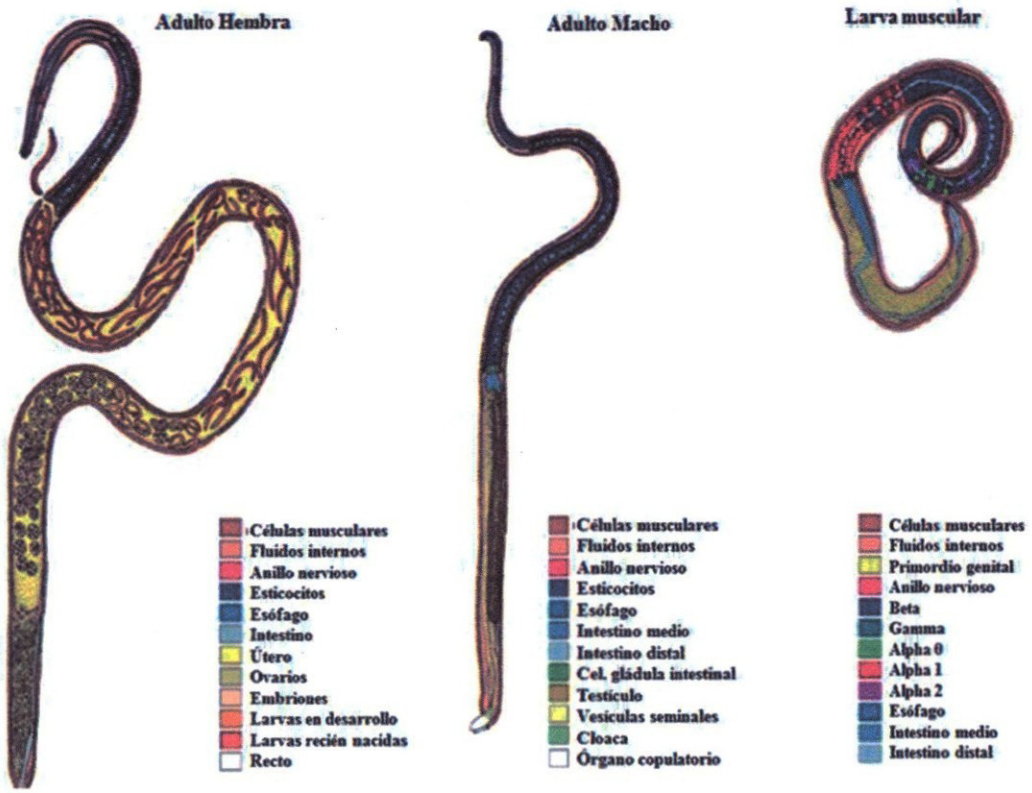


Fig. 3. Esquema de composición de los parásitos adultos hembra y macho y de larva muscular (Imagen tomada y modificada de Despomier, 2004).

1. Larva recién nacida (LRN) (Fig. 3): mide 100 µm x 6 µm, cuenta con espolón cefálico, estilete bucal y un esticosoma (con 50-55 esticocitos que contienen gránulos) cuya importancia radica en su poder antigénico. Vive en el citoplasma e induce la agregación de mitocondrias, alargamiento de núcleo, hipertrofia del glucocáliz en cubierta gruesa de colágeno formada por una compleja red de vénulas que se cree facilitan el transporte de nutrientes (Chávez, 2004). Las LI comienzan a enrollarse y se completa la forma de quiste (1 mes aproximadamente), presentan la fase de invasión al músculo.

2. Parásito adulto: Los adultos son blanquecinos y filiformes.
   a) Hembra: mide de 3-4 mm con un diámetro de 35 a 70 µm, es monovárica y vivípara con capacidad de parir entre 200 y 1500 LRN, dependiendo de la especie y del hospedador implicados, el tiempo de fertilización hasta el nacimiento puede ser de 3 días. Presenta una vulva situada a la región esofágica, se identifica útero, receptáculo seminal, oviducto, ovario y sus

células somáticas tienen seis cromosomas (Fig. 3). En la hembra grávida, la porción anterior del útero contiene numerosas LRN en etapas diversas de desarrollo, en la parte posterior contiene huevos también en grados diversos de desarrollo (Reveles, 1997).

b) Macho (Fig. 3): es más pequeño que la hembra mide de 1.4 a 1.6 mm de longuitud y 40 a 60 µm de diámetro, poseen un par de mamelones copulatorios a cada lado del orificio cloacar con dos pares de papilas detrás de ellos que sirven como órganos de sujeción durante la cópula, es monórquido, el testículo ocupa completamente la mitad posterior de la cavidad del cuerpo, es de forma cilíndrica (Ramírez, 1981).

3. Larva Infectante (LI): Son encapsuladas o enquistadas en el músculo. La cápsula se empieza a formar hacia los 21 días después de la infección, está constituida por una membrana interna procedente de la fibra muscular invadida y una membrana externa homogénea e hialina, derivada del sarcolema, se encuentran enrolladas en espiral en lo que se conoce como célula nodriza, que mide de 300 a 400 µm de largo por 150 a 200 µm de ancho (Riva *et al.,* 1990). El parásito no permanece inmóvil, presenta cuerpo cuticular, abertura oral, esófago, anillo nervioso, esticosoma. El esticosoma está en la parte posterior, posee gránulos secretorios altamente antigénicos que descargan en la luz del esófago, compuesto de 50-55 esticocitos, estos gránulos son: α0, α1, α2, β y γ (Chávez, 2004) (los alfa secretan polipéptidos mayores de 50 a 55 kDa y los beta un polipéptido de 48 kDa). Estos secretan material antigénico en las primeras 30 horas post-infección y son capaces de inducir una respuesta inmune (Reveles, 1997).

6.5 Ciclo de vida

T. spiralis muestra especificidad de hospedador entre los mamíferos, completa su ciclo de vida en un único hospedador (Gu *et al.,* 2013; Lia *et al.,* 2014; Cvetkovic *et al.,* 2014; Othman *et al.,* 2016), no tiene una fase de vida libre y vive como un parásito intracelular en células del músculo estriado (Mitreva *et al.,* 2011; Bruschi *et al.,* 2014), a diferencia de otros parásitos intracelulares, *T. spiralis* ocupa las células musculares del hospedador sin matarlo, lo que lo convierte en unos de las simbiontes parasitarias de mayor éxito (Ilic *et al.,* 2012)

El ciclo de vida de *T. spiralis* comienza cuando el tejido muscular que contiene la primera etapa de larva es ingerida por el hospedero (Mitreva *et al.*, 2011; Airas *et al.*, 2013; Yera *et al.*, 2013), las larvas pueden sobrevivir por años en el hospedero (40 años en el ser humano) (Gao *et al.*, 2014) se diferencia principalmente en tres fases.

1. Entérica (intestinal). El hospedador consume carne contaminada (cruda o mal cocida) que contiene larvas infectante (LI) (Fig. 4) (Wang *et al.*, 2014; Chu *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015), las cuales son liberadas en el estómago por acción de enzimas digestivas (Kang *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2012; Bien *et al.*, 2013; Cvetkovic *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016) y son transportadas por medio de peristaltismo a las dos terceras partes del intestino delgado, el parásito sufre cuatro mudas (Riva *et al.*, 2011; Ilic *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014), para convertirse en adulto, donde se diferencia en hembra o macho (Cvetkovic *et al.*, 2014) (con un promedio de dos hembras por macho). Después de que el macho copula a la hembra, muere y es expulsado, las hembras penetran profundamente en la mucosa intestinal, la embriogénesis dura alrededor de 90 horas y las LRN son liberadas hasta el quinto día post-infección, midiendo 0.08 mm (Riva *et al.*, 2011; Ilic *et al.*, 2012). La presencia de los nemátodos en el intestino inicia una serie de cambios estructurales, celulares y fisiológicos. Los cambios en la fisiología incluyen aumento de la actividad propulsora intestinal, mastocitosis mucosa, hiperplasia de células caliciformes y el aumento de la secreción de moco. Un aumento en eventos apoptóticos se describe en las células de la lámina propia de las vellosidades durante la trichinellosis intestinal (Yang-Rong *et al.*, 2014).

2. Sistémica. Las LRN viajan a través del mesenterio linfático y torrente circulatorio (Riva *et al.*, 2007; Brushi *et al.*, 2014; Chu *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015), entran a circulación general vía porta y son distribuidas en todo el cuerpo (Kang *et al.*, 2011). Se cree que poseen un estilete bucal en la parte interior del esófago y se cree que con él puede entrar a las células musculares sin descartar la posible acción de enzimas (Riva *et al.*, 2007).

3. Muscular. En las células musculares las LRN inician un periodo de desarrollo postembrionario creciendo exponencialmente y desarrollándose sin mudas. Induciendo la formación de la célula nodriza y de un sistema de vascularización periférica a modo de red de vénulas que permite el intercambio de nutrientes y desechos (Riva *et al.,* 2007; Kang *et al.,* 2011), encargándose de su metabolismo por largos periodos mientras el hospedador continúe vivo, cuando el hospedador muere, la cápsula de colágeno generada permite que en el tejido en descomposición la larva sobreviva por largos periodos manteniendo su capacidad para ciclar en un nuevo hospedador (Riva *et al.,* 2007), para ello hay una organización de las células satélites y ya que son células progenitoras situadas dentro de la pared celular lo que permite la reparación de las células del musculo (Ilic *et al.,* 2012), se cree que la formación de la célula nodriza está orquestada por las moléculas (proteínas de excresión-secreción) elaborados por el parásito (Park *et al.,* 2012).

6.5.1. Formación de la célula nodriza

La formación de la célula nodriza consecuencia única de la asociación de la célula huésped con la larva L1 de *T. spiralis* y otras especies de células formadoras de célula nodriza. Es de suponer que sus funciones son: alimentación y protección contra la respuesta inmune del huésped. La célula nodriza madura es morfológicamente distinta de cualquier otro tipo de célula de mamífero; ninguna otra condición patológica induce una célula tan radicalmente diferente, y sin embargo, funcional. El complejo celular puede sobrevivir en el huésped humano durante hasta 30 años, y en la mayoría de otras especies de mamíferos todo el período de vida del animal. Para que esto ocurra, el gusano debe inmuno-suprimir el anfitrión, sin embargo, nada se sabe sobre el o los mecanismo(s) empleado por el parásito. El mecanismo(s) por el cual la larva recién nacido entra en la célula huésped no se conoce, pero la evidencia morfológica da pistas sobre el proceso en general. En el tejido muscular, la larva penetra fuera del capilar y luego se prepara contra la célula muscular adyacente (Trichinella.org, 2014).

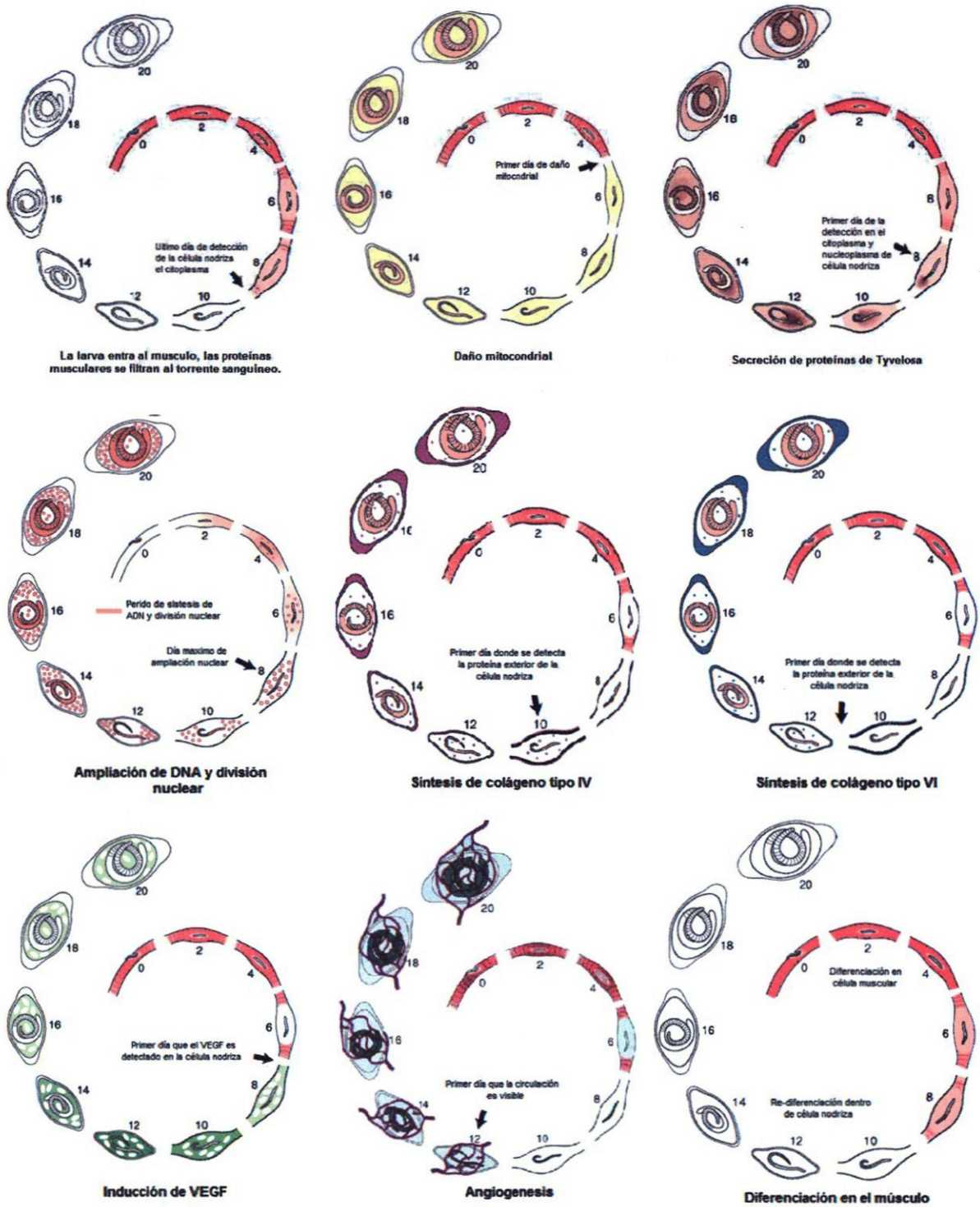


Fig. 4. Formación de la célula nodriza

Las larvas entran al músculo, donde hay un daño mitocndrial y secreción de proteínas de tyvelosa para así dar paso a la formación e integración de la larva y capsula de colágeno dentro de la célula muscular.

(http://www.trichinella.org/bio_nursecell.htm#invasion)

Al hacerlo su extremo anterior presiona la membrana del sarcolema hasta el punto de ruptura. Entonces, es muy probable que su estilete, haga un agujero en la membrana, provocando que la célula huésped explote. Los sucesos morfológicos que resulta en la formación del complejo celular se producen durante un período de 14-16 de días de tiempo después de que el gusano ha entrado en la célula muscular (Fig. 5) (Trichinella.org, 2004).

Las proteinasas secretadas por organismos parásitos pueden estar involucrados en una amplia variedad de funciones adaptativas tales como penetración en el tejido, la migración de las larvas, la evasión inmune, retraso de la coagulación sanguínea, la digestión, la muda y la degradación de la matriz celular (Park *et al.*, 2012).

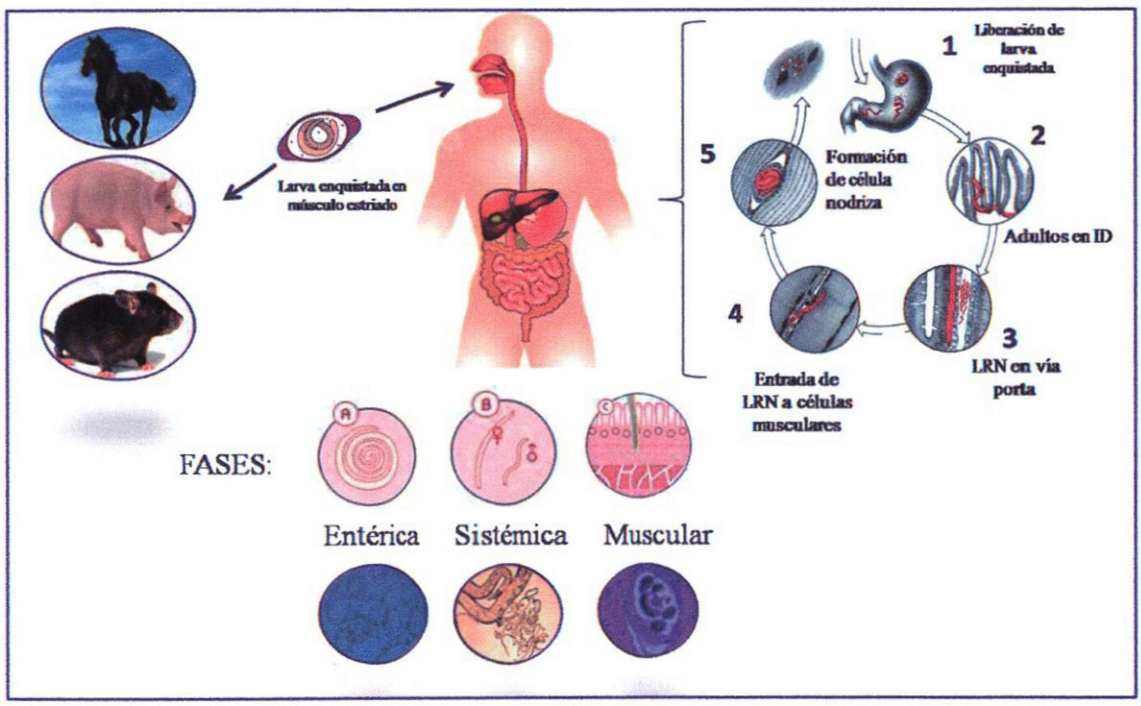


Fig. 5. Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*

El ciclo de vida empieza al consumir carne infectada con LI principalmente de cerdo, caballo y accidentalmente por el consumo de roedores; puede diferenciarse en tres fases: entérica (A), sistémica (B) y muscular (C), donde se desarrolla el estadio: adulto, LRN y LI y da paso a la liberación de la larva enquistada (1), desarrollo de parásitos adultos y reproducción (2), Liberación de LRN (3), entrada de LRN a células musculares (4) y formación de la célula nodriza (5), (Trichinella.org, 2004).

En la Figura 5, se muestra el ciclo de vida completo de *T. spiralis.* La trichinellosis se adquiere por consumo de carne conteniendo LI enquistadas (1) de *T. spiralis.* Las LI son liberadas (2) de los quistes e invaden la mucosa del intestino delgado, donde se desarrollan hasta convertirse en adultos (3) la hembra mide aproximadamente 2.2 mm de longitud y el macho 1.2 mm. Después de una semana, las hembras, eliminan LRN (4) que migran hacia el músculo estriado, donde se enquistan (5). El enquistamiento se completa en 4-5 semanas y las LI enquistadas pueden permanecer viables durante varios años. La ingestión de LI enquistadas perpetúa el ciclo. Las ratas y roedores, en general, son los responsables primarios del mantenimiento de la endemicidad de esta parasitosis. Los animales carnívoros/omnívoros como los cerdos o los osos comen roedores parasitados o carne de otros animales.

Tabla 4.

Tiempo en el que pasa cada fase de la infección

Tiempo post-infección			Fase de la infección
Horas	Días	Semanas	
12	2	-	Penetración y desarrollo larvario
30		2	Cópula de formas adultas en mucosa intestinal
	5 ó 7	6	Vivipopostura y migración larvaria de LRN
	10	6	LI en células musculares

6.6 Cuadro clínico

El desarrollo de la enfermedad y las manifestaciones clínicas se basan en la patogencidad de *T. spiralis*, así como el estado nutricional del hospedero, sexo, edad. La sintomatología de la trichinellosis es a menudo confundida con otros síndromes clínicos principalmente con problemas gastrointestinales, por lo cual puede ser mal diagnosticada (Lloyd, 2000). Los síntomas de la enfermedad se ponen en manifiesto cuando el número de LI ingerido es igual o superior a 50-70 LI (Colcagno *et al.*, 2005), las manifestaciones clínicas de la enfermedad suelen ser inespecíficas (Cui *et al.*, 2014).

Laverde *et al.*, 2009, menciona que los cerdos no presentan signos propios de la trichinellosis, excepto los animales inmunodeprimidos infectados con altas cargas parasitarias que pueden padecer fiebre, edema periorbitario, disnea, menor conversión y reducción en la ganancia de peso en un 20 a 40 %, sin embargo en un estudio realizado en cerdos infectados con el parásito, estos presentaron los signos característico atribuidos a la enfermedad como pelo hirsuto, dificultad y disminución de movilidad y diarrea característica de la respuesta celular a la infección (Chávez, 2004).

En el perro, se puede presentar un cuadro clínico manifestado por anorexia, emaciación y dolor muscular. En infecciones superiores a $1x10^6$ larvas infectantes puede producirse la muerte del animal (Berumen *et al.*, 2002).

En humanos existen síntomas clínicos característicos para cada fase de la infección por *T. spiralis*, estos síntomas se describen a continuación:

a) Fase Intestinal: La mayoría de los individuos que han sido infectados por ingestión de carne contaminada con *T. spiralis* no presentan síntomas. En las primeras 24 h, a partir de la ingesta de carne infectada, la penetración de LI a la pared intestinal ocasiona diarrea acompañada con dolor abdominal, náuseas, vómito de una semana de duración (Gottstein *et al*; 2009; Tay *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2014). La primera semana de fase intestinal en pacientes con infecciones moderadas o severas va acompañada de un dolor abdominal, diarrea, estreñimiento, vomito, malestar general y fiebre leve, estos varían en severidad y solo duran algunos días. Estas manifestaciones clínicas son similares a aquellas causadas por otros desordenes entéricos como la intoxicación por alimentos o indigestión, hecho que hace más difícil el diagnóstico correcto (Chávez, 2012).

b) Fase sistémica (parenteral): Desde la semana 2 a la 6 después de la infección, la fase intestinal sigue presente pero los síntomas disminuyen. En esta etapa, se desarrollan las larvas recién nacidas (LRN) que pueden causar neumonía, encefalitis, nefritis, peritonitis, mialgia difusa, edema periorbital o facial, conjuntivitis, fiebre, salpullido cutáneo, disfagia, dificultad para abrir la boca,

insomnio, pérdida de peso, sensaciones de nervios periféricos, impulsos de calor, voz rasposa, bronquitis, hemorragias en astilla en los surcos de las uñas y en la retina, problemas visuales y un estado tipo paralítico. Raramente pueden manifestarse síntomas neurológicos que ocurren al término de la segunda semana de infección y que provocan un estado generalizado de ansiedad (Capo y Despomier, 1996).

c) Fase de muerte: Esta fase puede ser debida a una miocarditis que ocurre en el 20 % en los casos de los pacientes hospitalizados. En la Tabla 5 se muestra el cuadro clínico de *Trichinella spiralis.*

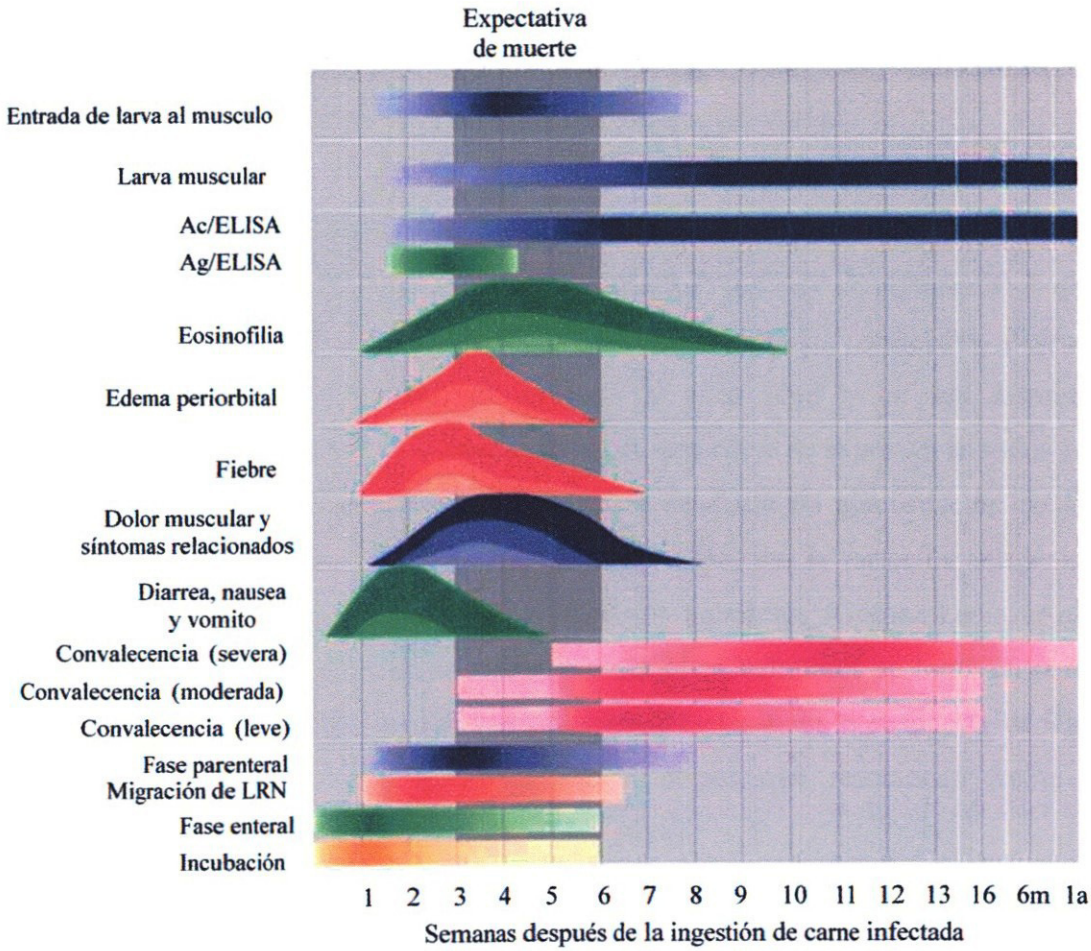


Fig. 6. Cuadro clínico de *T. spiralis* de acuerdo al tiempo de infección

Se muestran los principales signos y síntomas presentados durante las semanas después de la infección por *T. spiralis* dentro de estas (eosinofilia, edema periorbital, fiebre, dolor muscular, diarrea, vomito, nausea, etc.).

(Trichinella.org, 2014).

6.7 Inmunología

Las infecciones parasitarias desencadenan una serie de mecanismos de defensa inmunitarias característicos, unos mediados por anticuerpos y otros por células. La eficacia de cada uno de estos tipos de respuesta depende del parásito implicado y de la fase de la infección (Makedonka and Douglas, 2006) y han desarrollado diferentes mecanismos de evasión que permitan el establecimiento de la infección con el menor daño posible al hospedador (Ilic *et al.*, 2012), incluyendo la expresión de epítopos similares a los presentes en hospedador, antígenos derivados de *T. spiralis* que evolutivamente están conservados en el parásito y en el huésped podrían ser causantes de la evasión de la respuesta inmune, sueros analizados reaccionaron con mayor frecuencia a un componente de 53kDa, por lo cual se considera a esta proteína como un buen candidato para realizar más estudios sobre los mecanismos de inmunomodulación mediada por *T. spiralis* (Radovic *et al.*, 2012).

Los parásitos helmintos son de mayor tamaño y tienen estructuras y ciclos de vida más complejos, esto hace que presenten un mayor número de antígenos y que algunos tengan especificidad de estadio del ciclo de vida, muestran distinta morfología según se encuentren en su fase de vida libre o en sus distintos hospedadores. Aunque muchas de las proteínas de superficie se expresan en todos los estadios del ciclo de vida, la cantidad relativa y el grado de glucosilación de las moléculas varían entre las diferentes etapas, lo que explicaría la variación antigénica que se presenta a lo largo del ciclo de numerosos helmintos (Gómez-Lucia *et al.*, 2007), la modulación del sistema inmune por parásitos helmintos se logra en parte por las células dendríticas, ya que son potentes inductoras de la respuesta de Th2 (conocidas como las células colaboradoras o helper que reaccionan frente a helmintos) y respuestas regulatorias (Ilic *et al.*, 2012).

Los antígenos (Ags) que desencadenan la producción de anticuerpos se encuentran en su mayoría caracterizados en dos grupos:

a) Grupo de respuesta rápida (detectados en las capas internas de la cutícula, hemolinfa, saco embrionario, glándula hipodermal y gránulos exocrinos en el tracto reproductor del macho), detectables dos días después de la infección, comparten

antígenos de fosforilcolina (PC). Se encuentran presentes en LI y gusanos adultos (diferentes en ambos estadios) (Takashashi, 1997).

b) Grupo de respuesta lenta (lo encontrados en la superficie (cutícula) de la larva y de los gránulos excretores de los esticosomas) están directamente expuestos al sistema inmune del huésped, y son los principales antígenos diana, que inducen las respuestas inmunes (Takashashi, 1997; Wang *et al.,* 2014; Chávez, 2012), se detectan sólo hasta pasadas cuatro semanas de la infección que cargan antígenos de productos excretorios y secretorios (ES) de la larva, el más estudiado es la TSL1 (altamente inmunogenico), contienen residuos de tyvelosa. Varios autores describen como antígenos inmunodominantes de la LI el triplete de 45, 48 y 53kDa, que es conocido en diferentes modelos experimentales (ratón, rata, conejo, cerdo y el hombre) (Chávez, 2012). Pesos moleculares entre 40 y 70 kDa, Ag de 45-55 kDa activan mastocitos por medio de un patrón de IgE independiente promoviendo una respuesta Th2.

Los antígenos de Excresión-Secresión (ES) de *Trichinella spp.* pueden inducir una fuerte respuesta inmune que implica la generación de anticuerpos específicos y puede ser muy importante para el serodiagnóstico, ya que son fácilmente atacados por el sistema inmune del huésped (Cvetkovic *et al.,* 2014; Wang *et al.,* 2014).

Dentro de los antígenos ES más importantes se encuentran:

6.7.1. Proteína 45kDa

Dentro de los antígenos ES más importantes se encuentra la proteína de 45 kDa de *T. spiralis,* además de que se encuentra dentro del triplete característico de la enfermedad y se ha encontrado en varias especies animlaes. Se han llevado a cabo investigaciones en proteínas de *trichinella* con énfasis en las de ES de LI musculares debido a dos razones: tienen prominente y estrecha antigenicidad especifica y puede jugar un papel importante en la formación de las células nodrizas después de ser secretada en las células musculares del hospedero (Nagano *et al.,* 2009).

La proteína de 45 kDa β- y γ esticocitos de los órganos secretores de LI musculares, por medio de análisis de bioinformática se identificó que la proteína de 45 kDa es una serina proteasa similar a la tripsina (Nagano *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2012), Además, informaron que la glicoproteína de *T. spiralis*, era la proteasa serina y localizada alrededor de la cápsula de colágeno (Romaris *et al.*, 2002). Todorova *et al.* mostraron que las proteinasas secretadas de gusanos adultos de *T. spiralis* degradados fibrinógeno y plasminógeno, y la degradación era susceptible a la acción de la serina, cisteína, y proteinasas inhibidores de la aspartil (Todorova y Stoyanov, 2000).

Tabla 5

Esquema de etapas implicadas en el ciclo de vida de *Trichinella spiralis* y respuesta inmunólogica (Bruschi y Dupouy-Camet, 2014).

Ciclo de vida del parásito	Respuesta del hospedero
Entrada de larvas musculares	Captación, procesamiento y reconocimiento de antígenos, respuesta inicial Th1
Invasión de los enterocitos	
Liberación de antígeno esticosomal	
Exposición de antígeno de superficie	
Maduración de adultos	Respuesta anticuerpos
Liberación de larvas recién nacidas (LRN)	Respuesta de células mástil
Exposición de antígenos de adultos y LRN	Comienza inflamación intestinal
Expulsión de gusanos adultos	Respuesta anticuerpos
Migración de LRN	Respuesta de células mástil
	Inflamación aguda
	Cambio a respuesta Th2
Invasión de músculos	Respuesta anticuerpos
Formación de célula nodriza	Eosinofilia
Liberación de antígenos esticositos	Disminución de inflamación intestinal
Formación de cápsula	Inflamación en músculo
	Consolidación de respuesta Th2

La respuesta inmune específica e inespecífica a trichinellosis (Tabla 5), está regulada tanto en su naturaleza como en su intensidad y duración por una serie de factores: carga parasitaria, estadio del parásito y de las características del huésped (edad, sexo, estado nutricional, hormonal e inmunológico). *T. spiralis* de acuerdo al estadio en que se encuentre en el huésped (LI, adulto o LRN) va a desencadenar la producción

de anticuerpos (Acs), los cuales están dirigidos a los diferentes sitios anatómicos del parásito (cutícula, esticocitos, etc.) (Chávez, 2012).

Contreras *et al.,* 2001, indicaron que la respuesta de los anticuerpos específicos en un individuo infectado por *T. spiralis*, está en relación, con el número de larvas ingeridas y el tiempo transcurridos de la ingestión de la LI. La sensibilidad dependerá de la técnica y antígeno utilizados en el diagnóstico.

El gusano *T. spiralis* adulto vive en el intestino del huésped, las LRN emigran a través de los capilares a circulación, por diferentes órganos llegando a músculo donde maduran definitivamente a la LI, quedando alojado en músculo indefinidamente. *T. spiralis* posee variedad de antígenos de superficie en las distintas fases de su ciclo vital. Para poder establecerse antes que se produzcan las reacciones inmunitarias específicas del huésped, los parásitos deben superar los mecanismos de defensa preexistentes (Roitt et al., 2000). Numeroso estudios han demostrado que la infección con *T. spiralis* produce una protección poderosa y duradera contra una nueva infección. Esta protección es la culminación de una secuencia de respuestas del hospedero en las cuales el anticuerpo juega un papel principal (Takahashi *et al.,* 1990).

Las células dendríticas (DCs) se encuentra entre las primeras células que tienen contacto con los agentes infecciosos, por lo tanto son necesarias para el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa, a pesar que estas células adquieren una forma inmadura bajo la influencia de antígenos de *T. spiralis* su estado activo se refleja en la capacidad para presentar antígenos a las células T y para producir citoquinas. Las citoquinas producidas por las CDs son señales importantes para la iniciación y regulación de la respuesta inmune a patógenos (Ilic *et al.,* 2012). La IL-12 como citoquina proinflamatoria tiene un papel importante en la polarización de la respuesta inmune hacia Th1 y la IL-10 hacia la respuesta a Th2.

Varios estudios indican que metaloproteínas de matriz (MMPs): MMP9 y MMP2 son marcadores de la respuesta inflamatoria y actúan sobre diversas biomoléculas, incluyendo citoquinas, hormonas y quimiocinas, regulando de esta manera la respuesta inmune, MMP9 (gelatinasa de 92kDa) esta implicada en diversos procesos

de inflamación, incluyendo la acumulación de células inflamatorias, la curación de la lesión tisular los procesos de remodelación, está se encuentra aumentada de los 7 a los 14 días PI y disminuye su actividad a los 28 días (Bruschi *et al.,* 2014).

Dado que el ciclo de vida del parásito posee tres fases se evidencian diferentes fenómenos inmunológicos en cada una de las fases:

a) Fase intestinal

La respuesta inmune montada contra *T. spiralis* es una combinación de respuestas dirigidas contra los diferentes estadios del parásito los cuales son antigénicamente diferentes (Philipp *et al.,* 1981). Numerosos cambios celulares tienen lugar en el intestino produciéndose un aumento significativo en el número de células calciformes, mastocitos, neutrofilos y eosinófilos (Nuñez, 2011; Brushi *et al.,* 2014), junto con una alteración y pérdida de células epiteliales y alteraciones morfológicas de las vellosidades intestinales. Los cambios celulares, junto con el desarrollo de inmunidad, son dependientes de linfocitos T. Durante las primeras horas de la infección se produce una respuesta con citoquinas de tipo Th0 y Th1 tanto en ratas como en ratones, sin embargo poco después comienza a predominar una respuesta de tipo Th2, la cual es esencial para dar fin a la fase intestinal de la infección. Tanto la IL-4 como la IL-13 son suficientes para facilitar el desarrollo de una respuesta inmune de tipo protectiva. No está aún claro como las células Th2 promueven el rechazo de vermes de la mucosa intestinal (Nuñez, 2011; Ilic *et al.,* 2012) aunque las citoquinas (IL-9, IL-10 e IL-13) y otros mediadores solubles liberados por los mastocitos podrían ser los responsables (Nuñez, 2011; Blum *et al.*, 2013), la infección por helmintos provoca una fuerte respuesta de tipo Th2 lo que resulta en altos niveles de IgE, eosinofilia y mastocitosis intestinal (Watabe, 2014).

Lawrece *et al*; 2000 demostraron que el óxido nítrico participa en el mecanismo de inflamación del epitelio intestinal, observándose cambios en las poblaciones celulares incluyendo las mastocitosis e hiperplasia críptica.

Además de los cambios celulares a nivel del epitelio intestinal existe un aumento en la síntesis de IgA e IgE en fluido intestinal. Se postula a la IgA como la inmunoglobulina fundamental de la fase intestinal de la parasitosis (Bell, 1998).

Se desencadena una respuesta inmune celular y humoral, proceso multifactorial que incluye varios isotipos de anticuerpos, factores del complemento y mediadores solubles, pero la respuesta no es totalmente efectiva debido a la rápida evolución de los estadios parasitarios (Venturiello *et al.*, 2007).

b) Fase sistémica

Las características inmunológicas más importantes de la infección son el aumento de los niveles séricos de inmunoglobulinas, particularmente de IgE y la eosinofilia causantes del mantenimiento de la respuesta inmune hacia el fenotipo Th2. A las pocas semanas de la infección, los sueros presentan anticuerpos dirigidos contra la cutícula de la LRN, que son capaces de opsonizar la larva activando células efectoras que dan muerte mediante el mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) (Núñez, 2011), también se ha demostrado una reacción inflamatoria significativa de parénquima pulmonar, desarrollando hiperplasia del tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT) antes y durante el paso NBL a través del pulmón. Esta inflamación se caracteriza por la presencia de mástil células y eosinófilos dispersos por todo el parénquima pulmonar, la hiperplasia de células caliciformes y la producción local de citocinas, quimiocinas, y anticuerpos (Falduto *et al.*, 2015), en esta fase también se encuentra un aumento en sangre periférica de linfocitos y neutrófilos (Airas *et al.*, 2013).

c) Fase Muscular

Se cree que los antígenos de excreción-secreción de larvas musculares son los responsables de la inducción de la respuesta inmune de la parasitosis, estos productos, por un lado, participan en el establecimiento del parasitismo y por otro lado, desempeñan un papel clave en la inducción y modulación de la respuesta inmune del huésped. Productos de ES de *Trichinella spp.* contienen algunas proteínas funcionales, tales como proteínas de choque térmico, endonucleasas, proteinasas,

proteínas quinasas, inhibidores de proteinasa, las superoxido dismutasas, glicosidasas, etc., la mayoría glicoproteínas (Cvetkovic *et al.*, 2014).

Durante esta fase de la parasitosis humana se producen cambios fenotípicos en la población de linfocitos T. Las células mononucleares de sangre periférica secretan citoquinas de tipo Th2 e INF cuando éstas son estimuladas con un extracto crudo de larvas musculares (LM). Los linfocitos presentes en esta población celular son predominantemente CD8+, produciéndose además un descenso concomintante del recuento de linfocitos CD4+ (Núñez, 2011).

De los tres estadios que se desarrollan durante el ciclo de vida de *T. spiralis*. El de la larva muscular ha sido estudiado de manera más amplia. Esto se debe, en gran medida, a que varios informes demostraron que la respuesta inmune que se genera en el hospedero hacia este estadio del parásito genera una inmunidad protectora y resistencia a la reinfección (Arriaga *et al.*, 1995; Cvetkovic *et al.*, 2014). Por otro lado, se considera que la alta inmunogenicidad de la larva permite emplear algunos de ellos en ensayos de diagnóstico. Así, varios componentes de este estadío han sido caracterizados, aun cuando los atributos funcionales de éstos no han sido completamente definidos, su utilidad en el diagnóstico de trichinellosis, así como su papel protector en contra de la infección por el parásito, han sido ampliamente demostrados (Arriaga *et al.*, 1995).

Flisser *et al;* en el 2002, encuentran una mayor cantidad de anticuerpos en hembras (3.8%) que en machos (1.2%), con lo que se puede considerar que el sexo confiere cierto grado de protección. Son más susceptibles los machos porque las hembras presentan una mejor respuesta inmunológica.

Al entrar en contacto *T. spiralis* con el hospedero se provoca una fuerte respuesta inmune y con ello una rápida expulsión de parásitos, reducción en la capacidad de reproducción y en el número de larvas implantadas en el músculo además de un deterioro de la movilidad de los gusanos en el intestino, por ello se tiene la necesidad de identificar antígenos que evocan estas respuestas en el desarrollo de herramientas

de inmunodiagnóstico y para entender la base de la inmunidad protectora (Takahashi, 1997).

6.8 Diagnóstico

En general el diagnóstico clínico precoz de la trichinellosis es difícil por la falta de signos y síntomas. Este se basa en los antecedentes epidemiológicos y clínicos, análisis clínicos. Resulta difícil dado que las manifestaciones clínicas son comunes a otras enfermedades (intoxicación alimentaria, gripe, reumatismo, dermatomiositis).

En trichinellosis podemos hablar de tres tipos de diagnóstico: sospecha, confirmatorio y de certeza.

a) Diagnóstico de sospecha: dado por el contexto epidemiológico, clínico y los datos de laboratorio como: leucocitos (15.000-50.000/mm^3), hipereosinofilia (mayor a 500 eosinófilos/mm^3), hipergammaglobulinemia y la elevación de enzimas musculares como la creatinfosfoquinasa, la lactato deshidrogenasa y la aldolasa (Murrell y Bruschi, 1994).

b) Diagnóstico confirmatorio: se basa en la detección de anticuerpos séricos dirigidos contra el estadio parásito de LM. Los métodos actualmente empleados son la inmunofluorescencia indirecta (IFI), el ELISA y la inmunoelectrotransferencia (IET) (Nuñez, 2011). ELISA utilizando antígenos de ES de larvas musculares de *T. spiralis* es el método serológico más utilizado para el diagnóstico de trichinellosis recomendado por la Comisión Internacional de Trichinellosis (ICT), sin embargo la principal desventaja de la detección de anticuerpos anti-trichinella es la ocurrencia de una alta tasa de falsos negativos durante la etapa temprana de la infección y la reacción cruzada de antígenos de *T. spiralis* con otras enfermedades parasitarias (paragonimiasis, esquistosomiasis, clornorchiasis, cisticercosis, anisakiasis, etc.) (Cui *et al.*, 2014),

c) Diagnóstico de certeza: basado en la detección de las LM en músculo mediante biopsia y técnicas histoquímicas. Cabe destacar que esta metodología posee baja sensibilidad (Nuñez, 2011) a las infecciones tempranas (Cui *et al.*, 2014).

Para llevar a cabo la detección de *T. spiralis* es a través de dos métodos:

1) Métodos directos: Se realiza inspección de músculo en canales, principalmente en cerdo (en músculo de diafragma, lengua y músculo masetero) y comprende la compresión de tejido, la digestión artificial y las técnicas moleculares, que incluye técnicas como PCR múltiple que es sensible y rápido que pude identificar inequívocamente una sola larva de la especie.

2) Los métodos indirectos o inmunológicos: Los métodos inmunoserológicos antiguamente empleados incluían a la Hemoaglutinación indirecta (HAI), la Floculación de bentonita (FB) y la Contrainmunoelectroforesis (CIEF). Estas reacciones utilizaban como antígeno parasitario un homogenado total de larva muscular (LM) (único estadio adecuado para realizar el diagnóstico de esta parasitosis). Estos métodos, poseían una sensibilidad epidemiológica y analítica limitadas dado que se trata de reacciones de interacción secundaria, donde el nivel de anticuerpos circulantes requeridos para que dichas reacciones sean positivas debe ser elevado (Nuñez, 2011).

En la actualidad, las reacciones empleadas para la detección de la parasitosis son la inmunofluorescencia indirecta (IFI), que emplea como antígenos cortes de criófosfato de LM, el ELISA y la Inmunoeletrotransferencia (IET). Estas dos últimas metodologías emplean como antígeno los denominados productos de Excreción-Secreción de LM (ES) (Nuñez, 2011).

Se considera que la serología es adecuada para la vigilancia e investigación epidemiológica en animales domésticos y fauna, siendo las siguientes técnicas las recomendadas para realizar dichas actividades:

- Prueba de floculación en bentonita. Utilizada en los años 60´s
- Pruebas de inmunoflourescencia directa e indirecta
- Hemoaglutinación indirecta
- ELISA
- Dot-ELISA
- Inmunoelectrotransferencia

- Pruebas de fijación de complemento
- Técnicas de precipitación en gel

En la Tabla 6 se muestra un comparativo en cuanto a sensibilidad, especificidad e índice de Youden de los métodos inmunoserológicos más empleados para la detección de *Trichinella* (Nuñez, 2011).

Tabla 6.

Comparativo porcentual entre los métodos inmunoserológicos empleados para la detección de trichinellosis

	ELISA	IFI	IET
Sensibilidad (%)	96.00	96.3	93.50
Especificidad (%)	99.00	96.0	100.00
Indice de Youden	0.95	0.8	0.94

La prueba de ELISA (Enzyme-LikendInmunosorbetAssay) que es un método alternativo para la detección relativamente rápida por medio de serología para la infección de *T. spiralis*, tiene la ventaja de que puede detectar la infección antes de la matanza (Chávez, 2012), la principal desventaja de la detección de anticuerpos IgG es la ocurrencia de una alta tasa de resultados falsos negativos durante la etapa temprana de la infección (Wang *et al.*, 2014).

T. spiralis es la especie más importante en los cerdos domésticos para la transmisión de zoonosis. El método preferido para el diagnóstico de la especie porcina infectada es mediante la digestión de muestras de carne en ácido clorhídrico (HCL) (Chávez, 2012).

6.9 Tratamiento

En humanos no existen medicamentos totalmente eficaces. Se usan benzimidazoles (albendazol, mebendazol) tanto para la fase intestinal como para la fase parental,

siendo más efectivos los administrados en forma temprana (Tabla 7). Conjuntamente se utilizan corticoesteroides ya que la acción larvicida de los antihelmínticos puede generar una brusca liberación de antígenos parasitarios.

Tabla 7.
Comparativo entre tratamientos farmacológicos para trichinellosis

Droga	Descripción
Ivermectina	Medicamento de elección para el tratamiento de helmintos. Derivado del actinomiceto *Streptomyces avermitilis*.
Mebendazol	Es un derivado Bencimidazol que resulta útil en el tratamiento de infecciones por vermes redondos. Es particularmente efectivo frente a nemátodos gastrointestinales. Su mecanismo de acción es similar al del albendazol, sin embargo, es un inhibidor más potente de la deshidrogenasa málica del parásito y muestra efecto más específico y selectivo contra los nemátodos intestinales que los demás benzimidazoles. Dosis para adultos y niños mayores de dos años: 200-400 mg 3 veces al día durante 3 días, después 400-500 mg 3 veces al día por 10 días (Quiroz, 2011).
Albendazol	Antihelmíntico de amplio espectro de administración por vía oral es un benzimidazolcarbamato. Después de la administración por vía oral se absorbe erráticamente (hay incremento con alimento con alto contenido de grasa) (Chávez, 2012).
Rifampicina	Derivado de un antibiótico complejo macrocíclico, semisintético y de amplio espectro, obtenido de *Streptomyces diterranei*. Inhibe el crecimiento de numerosas micobacterias (atípicas, Gram + y Gram -). La rifampicina ha sido utilizada a una dosis ajustada de humanos para ratas de 6.0 U (5mg/kg de peso/10 días). Se estudió la evaluación de la rinfampicina en la infección por *T. spiralis* en modelo experimental murino en fase intestinal y muscular y se encontró que esta fue efectiva contra la infección a pesar de ser un antibacteriano el tiempo de uso es menor y con una toxicidad mejor que los antiparasitarios (Tiabendazol, Mebendazol y Albendazol) (Nuñez, 2011).

Por otra parte, la administración de drogas inmunomoduladoras se aplican a pacientes con enfermedad severa o signos de inmunosupresión. Si bien el tratamiento farmacológico no es aplicado en animales, numerosos estudios en ratones y cerdos infectados con *T. spiralis* han mostrado la eficacia de ivermectina y flubendazole contra las larvas infectantes y otros estadios, hallando signos de prevención y tratamiento pero con insuficiente consistencia aún.

6.10 Inmunoterapia

El sistema inmune puede preparase frente a un determinado microorganismo de manera preventiva, para que si en algún momento apareciera el mismo microorganismo en forma virulenta, sea reconocido de forma rápida y pueda combatirse eficazmente (Gómez-Lucia *et al.*, 2007).

La primera vacuna de la que se saben datos científicos la ideó Edward Jenner en 1796 frente a la viruela humana. Observó que las personas que había sufrido la viruela vacuna no padecían la viruela humana, por lo que decidió hacer un preparado, con las vesículas de las vacas infectadas, que, inoculando a personas sanas las protegía de la viruela humana (Galindo, 2004; Gómez-Lucia *et al.*, 2007).

Alrededor de cien años después de esta primera vacuna, Louis Pasteur demostraba que se podía inducir inmunidad, más o menos duradera, utilizando microorganismos homólogos modificados, en su virulencia, así como por su inactivación total. Así nacieron las vacunas inactivadas, ensayadas por Pasteur en el carbunco y las vacunas atenuadas, producidas por primera vez por el mismo en 1885 frente al virus de la rabia.

El mecanismo inmunitario de la vacunación fue finalmente aclarado en 1957 por Frank Burnet quien anunció la teoría de la selección clonal, y por el posterior descubrimiento en 1965 del papel de los linfocitos T y B en la respuesta inmune.

La base del éxito de la vacunación consiste en que la estimulación de los antígenos que componen una vacuna induce una respuesta primaria con estimulación o expansión clonal de linfocitos T y B, y la formación de células de memoria capaces

de inducir una respuesta secundaria eficiente en el individuo cuando entra en contacto con los mismos antígenos.

El objetivo de la inmunoterapia (IT) mediante la administración de dosis crecientes de un extracto compuesto es alterar la respuesta inmunológica del paciente. Uno de los inconvenientes de la IT subcutánea actual son los efectos adversos y en este sentido se está trabajando sobre formas de administración más seguras, cómodas y eficaces.

Tabla 8.

Comparación entre los Mecanismos de acción en la inmunoterapia

Mecanismos de acción en la inmunoterapia
Modulación de la respuesta de anticuerpos alérgeno-específicos ↑ IgE específica* ↑ IgG4 específica ↑ IgA específicas
Disminución en el reclutamiento y activación de células proinflamatorias ↓ mastocitos tisulares ↓ eosinófilos tisulares ↓ liberación de mediadores (mastocitos, eosinófilos y basófilos) ↓ producción de citoquinas proinflamatorias
Cambios en el patrón de respuesta de las células T alérgeno-especificas ↓ proliferación inducida por alérgeno ↑ células T reguladoras ↑ la producción de IL-10 y TGF-β ↓ células Th2 y sus citoquinas

*= sólo demostrado en inmunoterapia subcutánea ↑ = aumento ↓= disminución

La inmunoterapia debe utilizarse exclusivamente en enfermedades en las que se haya demostrado que un mecanismo alérgico mediado por IgE es básico en su patogenia (Fiandor, 2008).

La inmunoterapia consiste en la administración de dosis crecientes del alérgeno al que el paciente está sensibilizado, con el fin de conseguir una tolerancia progresiva a la exposición a dicho alérgeno. Reduce los síntomas de la respuesta inmediata y de la

respuesta tardía actuando sobre los mecanismos humorales y celulares involucrados en la inflamación (Fiandor, 2008).

El papel de estos anticuerpos IgG e IgA parece que consistiría en captar los alérgenos antes de que éstos alcancen las moléculas de IgE unidas a las células efectoras impidiendo así la activación de basófilos y mastocitos. De la misma manera competirían con las células presentadoras de antígeno por la captación del alérgeno y por lo tanto dificultarían su presentación a los linfocitos T (Fiandor, 2008).

Diferentes trabajos han demostrado que la inmunoterapia subcutánea y sublingual inhibe tanto el reclutamiento como la activación de las células proinflamatorias después de la provocación específica o tras la exposición natural al alérgeno.

Las celúlas T activadas y sus productos juegan un papel primordial en la patogénesis de las enfermedades alérgicas. El fenotipo Th2 (citoquinas IL-4, IL-5, IL-13) se asocia con las enfermedades alérgicas mientras que el fenotipo Th1 (citoquinas IL-12 e IFN-ɣ) se asocia a la protección frente a las enfermedades alérgicas. Por este motivo una de las metas de la inmunoterapia sería reorientar la respuesta de las células T hacia el patrón Th1. De hecho, varios trabajos han correlacionado el éxito de la inmunoterapia con la inducción de la respuesta Th1 y una disminución en la producción de citoquinas Th2.

La inmunogenicidad no depende sólo de la naturaleza del antígeno, si no también de la respuesta individual de cada animal y del modo de presentación de los antígenos. El contacto entre el inmunógeno y un individuo puede ocurrir por una exposición natural o puede ser inducido artificialmente mediante una inmunización controlada experimentalmente. Cada inmunógeno experimental muestra una curva de dosis y respuesta inmunitaria que puede determinarse midiendo la reacción inmunitaria a diferentes dosis y vías de administración (Gómez-Lucía *et al;* 2007).

A) Inmunoterapia en Mucosas:

Cada día más se busca aplicar directamente vacunas sobre mucosas, para estimular la respuesta inmune a este nivel. Hay varias razones que justifican la elección de esta ruta en vez de, por ejemplo, la intramuscular o la subcutánea.

Por un lado, las mucosas constituyen la vía habitual de infección o en la que se inicia el proceso infeccioso. En general se trata de procesos en los que la inducción de inmunidad local en el sitio de la infección resulta crítica para la protección óptima. Además, la formación de Inmunoglobulina A secretoria (SIgA) constituye el mecanismo efector principal de la respuesta inmune a nivel local, especialmente en el caso de infecciones respiratorias y gastrointestinales, por lo que obtener una buena respuesta de IgA representa el primer objetivo de la mayoría de las vacunas de mucosas. Otras inmunoglobulinas, especialmente la IgG también forma parte de la respuesta.

La inducción de linfocitos T citotóxicos también representa otro importante objetivos de las vacunas en mucosas. No pueden olvidarse, por último, otras razones de interés práctico derivadas de la facilidad de administración de los antígenos (Gómez-Lucia *et al.*, 2007).

En la práctica diaria, por lo general, la eficacia de la inmunoterapia (IT) se comprueba por la reducción de los síntomas de la enfermedad que precisó el tratamiento específico y/o por haber disminuido la necesidad de utilizar medicamentos para combatir los síntomas (López y Marco, 2012).

Vía tópica nasal: Actúa a nivel local por lo que no se producen reacciones sistémicas. No se conocen cuáles son los mecanismos inmunológicos; los marcadores clásicos como las IgE e lgG4 específicas, no se modifican con IT nasal. A nivel local disminuyen los infiltrados de eosinófilos, neutrófilos y hay un aumento de la IgA e IgG específicas. La IT intranasal es segura y eficaz como vía alternativa frente a la IT clásica en el tratamiento de la rinitis inducida por pólenes, cuando ésta no se controla bien con medicación o existe mala tolerancia a la IT subcutánea. No existen datos suficientes que demuestren que esta forma de administración de IT sea efectiva.

Vía sublingual: La inmunoterapia sublingual (ITSL) fue descrito por primera vez en un ensayo aleatorizado, doble ciego en 1986, con la razón principal de hacer la inmunoterapia más segura y más cómoda para el paciente (Passalacqua *et al.*, 2013).

De todas las formas de IT, a excepción de la subcutánea, la vía sublingual puede ser la forma más eficaz de tratamiento. El alergeno permanece seis horas en la mucosa oral ejerciendo su acción inmunomoduladora. Estudios invitro apoyan que las células de Langherhans de la mucosa oral actúan como interiorizando los alergenos que atraviesan la mucosa oral (Borrego *et al.* 1999).

Con la inmunoterapia sublingual también se han observado estos efectos en la IgG y en la IgA pero no se ha comprobado ningún efecto sobre la IgE (Fiandor, 2008).

B) Inmunoterapia Parenteral:

La vía de administración de los inmunógenos experimentales suele ser parenteral (clásica), es decir vías distintas a las del tubo digestivo. Estas vías parenterales, junto con la vía digestiva u oral, o la inhalatoria, se pueden utilizar también en la aplicación de vacunas. El tipo de respuesta inmune obtenida dependerá de la vía elegida. En general, aquellas rutas que permiten la distribución del inmunógeno en espacios vasculares tenderán a estimular mecanismos de respuesta mediada por anticuerpos, mientras que las que se aplican localmente tenderán a estimular mecanismos de respuesta mediada por células. En general, la vía digestiva suele tener poco éxito a la hora de producir inmunización, probablemente porque los antígenos se degradan excesivamente a lo largo del tránsito gastrointestinal, y porque podrían producir un efecto de tolerancia a alta dosis (Gómez-Lucía *et al;* 2007).
Hay una gran variación en los esquemas de inoculación dados por los diferentes investigadores. Se han utilizado varios esquemas de inmunización se sabe que la vía intramuscular, intravenosa e intradérmica generan respuestas inmunes importantes (Pardo, 1996).

Vía Subcutánea: La inmunoterapia subcutánea induce un aumento inicial de la IgE sérica seguida de una disminución gradual a lo largo de meses o años de tratamiento. También se produce un aumento de la IgG y de la IgA específicas (Fiandor, 2008).

Vía Oral: Se viene utilizando desde principios de siglo, se administra el antígeno en forma de cápsulas de protección entérica para protegerlo de la digestión y desnaturalización en el estómago y primeras porciones de duodeno, lo que no impide

que parte del antígeno sea absorbido como proteína completa. Es necesario administrar mayores dosis que la vía subcutánea y los resultados terapéuticos son más lentos. La inmunoterapia oral ofrece, teóricamente, múltiples ventajas respecto a la administración subcutánea: es más fácil y cómoda de administrar, es mejor aceptada por los niños y existen menos riesgos de reacciones adversas (Fiandor, 2008).

6.11 Adyuvantes inmunológicos

Son sustancias inmunomoduladoras que constituyen una familia muy heterogénea si se toman en consideración su origen, naturaleza química y actividad biológica específica; Como los agentes inmunopotenciadores, a los cuales se les atribuyen 2 funciones fundamentales: la estimulación de la resistencia no específica del huésped contra las enfermedades infecciosas y el cáncer; y, por otra parte, la potenciación de la inmunogenicidad de las vacunas comerciales y de la respuesta de los animales de laboratorio durante la inmunización experimental con vistas a la producción de antisueros. Los adyuvantes son sustancias o preparados que incorporados al antígeno o inyectados simultáneamente con él, hacen más efectiva la respuesta inmune. Con su empleo se logra una economía de antígeno y de tiempo, así como un mayor nivel de anticuerpos específicos. El aumento de la inmunogenicidad puede estar mediado por uno o varios de los siguientes procesos:

a) Incremento de la producción de anticuerpos específicos frente a un antígeno vacunal.
b) Aumento de la afinidad de los anticuerpos inducidos con una potenciación de su función neutralizante, germicida, opsonizante etc.
c) Incremento de la magnitud y/o efectividad de la respuesta mediada por células T.
d) Generación de una respuesta humoral y/o celular de mayor duración.
e) Generación de una respuesta incrementada de memoria inmunológica (Oliver *et al.*, 2008).

V.I.T.S.: Es un producto comercial utilizado, probado y aprobado para inmunoterapia sublingual en humanos, el cual nos confiere efecto como adyuvante, fabricado por laboratorios EMIR.

7.1 Material biológico

Se utilizaron 36 murinos (ratas) hembras de la cepa Long Evans de aproximadamente 2 meses y medio de edad, 6 para la elaboración del inmunógeno de 45kDa de *T. spiralis* y 5 para cada uno de los grupos controles sanos e infectados y grupos experimentales y 6 ratones de la cepa BALB/c para verificar la reproducción del ciclo de los diferentes grupos.

7.2 Diseño experimental

Se utilizaron seis grupos experimentales con un diseño de 6x2x2x5, de acuerdo con la siguiente descripción de cada uno de los ensayos.

1. Control sano (CS): al cual no se le dio ningún tratamiento, seis semanas después se sacrificaron.
2. Control infectado (CI): los murinos de dos meses y medios, se infectaron con 500 LI de *T. spiralis* y se sacrificaron a las 6 semanas.
3. El tercer grupo, se inmunizó a 5 murinos de dos meses y medio por el método parenteral con el inmunógeno de 45kDa de *T. spiralis* a los 0 (vía muscular), 7 (vía subcutánea), 14 (vía muscular) y 21 (vía peritoneal) días, a la 4 semana se retaron con 500 LI de *T. spiralis* y se sacrificaron a las 6 semanas.
4. El cuarto grupo, se infectaron 5 murinos con aproximadamente 500 LI, después de 4 semanas postinfección se aplicó por el método parenteral el inmunógeno de 45kDa de *T. spiralis* a los 0 (vía muscular), 7 (vía subcutánea), 14 (vía muscular) y 21 (vía peritoneal) días y se sacrificaron a las 6 semanas.
5. El quinto grupo, se inmunizaron a 5 murinos por vía sublingual con el inmunógeno de 45kDa de *T. spiralis* a los 0, 7, 14 y 21 días, a las 4 semanas se retaron con 500 LI de *T. spiralis* y se sacrificaron a las 6 semanas.
6. El sexto grupo, se infectaron 5 murinos con aproximadamente 500 LI, después de 4 semanas postinfección se aplicó vía sublingual el inmunógeno

de 45kDa de *T. spiralis* a los 0, 7, 14 y 21 días y se sacrificaron a las 6 semanas.

Para la inmunización se tomó como día cero la cuarta semana de post infección (Tabla 9).

Tabla 9.

Grupos utilizados para el método experimental

Grupo	Modelo experimental	Animales por grupo	0 días (vía muscular)	7 días (vía subcutánea)	14 días (vía muscular)	21 días (vía peritoneal)
1	Control Sano	5	No aplica, sin inmunización	No aplica, sin inmunización	No aplica, sin inmunización	No aplica, sin inmunización
2	Control infectado	5	No aplica, sin inmunización	No aplica, sin inmunización	No aplica, sin inmunización	No aplica, sin inmunización
3	Infectado Inmunización Parenteral	5	Parenteral	Parenteral	Parenteral	Parenteral
4	Retado Inmunización Parenteral	5	Parenteral	Parenteral	Parenteral	Parenteral
5	Infectado Inmunización Sublingual	5	Vía sublingual	Vía sublingual	Vía sublingual	Vía sublingual
6	Retado Inmunización Sublingual	5	Vía sublingual	Vía sublingual	Vía sublingual	Vía sublingual

- No aplica, sin inmunización ° Vía sublingual • Parenteral (Vía muscular, vía peritoneal, vía subcutánea)

Para la administración vía sublingual se le agrego un adyuvante de uso comercial de laboratorios EMIR de uso humano, en cada inmunización se administraron 10µg de la proteína.

7.3 Estrategia Experimental

A cada uno de los murinos se le realizaron 5 sangrados (preinfección o preinmunización y antemortem), por medio de seno venoso orbital con tubo capilar por presión con un volumen medio de 0.1-0.5 mL al animal anestesiado en cámara de gas con halotano ($C_2HBrClF_3$) los primeros 2 sangrados y por punción cardiaca con un volumen mayor a 0.5 mL con animal anestesiado antes del sacrificio, obteniendo suero sanguíneo para realizar técnicas inmunológicas: Microinmunodifusión (MIID),

Dot-Elisa, Western Blot (WB) e Inmunoflourescencia (IFI). Además de que se obtuvo musculo de masetero, lengua, intercostal, diafragma y pierna para observar, la estructura del parásito, los cambios morfológicos y la viabilidad por medio de compresión de tejido, digestión artificial, tinción con Hematoxilina-Eosina.

Los modelos animales utilizados para el trabajo experimental fueron manejados y sacrificados bajo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana (NOM) NOM-062-ZOO-1999 que contempla las especificaciones técnicas para la reproducción, cuidado y uso de animales de laboratorio y aprobado por el Comité de Seguridad y Ética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autonóma de Nuevo León.

7.4 Elaboración de inmunógeno de *T. spiralis*

Para la elaboración del inumnógeno de *T. spiralis*, se utilizaron 6 ratas de la cepa Long Evans, las cuales fueron infectadas con aproximadamente 500 LI, se sacrificaron a las 6 semanas postinfección, se obtuvo todo el músculo para obtener las LI por medio de digestión artificial. Se separaron las LI después de varios lavados con solución básica de fosfatos (PBS), para sonicarlas con la finalidad de romper cutícula y vaciar el contenido antigénico de las LI como más adelante se menciona.

7.5 Extracción de antígeno soluble total (AST) de *T. spiralis*

Se obtuvo por medio de la extracción con nitrógeno líquido, a las LI obtenidas por digestión artificial, se lavaron tres veces con PBS con un pH de 7.3, se le añadió el nitrógeno líquido en cantidad suficiente para cubrir las LI y por estallamiento permitió la salida de los componentes antigénicos, el homogenizado se verificó al microscopio óptico para verificar que las LI estén totalmente fraccionadas, se centrifugaron a 3500 rpm por 1.5 h (Chávez *et al.*, 2012; Muñoz, 2013).

7. 6 Determinación de proteínas

Se obtuvo una curva estándar utilizando albúmina sérica bovina, según la metodología de Bradford, ajustado a la concentración de proteínas obtenidas a una densidad óptica de 610 nm mediante azul de Coomassie al 0.06 % preparado en HCl al 2.2%. Interpolando el valor de la densidad óptica del antígeno, a la de la curva

estándar de albúmina, se conoce el valor de la concentración de proteínas contenidas en el antígeno AST y para el inmunógeno de 45kDa (Bradford y Lancetti, 1976).

7.7 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida (EGPA)

Para la separación del AST e inmunógeno de 45 kDa se realizaron corrimientos electroforéticos en minigeles de poliacrilamida (PAGE) en condiciones reductoras. Se utilizaron geles de 7 x 7 cm preparados con dodecil sulfato de sodio (SDS), a concentración de acrilamida al 11%, la relación acrilamida – bisacrilamida fue de 1:60 en el gel separador. El tiempo de corrimiento, fue de 2 h a 100 V El AST y el inmunógeno de 45 kDa se prepararon por ebullición durante 5 min. En una solución reductora, Tris-HCl 1 M, pH = 6.8, glicerol 20%; SDS al 2%, azul de bromo fenol al 0.5%, EDTA; H_2O, ditiotreitol 5 mM y 2 β-mercaptoetanol al 5%. Se utilizaron los siguientes marcadores de peso molecular: Fosforilasa (97 kDa), albúmina sérica bovina (68 kDa), ovalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (24kDa), lisosima (14 kDa); Se usó una cámara PROTEAN II xi Cell (Bio-Rad), aplicando un tiempo de corrimiento de 2 h con el voltaje de 100 V ya que se obtuvo el corrimiento se tiñó uno de los geles con azul de Coomassie, se le aplicó solución desteñidora, luego solución aclaradora, posteriormente fue secado el gel en membranas de papel celofán, en el aparato de GELDRYER MODEL 583 of BIO-RAD, los geles no teñidos fueron transferidos a papel de nitrocelulosa (Laemmli *et al.*, 1970).

7.8 Elución del inmunógeno de 45 kDa de *T. spiralis*

Del músculo infectado con LI de *T. spiralis* se obtuvo el AST al cual se le realizó electroforesis (SDS-PÁGE), reduciendo en condiciones del 10% geles de poliacrilamida. En la porción del gel que contenía el triplete característico de 42, 43 y 45 kDa se separó realizando por elución, con solución de Tris 10mM, a un pH de 8.13, adicionándole inhibidores de proteasa, posteriormente se homogenizó mediante centrifugación a 12,100 x gravedades a 4° C durante 30 min. La proteína que se obtuvo del sobrenadante, se le realizó la determinación de concentración de proteína por el método de Bradford. Posteriormente se filtró mediante las membranas que permitió el paso del péptido de 45 kDa, el sobrenadante se tomó para ser analizado por el SDS-EPPA reducido a 10%, en el gel para confirmar la presencia de este

inmunógeno. Posteriormente estas fracciones se utilizaron como inmunógeno (Chapa *et al.*, 1992; Chávez, 2013).

Se obtuvo secuenciación de la proteína por medio de una base de datos general del software ProteinLinx Global Server (PLGS), para después hacerlo con un método de proceso donde se usó la base de datos especifica de *T. spiralis*, está fue obtenida de la Universal Uniprot-SwissProt donde se afirmó que los péptidos identificados tienen más del 95% de confiabilidad y masas exactas menores a 10ppm, obteniéndose dos proteínas (Chávez, 2013).

7.9 Técnicas Directas

a) Técnica de compresión de placa: Se utilizaron aproximadamente 50 mg de los tejidos (lengua, diafragma, masetero, pierna e intercostal), cada muestra se coloco entre 2 laminillas y se comprimieron, para ocupar una área de 1 x 5 mm, se observó al microscopio óptico, con lente al 10x, para analizar la morfología de la célula nodriza (Fragoso *et al.*, 1981; Laverde *et al.*, 2009; Chávez *et al.*, 2011).

b) Técnica de digestión artificial: Se utilizaron muestras de 30g de tejido (masetero, lengua, intercostal, diafragma y pierna), se incubaron a 37°C, en un tamíz de tul en forma de saco, suspendido en una solución al 0.3% de pepsina (10,000 U) y HCl al 37% (0.2 M) en 500 ml de agua destilada, dentro de un embudo de separación, se esperó 24 horas para separar el paquete larvario con las LI, que se depositaron en el fondo cada embudo y se observaron en una cámara de newbawer al microscopio óptico con lente 10X y se cuantificó el número de larvas infectantes (Del Río and Herrera, 1986; García *et al.*, 2012; Lia *et al.*, 2014). Se realizó a todos los grupos experimentales determinación de características de célula nodriza.

7.10 Carga parasitaria

La carga parasitaria por estandarización fue medida por cada 1µL de contenido larvario se contaron 25 LI (García *et al.*, 2012; Muñoz, 2013).

7.11 Tinción con Azul tripano

De las muestras observadas a compresión de tejido se sumergieron en un ependorf con aproximadamente 1 mL de solución preparada con Azul tripano por 3 a 4 h, se

observaron al microscopio a 10, 40 y 100x, se analizó si el colorante entra a la LI o no, evidenciando de esta forma su viabilidad.

7.12 Técnica de tinción con Hematoxilina-Eosina

El tejido se conservó en formol al 10% para cortes histológicos, con el fin de determinar las características de la célula nodriza por una tinción de Hematoxilina-Eosina (HE) (Gridley, 1957). Los tejidos se deshidrataron para procesarlos en parafina, esto se llevó a cabo en un procesador de tejidos (LipshawAutomaticTissueProcessor) de la siguiente manera:

- El tejido permaneció en formol al 10 % por 12 hs y en alcohol etílico al 80% por 1 h
- Alcohol etílico del 96%, realizando 3 cambios de 30 min.
- Alcohol etílico absoluto, 3 cambios cada 1.5 hs
- Xileno, 2 cambios cada 1.5 hs
- Parafina a 60°C, en 2 cambios cada 1.5 hs y al final fueron
- Colocar los tejidos en moldes cúbicos hasta enfriar.
- Después de 24 h, se colocaron en cama de hielo para efectuar los cortes, con un espesor de 4μ (Microtomo modelo 820 Rotary, American Optical)
- Posteriormente en un portaobjetos, cubriéndolos con un gel a base de clara de huevo y glicerol en dilución 1:1, más unos granos de Tibol como conservador
- Los cortes se colocaron en placa caliente para fundir la parafina y continuar con la tinción con H-E como se describe en el (Gridley, 1957).

El proceso de tinción se llevó a cabo en un tren de tinción:

- Los portaobjetos se colocaron en una canastilla para ser introducida en las siguientes soluciones:
- Xileno, 5 min
- Alcohol etílico absoluto por 3 min
- Alcohol etílico al 96% por 3 min
- Alcohol etílico del 96% por 3 min.
- Agua destilada (de manera rápida).
- Hematoxilina de Harris (por unos segundos) agua potable
- Alcohol ácido al 1 % (de manera rápida) agua potable.

- Solución saturada de carbonato de litio por 2 min.
- Agua potable-Eosina (por unos segundos); agua potable.
- Dos cambios en alcohol etílico al 96 %.
- Realizar 3 cambios en alcohol etílico absoluto.
- Xileno (todos los pasos anteriores son de 1min.)
- Montar con resina sintética Sigma® y
- Cubrier con un portaobjetos
- Observación al microscopio óptico a 40 y 100X (Moreno *et al.*, 2011; Chávez *et al.*, 2012; Muñoz, 2013).

7.13 Manejo de animales y obtención de muestra

Se obtuvo suero de todos los animales por vía intraorbital o intracardiaca para la realización de las técnicas indirectas inmunológicas y el sacrificio de los animales se llevó a cabo según las normas de sacrificio humanitario NOM-033-ZOO-1995, se anestesiaron con vapores de alotano, para después proceder al sacrificio (Diario Oficial, 1996).

Para obtener la caracterización inmunológica se realizó Intradermorreacción (IDR), Microinmunodifusión doble (MIDD), Dot-ELISA, Inmunoelectrotransferencia (IET) e Inmunofluorescencia (IFI).

7.14 Técnica de intradermorreación (IDR)

Las intradermorreacciones consisten en la aplicación intradérmica de una sustancia conocida con la finalidad de evaluar la hipersensibilidad retardada (HSR). Se utilizan con fines diagnósticos y pronósticos en algunas enfermedades (Rodríguez *et al.*, 2008). Durante mucho tiempo fue la fue la única prueba accesible para estudiar y evaluar la inmunidad celular, dicha reacción es uno de los mecanismos efectores mediados por células, conocido como reacción de hipersensibilidad retardada (DTH), el mecanismo efector son los fagocitos mononucleares (macrófagos) (Garibay, 2006).

Se aplicó el inmunógeno de 45kDa a evaluar vía intradérmica con jeringa de insulina de 100 unidades, 10 µg de proteína y se analizó la zona de observación a la 2, 6, 24, 48 y 72 hs y se evalúo la triple respuesta de Lewis: rubor, calor e induración (Moreno *et al.,* 1996).

7.15 Técnica microinmunodifusión doble (MIDD).

Para la microinmunodifusión doble se elaboró un gel de agar al 1 % en agua destilada con azida de sodio, para evitar contaminación; se colocó en una cantidad de 4.5 mL a 55°C sobre una laminilla de vidrio, una vez en forma sólida, se procedió a formar la roseta con un horadador, procurando una equidistancia de 0.5 cm entre pozo y pozo; la confrontación se realizó colocando siempre el antígeno en una cantidad de 20 µL (18 µg) en el centro y, en torno a éste, un suero de reactividad conocida, (en la misma proporción en volumen sin diluir), se dejó a temperatura ambiente en cámara húmeda de 24 a 48 hs, hasta observar líneas de precipitación entre el suero positivo y el antígeno; luego se procedió a teñir el gel con azul brillante de Coomassie G 250, en un 25 % en volumen (Ouchterlony, 1958; Chávez, 2012), para la determinación de anticuerpos anti-*T. spiralis.*

7.16 Técnica Dot-ELISA

Método alternativo para la detección rápida de anticuerpos causados por la infección de *T. spiralis* contra antígenos de ES (Mitreva y Jasmer, 2006; Gottstein *et al.,* 2009; Muñoz, 2013).

El papel de nitrocelulosa (NC) es cortado y cuadriculado (cada cuadro es de $1cm^{2)}$, enseguida, se colocó en cada cuadro 5µL de AST dejándose incubar por 24 hs a temperatura ambiente, trascurrido este tiempo el papel de NC se dejó incubando 18 hs en agitación lenta y constante en PBS-leche al 3% (3g de leche descremada en polvo en 100 mL de PBS), a continuación el papel de NC se lavó dos veces en agitación constante durante 15 min en solución de PBS-Tween al 0.05% (7.5 ml de Tween 20 más 1.5 L de PBS). Después, se colocó 10 µL de cada sueros problema y controles (positivo y negativo), diluidos 1:100, se volvió a incubar con leche al 3% pero esta vez durante 90 min a temperatura ambiente y agitación lenta y constante, al término de los 90 minutos se lavó dos ocasiones durante 15 min cada una con PBS-Tween y un tercer lavado con PBS durante el mismo tiempo. El siguiente paso fue

colocar 10µL del segundo Ac (anti-IgG de rata conjugado con peroxidasa) diluido 1:1000 en PBS-leche al 3 %, el cual también se incubó durante 90 min en agitación constante en PBS-leche al 3%, siguiendo el protocolo se pasó a realizar dos lavados más con PBS-Tween y uno con PBS de 15 min. Finalmente el papel de NC se reveló con 3,3'diamino-benzidina (50mg en 100ml de PBS), agregándole 10µL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), posteriormente se lavó el papel de NC por dos ocasiones con agua destilada, dejándose secar a temperatura ambiente (Aguilar *et al.*, 2000).

7.17 Técnica inmunoelectrotransferencia (IET).

Esta técnica es de alta sensibilidad determinación de tipo de inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM y policlonal (IgA, IgM e IgG) de los diferentes tipos de sangrados.

El producto que se obtuvo del corrimiento en gel de poliacrilamida se transfirió a papel de NC, de acuerdo a lo descrito por (Towbin y Sthanlin, 1979), utilizando la cámara de Transblot- Cell (Bio-Rad)® a 35 V, durante toda la noche a 4°C.

El papel de NC fue teñido con fastgreen (verde rápido) por 5 min. con agitación constante, se retiró el colorante y se decoloró en agua destilada, para verificar transferencia de las proteínas, se dejó secar y se cortaron las tiras del ancho aproximado de cada carril (0.5 cm).

Transcurrido lo anterior, se procedió a cubrir cada tira con una solución de PBS-leche en polvo al 3% y azida de sodio al 0.15% a 4°C, con agitación constante por toda la noche. Enseguida se lavaron 3 veces por 10 min. con PBS, se continuó con la incubación por 1.5 h con los sueros de las ratas en una dilución de 1:100 en PBS-leche en polvo al 3% a 37°C con agitación constante, posteriormente se lavaron en dos ocasiones con PBS-Tween 20 al 0.3% por 10 min. y tres más con PBS otros 10 min. A continuación se incubó con el segundo anticuerpo Anti-IgG de ratas, conjugado con peroxidasa 1: 2000 PBS-leche en polvo al 3% por 1 h., a temperatura ambiente, con agitación, después se lavaron 2 veces con PBS-Tween 20 al 3% y se enjuagó con PBS, por 10 min.

El patrón de Bandeo de cada tira se reveló con 3,3´ di amino – benzidina (DAB), 50 mg en 100 mL de PBS, usando, como sustrato, peróxido de hidrógeno al 37 % (Towbin y Sthanlin, 1979).

7. 18 Técnica inmunofluorescencia (IFI).

Es una técnica que detecta complejos antígeno-anticuerpo usando anticuerpos anti-inmunoglobulina rata marcados con colorantes fluorescentes como el isotiocianato de fluoresceína. Estas sustancias al ser excitadas con luz de longitud de onda del rango ultravioleta 190-380nm, emiten luz visible que se observa como fluorescente en un microscopio de fluorescencia. Esta técnica es de sensible determinación de Inmunoglobulinas del tipo IgG, IgA e IgM, que nos permite definir la localización en la LI de *T. spiralis.*

La técnica se implementa en fase líquida, en un ependorf se colocan 15µL de larvas de *T. spiralis* obtenidas por digestión artificial, lavadas anteriormente en una solución de PBS-Twen al 5%, con 1000µL de PBS, se realizaron tres lavados por 5 minutos, se extraen 900µL de PBS en el último lavado y se incuba por 45min con 20µL del primer anticuerpo (suero problema), se hacen tres lavados más por 5 minutos con PBS y se incuba 45min más con 40µL del segundo 1 µL de anticuerpo en 1000µL de PBS, se hacen tres lavados, se colocó en un portaobjetos aproximadamente 1µL, se cubrió con portaobjetos y se examinó en el microscopio de fluorescencia. Si la reacción es positiva, se producirá la formación del complejo antígeno-anticuerpo (Venturiello *et al.*, 1998).

7.19 Modelo estadístico.

El modelo lineal estadístico fue un diseño experimental completamente al azar, los factores bajo estudio fueron:

Factor A: técnica, que tendrá 3 niveles (1)- Digestión artificial (2)- Observación en Compresión de tejido(3)- Hematoxilina-Eosina.

Factor B: infección con 8 niveles a ensayar.

a) ratas control sano (CS).

b) ratas control infectado (CI).

c) ratas infectadas e inmunizadas con 4 dosis a los 7 días.

d) ratas infectadas e inmunizadas con 4 dosis a los 14 días ratas infectadas e inmunizadas con 4 dosis a los 2 meses y medio.

f) ratas inmunizadas con 4 dosis y retadas a los 7 días.

g) ratas inmunizadas con 4 dosis y retadas a los 14 días.

h) ratas inmunizadas con 4 dosis y retadas a los 2 meses y medio resultando 24 tratamientos por ensayar.

El modelo lineal asociado al diseño de tratamientos expuesto, será de la siguiente forma: $Y_{ijk}=M+\Delta_i(\gamma_k)+\beta_j(\gamma_k)+\Delta_i\beta_j(\gamma_k)+\xi_{ijk}$

Dónde:

Y_{ijk}= Valor observado en la k-esima repetición, del j-ésimo nivel del factor B (infección) para el i-ésimo nivel de factor A (técnica).

M= Media general de todo experimento.

Δ_i= efecto del i-ésimo nivel del factor A.

β_j= Efecto del j-ésimo nivel del factor B.

γ_k= Efecto de la K-ésima especie

$\Delta_i\beta_j$= Efecto de la interacción entre el j-ésimo nivel del factor B con el I-ésimo nivel del factor A.

ξ_{ijk}= Error aleatorio asociado a la k-ésima repetición del j-ésimo nivel del factor B con el I-ésimo nivel del factor A.

8. RESULTADOS

En el presente estudió se analizaron un total de 42 murinos hembras, 36 de la cepa long evans de los cuales 30 se dividieron en 6 grupos: control sano, control infectado, inmunizado vía parenteral y retados, infectados e inmunizados vía parenteral, inmunizados vía sublingual y retados e infectados e inmunizados vía sublingual, y 6 para la elaboración del inmunógeno de 45 kDa, además se utilizaron 6 ratones de la cepa BALB/c para corroborar si el ciclo de vida en los grupos experimentales era reproducible.

Para la obtención de la proteína de 45 kDa, primeramente se obtuvo el AST por medio de digestión artificial de músculos infectados con *T. spiralis*, ocurrió un rompimiento de cutícula y vaciado del contenido antigénico por medio de nitrógeno líquido y macerado de LI, se realizó la determinación de proteínas por el método de Bradford (Tabla 10 y Fig. 6), teniendo una concentración de 13.8 µg/µL, el AST fue sometido a corrimiento electroforético para la elución de la proteína de 45 kDa, esta fue fraccionada y dializada para la eliminación de contaminantes, a la proteína dializada se le realizó nuevamente la determinación de proteínas para su posterior administración, teniendo una concentración de 5.1µg/µL.

Tabla 10.

Absorbancia en determinación de proteína de AST por método de Bradford

						PROM	PROM
Blanco	0.022	0.035	0.058	0.022	0.035	0.0285	0.0285
5	0.032	0.041	0.066	0.032	0.041	0.0365	0.0365
10	0.129	0.1	0.107	0.1	0.107	0.1035	0.1035
20	0.157	0.151	0.18	0.157	0.151	0.154	0.154
30	0.234	0.131	0.233	0.234	0.233	0.2335	0.2335
40	0.239	0.201	0.224	0.312	0.224	0.268	0.268
50	0.376	0.325	0.368	0.376	0.368	0.372	0.372
60	0.451	0.51	0.434	0.451	0.434	0.4425	0.4425
70	0.509	0.469	0.498	0.509	0.498	0.5035	0.5035
80	0.571	0.554	0.503	0.571	0.554	0.5625	0.5625

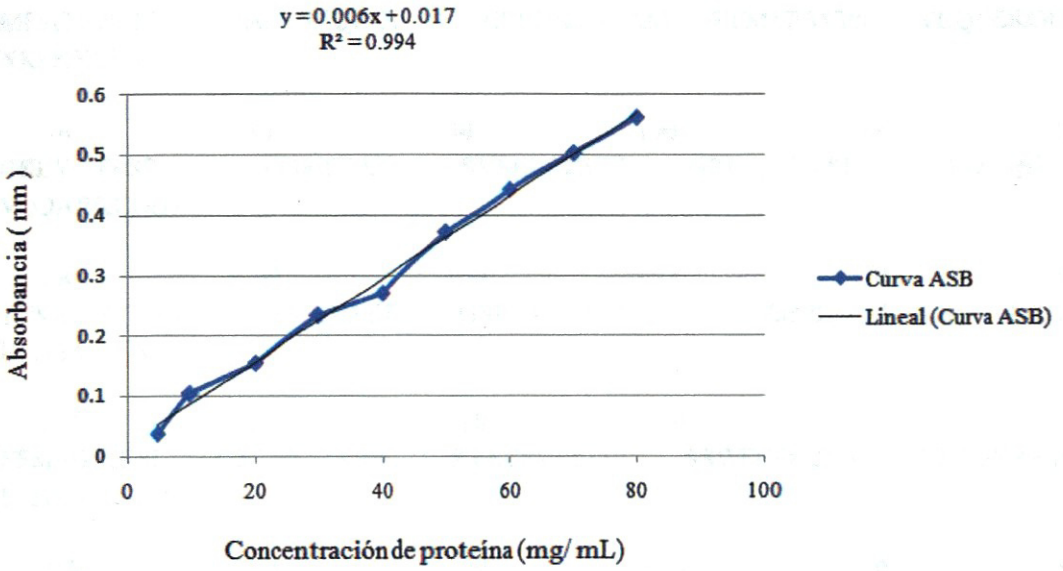


Figura 7. Gráfica de curva de absorbancia en determinación de proteína de AST por método de Bradford

En el laboratorio de Biología Celular y Microbiología de la Universidad Autónoma de Zacatecas como parte de una tesis de Doctorado se obtuvo la secuencia proteica por medio del software ProteinLinx Global Server (PLGS), posteriormente se hizo con un nuevo método de proceso usando la base de datos especifica de *Trichinella spiralis*, esta a su vez fue obtenida de la Universal Uniprot-SwissProt. A través de este análisis afirmaron que los péptidos identificados (Fig. 7), tienen más del 95% de confiablidad 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 (Chávez, 2013).

MFSITLNLFI IAFVNFQLCT CSTDNENVAM KEMTFSVPIS VLQNERQFDE NKLKKLLKPL

70 80 90 100 110 120
GKLYKTPSDK GIPISRTEAT LSVEKMMVEL NRLIQKEYSF LYKQYQKLKT VQQAEKCDDT

130 140 150 160 170 180
TNVYTVTLQN TDCESKPIIE GSPATNCSDV ENKHPLSCSI LSKVASAEEK IIGAYCSVHL

190 200 210 220 230 240
EESFPKKKSI CKLSRYPGEE KFKTFVPEDV SSWFHDAIVY VPTGNRPQSN SKHSNNYRGR

250 260 270 280 290 300
QGIAGLGMLP HLGAVQMNVV TIFRKNGKTT EVLSLINAND SIEIPKVFVT NPIQKPFGDE

310 320 330 340 350 360
IDRILRKAFD TMELSNSDKE DKLQKLYNAT ISTKVKHRAT PYDTDDAYVI TEVAGVFDEN

370 380 390 400 410
KEHIGSIDKF PSDGNLQIGW KEADKSALRL KRFAKPPKGF FQHVFSELQL LF

Fig. 8. Secuencia total obtenida del antígeno obtenido en el Laboratorio de Biología Celular y Microbiología, UAZ

Dentro de esta secuencia que encontraron en la base de datos dos proteínas con secuencias semejantes a las que encontraron en la muestra procesada.

Tabla 11.

Características de las proteínas obtenidas (Chávez, 2013)

Características	Proteína 1	Proteína 2
PM	45940	46607
No. Péptidos	31 péptidos	21 péptidos
Descripción	Multi cystatin like domain protein OS *Trichinella spiralis* GN mcd 1 PE 2 SV 1	53kDa excretory secretory antigen OS *Trichinella spiralis* GN gp53 PE 2 SV 1

Antes de la realización de estas, cada uno de los sueros fueron examinados por medio de microinmunodifusión, técnica diagnóstica que nos arroja la interacción antígeno-anticuerpo con altas concentraciones de inmunoglobulinas, donde se pudo observar que a partir del día 28 postinfección en el grupo control infectado se presenta la interacción antígeno-anticuerpo, en los grupos que fueron inmunizados por diferentes vías y retados al terminar el esquema no hubo interacción hasta el reto, sin embargo en los grupos que fueron infectados y después inmunizados la interacción antígeno-anticuerpo ocurrió a partir de los 28 días después de la infección, como se muestra en la Tabla 12 y en la Figura 10.

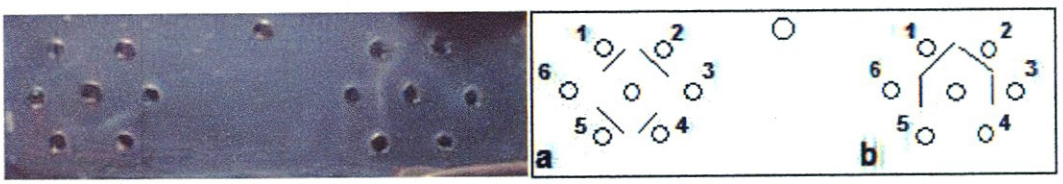


Fig 9. Microinmunodifusión y esquema representativo de la interacción Ag-Ac

a (grupos 4 y 6, infectados e imunmizados por vía sublingual y vía parenteral, 1) 21 días PI, 2) 28 días grupo 4; 4) 21 días, 5) 28 días grupo 6), b (grupos 1 y 2, control sano y control infectado, grupo control infectado: 1) 21 días PI, 2) 28 días PI, 3) al sacrificio; control sano 4) 21 días, 5) 28 días)

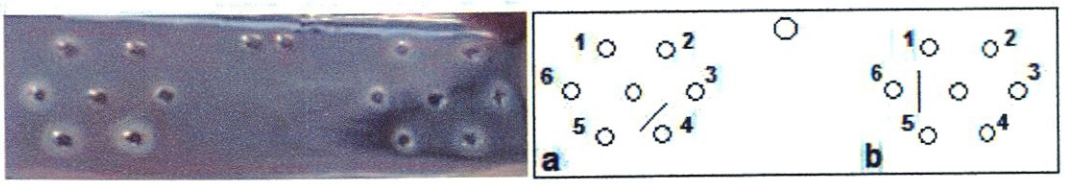


Fig 10. Microinmunodifusión y esquema representativo de la interacción Ag-Ac

a (grupo 3, inmunizado vía parenteral y retado: 6) 0 días, 1) 7 días, 2) 14 días, 3) 21 días, 4) al sacrificio), b (grupo 5, inmunlizado vía sublingual y retado: 2) 0 días, 3) 7 días, 4) 14 días, 5) 21 días y 6) al sacrificio.

Tabla 12. Interacción Ag-Ac por medio de microinmunodifusión
(sueros obtenidos en los diferentes tiempos de infección (CI) e inmunizaciones (experimentales), donde – significa que no hubo interacción y + hubo interacción Ag-Ac).

Número	Grupo	Tratamiento	Inmunizaciones				Sacrificio
			0 días	7 días	14 días	21 días	
1	1	Control sano	-	-	-	-	-
2	2	Control infectado	-	-	-	+	+
			1ra	**2da**	**3ra**	**4ta**	
3	3	Inmunización parenteral – reto	-	-	-	-	+
4	4	Infección - Inmunización parenteral	+	+	+	+	+
5	5	Inmunización sublingual – reto	-	-	-	-	+
6	6	Infección - Inmunización sublingual	+	+	+	+	+

Dentro de los objetivos 1, 2 y 3. Evaluación y comparación de la cinética de la respuesta inmune en animales a los cuales se les administró el inmunógeno de 45 KDa vía sublingual y vía parenteral y se retaron con LI de *T. spiralis*, por medio de las técnicas de Dot Elisa, Inmunoelectrotransferencia, Inmunofluorescencia, para determinar los anticuerpos de clase IgG, IgM e IgA y un policlonal (IgA, IgM e IgG) en el caso de inmunoelectrotransferencia e inmunoflorescencia, se obtuvieron los siguientes resultados:

Los sueros de los grupos experimentales fueron sometidos por la técnica de Dot-ELISA para identificar a lo largo de las diferentes inmunizaciones las inmunoglobulinas presentes: IgG, IgM e IgA, por la cual se pudo observar que en el grupo sano no hubo una interacción con ninguna de las inmunoglobulinas (Fig.), mientras que el control infectado a las 6 semanas PI dio positivo por IgG y negativo por IgM e IgA, mientras que los grupos controles infectados a partir de las 24h PI se presentan positivos por las tres diferentes inmunoglobulinas (Tabla 13).

Tabla 13.
Interacción Ag-Ac por dot-Elisa del grupo sano y grupo control infectado a diferentes tiempos
(CS-control sano, CI-control infectado. PBS-Solución salina con fosfatos)

Número	Grupo	Tratamiento	Ig	Reacción
1	0	PBS	IgG	-
2	CS	Sin tratamiento	IgG	-
3	CI	6 semanas postinfección	IgG	+
4	CI	24 horas postinfección	IgG	+
5	CI	15 días postinfección	IgG	+
6	CI	24 días postinfección	IgG	+
7	CI	32 días postinfección	IgG	+
8	0	PBS	IgM	-
9	CS	Sin tratamiento	IgM	-
10	CI	6 semanas postinfección	IgM	-
11	CI	24 horas postinfección	IgM	+
12	CI	15 días postinfección	IgM	+
13	CI	24 días postinfección	IgM	+
14	CI	32 días postinfección	IgM	+
15	0	PBS	IgA	-
16	CS	Sin tratamiento	IgA	-
17	CI	6 semanas postinfección	IgA	-
17	CI	24 horas postinfección	IgA	+
19	CI	15 días postinfección	IgA	+
20	CI	24 días postinfección	IgA	+
21	CI	32 días postinfección	IgA	+

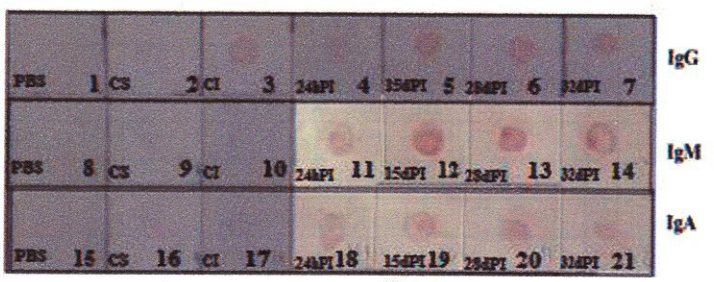


Fig 11. Dot-Elisa del grupo sano y grupo controlinfectado a diferentes tiempos
(realizados con IgG, IgM e IgA a una dilución de 1:1000 (PBS: solución buffer fosfato salino; CS: control sano; CI: control infectado; 24PI: 24 horas post-infección; 15dPI: 15 días post-infección; 28dPI: 28 días post-infeción y 32dPI: 32 días post-infección)).

Dot-Elisa para los diferentes grupos experimentales (grupo 3, 4, 5 y 6) con IgG mostro una reacción positiva desde 24h después de la primera inmunización en cada uno de los grupos y a lo largo de los tratamientos (Fig. 12 y Tabla 14).

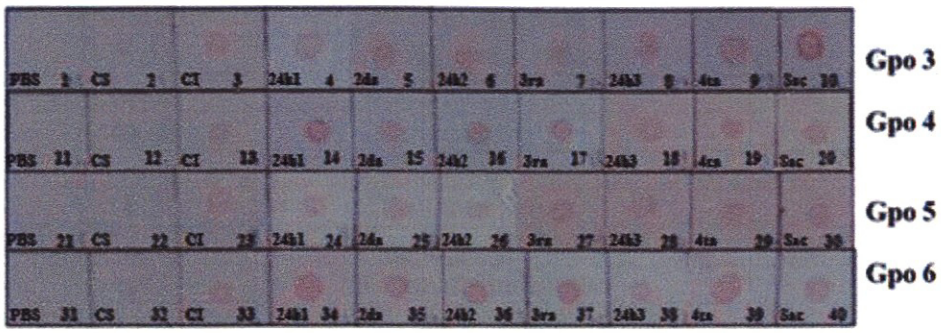


Fig 12. Dot-ELISA de los grupos 3, 4, 5 y 6 realizadas con IgG
(dilusión de 1:1000 (PBS: solución buffer fosfato salino; CS: control sano; CI: control infectado; 24h1: 24 horas post-primera inmunización; 2da: segunda inmunización; 24h2: 24 horas post-2da inmunización; 3ra: tercera inmunización; 24h3: 24 horas post-tercera inmunización; 4ta: cuarta inmunización; Sac: sacrificio)).

Tabla 14.
Interacción Ag-Ac por Dot-Elisa del grupo sano y grupo control infectado a diferentes tiempos
(CS-control sano, CI-control infectado. PBS-Solución salina con fosfatos, InmP-Inmunización parenteral y reto, InfP-Infección e inmunización parenteral, InmS-Inmunización sublingual y reto, InfS-Infección e inmunización sublingual)

Número	Grupo	Tratamiento	Ig	Reacción
1	0	PBS	IgG	-
2	CS	Sin tratamiento	IgG	-
3	CI	6 semanas postinfección	IgG	+
4	InmP	24h 1ra inmunización	IgG	+
5	InmP	2da inmunización	IgG	+
6	InmP	24h 2ra inmunización	IgG	+
7	InmP	3ra inmunización	IgG	+
8	InmP	24h 3ra inmunización	IgG	+
9	InmP	4ta inmunización	IgG	+
10	InmP	Sacrificio	IgG	+
11	0	PBS	IgG	-
12	CS	Sin tratamiento	IgG	-
13	CI	6 semanas postinfección	IgG	+
14	InfP	24h 1ra inmunización	IgG	+
15	InfP	2da inmunización	IgG	+
16	InfP	24h 2ra inmunización	IgG	+
17	InfP	3ra inmunización	IgG	+
17	InfP	24h 3ra inmunización	IgG	+
19	InfP	4ta inmunización	IgG	+
20	InfP	Sacrificio	IgG	+
21	0	PBS	IgG	-
22	CS	Sin tratamiento	IgG	-
23	CI	6 semanas postinfección	IgG	+
24	InmS	24h 1ra inmunización	IgG	+
25	InmS	2da inmunización	IgG	+
26	InmS	24h 2ra inmunización	IgG	+

27	InmS	3ra inmunización	IgG	+
28	InmS	24h 3ra inmunización	IgG	+
29	InmS	4ta inmunización	IgG	+
30	InmS	Sacrificio	IgG	+
31	0	PBS	IgG	-
32	CS	Sin tratamiento	IgG	-
33	CI	6 semanas postinfección	IgG	+
34	InfS	24h 1ra inmunización	IgG	+
35	InfS	2da inmunización	IgG	+
36	InfS	24h 2ra inmunización	IgG	+
37	InfS	3ra inmunización	IgG	+
38	InfS	24h 3ra inmunización	IgG	+
39	InfS	4ta inmunización	IgG	+
40	InfS	Sacrificio	IgG	+

Los sueros analizados del grupo 3 (inmunizado vía parenteral y retado con 500LI) con IgM e IgA fueron positivos desde la primera inmunización por las dos inmunoglobulinas y se mantuvo durante cada una de las administraciones parenterales (Fig 13 y Tabla 15).

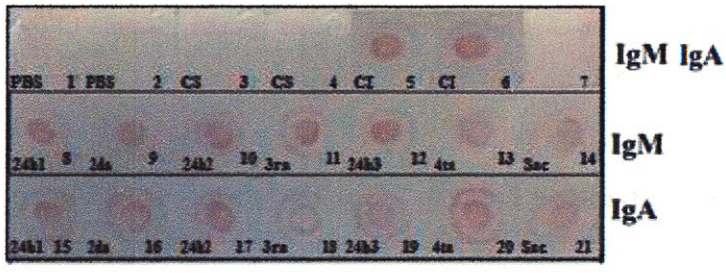


Fig. 13. Dot-ELISA realizada a los sueros de los murinos del grupo 3
(inmunizado vía tradicional y retado con 500 LI, con IgM e IgA con una dilución de 1:1000).

Tabla 15.
Interacción Ag-Ac por dot-Elisa del grupo 3 a diferentes tiempos
(CS-control sano, CI-control infectado. PBS-Solución salina con fosfatos, InmC-Inmunización parenteral y reto)

Número	Grupo	Tratamiento	Ig	Reacción
1	0	PBS	IgM	-
2	0	PBS	IgA	-
3	CS	Sin tratamiento	IgM	-
4	CS	Sin tratamiento	IgA	-
5	CI	6 semanas postinfección	IgM	+
6	CI	24 días postinfección	IgA	+
7				

8	InmP	24h 1ra inmunización	IgM	+
9	InmP	2da inmunización	IgM	+
10	InmP	24h 2ra inmunización	IgM	+
11	InmP	3ra inmunización	IgM	+
12	InmP	24h 3ra inmunización	IgM	+
13	InmP	4ta inmunización	IgM	+
14	InmP	Sacrificio	IgM	+
15	InmP	24h 1ra inmunización	IgA	+
16	InmP	2da inmunización	IgA	+
17	InmP	24h 2ra inmunización	IgA	+
17	InmP	3ra inmunización	IgA	+
19	InmP	24h 3ra inmunización	IgA	+
20	InmP	4ta inmunización	IgA	+
21	InmP	Sacrificio	IgA	+

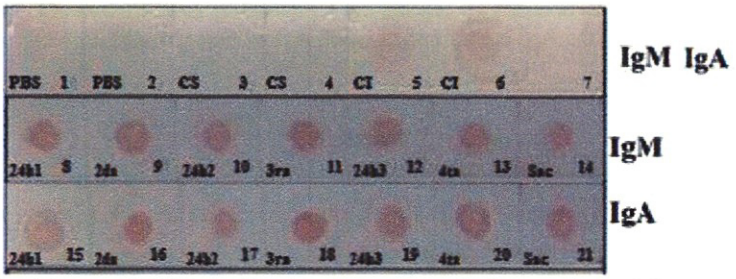


Fig. 14. Dot-ELISA realizada a los sueros de los murinos del grupo 4
infectado con 500 LI e inmunizado vía tradicional, con IgM e IgA con una dilución de 1:1000.

Tabla 16.
Interacción Ag-Ac por dot-Elisa del grupo 4 a diferentes tiempos
(CS-control sano, CI-control infectado. PBS-Solución salina con fosfatos, InfC-Infección e inmunización parenteral)

Número	Grupo	Tratamiento	Ig	Reacción
1	0	PBS	IgM	-
2	0	PBS	IgA	-
3	CS	Sin tratamiento	IgM	-
4	CS	Sin tratamiento	IgA	-
5	CI	6 semanas postinfección	IgM	+
6	CI	24 días postinfección	IgA	+
7				
8	InfP	24h 1ra inmunización	IgM	+
9	InfP	2da inmunización	IgM	+
10	InfP	24h 2ra inmunización	IgM	+
11	InfP	3ra inmunización	IgM	+
12	InfP	24h 3ra inmunización	IgM	+
13	InfP	4ta inmunización	IgM	+
14	InfP	Sacrificio	IgM	+
15	InfP	24h 1ra inmunización	IgA	+

16	InfP	2da inmunización	IgA	+
17	InfP	24h 2ra inmunización	IgA	+
17	InfP	3ra inmunización	IgA	+
19	InfP	24h 3ra inmunización	IgA	+
20	InfP	4ta inmunización	IgA	+
21	InfP	Sacrificio	IgA	+

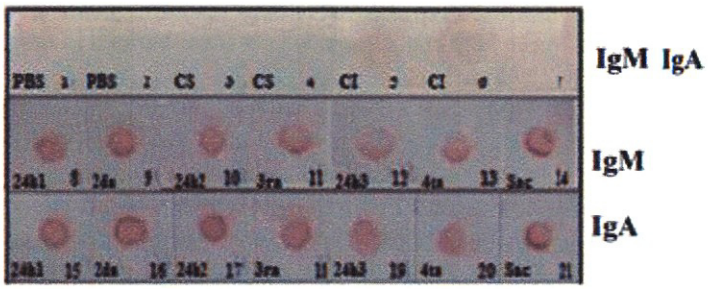


Fig. 15. Dot-ELISA realizada a los sueros de los murinos del grupo 5
(inmunizado vía sublingual y retado con 500 LI, con IgM e IgA con una dilución de 1:1000).

Tabla 17.
Interacción Ag-Ac por dot-Elisa del grupo 5 a diferentes tiempos
(CS-control sano, CI-control infectado. PBS-Solución salina con fosfatos, InmS-Inmunización sublingual y reto)

Número	Grupo	Tratamiento	Ig	Reacción
1	0	PBS	IgM	-
2	0	PBS	IgA	-
3	CS	Sin tratamiento	IgM	-
4	CS	Sin tratamiento	IgA	-
5	CI	6 semanas postinfección	IgM	+
6	CI	24 días postinfección	IgA	+
7				
8	InmS	24h 1ra inmunización	IgM	+
9	InmS	2da inmunización	IgM	+
10	InmS	24h 2ra inmunización	IgM	+
11	InmS	3ra inmunización	IgM	+
12	InmS	24h 3ra inmunización	IgM	+
13	InmS	4ta inmunización	IgM	+
14	InmS	Sacrificio	IgM	+
15	InmS	24h 1ra inmunización	IgA	+
16	InmS	2da inmunización	IgA	+
17	InmS	24h 2ra inmunización	IgA	+
17	InmS	3ra inmunización	IgA	+
19	InmS	24h 3ra inmunización	IgA	+
20	InmS	4ta inmunización	IgA	+
21	InmS	Sacrificio	IgA	+

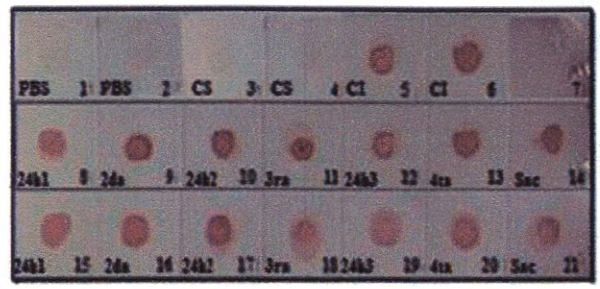


Fig. 16. Dot-ELISA realizada a los sueros de los murinos del grupo 6
(infectados con 500 LI e inmunizado vía sublingual, con IgM e IgA con una dilución de 1:1000.

Tabla 18.
Interacción Ag-Ac por dot-Elisa del grupo 6 a diferentes tiempos
(CS-control sano, CI-control infectado. PBS-Solución salina con fosfatos, InfS-Infección e Inmunización sublingual)

Número	Grupo	Tratamiento	Ig	Reacción
1	0	PBS	IgM	-
2	0	PBS	IgA	-
3	CS	Sin tratamiento	IgM	-
4	CS	Sin tratamiento	IgA	-
5	CI	6 semanas postinfección	IgM	+
6	CI	24 días postinfección	IgA	+
7				
8	InfS	24h 1ra inmunización	IgM	+
9	InfS	2da inmunización	IgM	+
10	InfS	24h 2ra inmunización	IgM	+
11	InfS	3ra inmunización	IgM	+
12	InfS	24h 3ra inmunización	IgM	+
13	InfS	4ta inmunización	IgM	+
14	InfS	Sacrificio	IgM	+
15	InfS	24h 1ra inmunización	IgA	+
16	InfS	2da inmunización	IgA	+
17	InfS	24h 2ra inmunización	IgA	+
17	InfS	3ra inmunización	IgA	+
19	InfS	24h 3ra inmunización	IgA	+
20	InfS	4ta inmunización	IgA	+
21	InfS	Sacrificio	IgA	+

Para la evaluación de las proteínas identificadas en cada uno de los sueros a los diferentes tiempos de los grupos experimentales se realizo la técnica de inmunoelectrotransferencia, con inmunoglobulinas de tipo IgA, IgM e IgG y además se utilizo un anticuerpo policlonal (IgA, IgM e IgG).

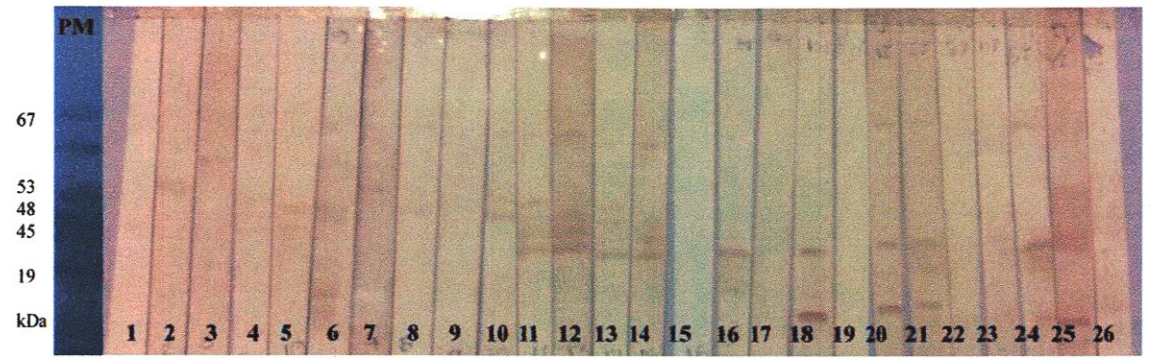


Fig. 17. Inmunoelectrotransferencia de los sueros obtenidos de grupos experimentales con anticuerpo IgA.

1 (control sano), 2 (CI, 24h PI), 3 (CI, 7d PI), 4 (CI, 15d PI), 5 (CI, 21d PI), 6 (CI, 28 d PI), 7 (InmP-Inf 1ra), 8 (InmP-Inf, 2da), 9 (InmP-Inf 3ra), 10 (InmP-Inf 4ta), 11 (InmP-Inf sacrificio), 12 (Inf-InmP 1ra), 13 (Inf-InmP 2da), 14 (Inf-InmP 3ra), 15 (Inf-InmP 4ta), 16 (Inf-InmP sacrificio), 17 (InmS-Inf 1ra), 18 (InmS-Inf 2da), 19 (InmS-Inf 3ra), 20 (InmS-Inf 4ta), 21 (InmS-Inf sacrificio), 22 (Inf-InmS 1ra), 23 (Inf-InmS 2da), 24 (Inf-InmS 3ra), 25 (Inf-InmS 4ta), 26 (Inf-InmS sacrificio).

Las inmunoglobulinas detectadas por western blot con IgA anti-*T. spiralis* de los sueros obtenidos en cada una de las inmunizaciones (Fig. 17), observándose que en lo que respecta el control infectado (del número 2 al 6) se puede observar que desde los 7 días ya se presentan algunas bandas proteicas, sin embargo el triplete característico se presenta a partir de los 15 días PI (banda 4), en las del grupo 3 (inmunizado vía parenteral y retado) a partir de la segunda inmunización (banda 8) se puede apreciar una banda de aproximadamente 67 kDa y hasta el reto es donde se presenta el triplete característico de proteínas, en el grupo 4 (infectado e inmunizado vía parenteral) se presenta el triplete característico desde la infección y en cada una de las inmunizaciones, en el grupo 5 (inmunizado vía sublingual y retado) se puede observar desde la 2da inmunización una banda de 19 kDa y la de 67 kDa y en el grupo 6 (infectado e inmunizado vía sublingual) se pude observar el triplete desde la infección.

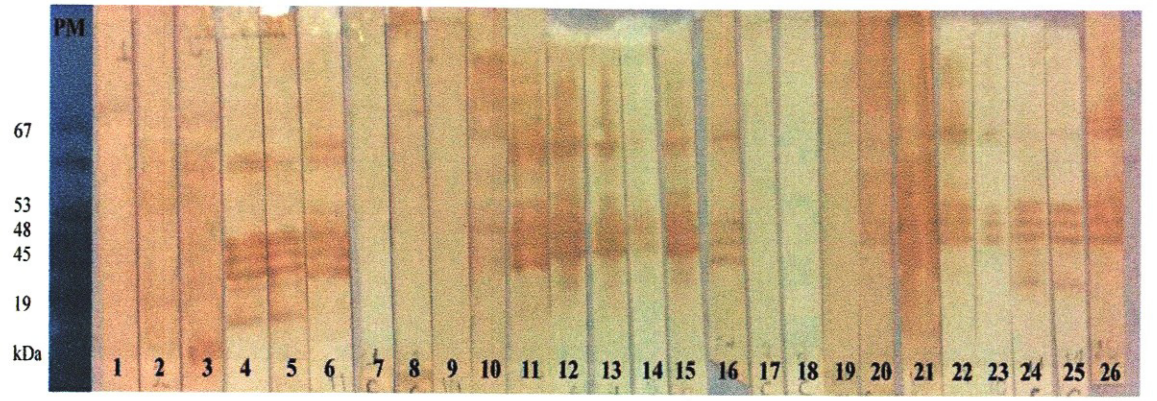


Fig. 18. Inmunoelectrotransferencia de los sueros obtenidos de grupos experimentales con anticuerpo IgM.

1 (control sano), 2 (CI, 24h PI), 3 (CI, 7d PI), 4 (CI, 15d PI), 5 (CI, 21d PI), 6 (CI, 28 d PI), 7 (InmP-Inf 1ra), 8 (InmP-Inf, 2da), 9 (InmP-Inf 3ra), 10 (InmP-Inf 4ta), 11 (InmP-Inf sacrificio), 12 (Inf-InmP 1ra), 13 (Inf-InmP 2da), 14 (Inf-InmP 3ra), 15 (Inf-InmP 4ta), 16 (Inf-InmP sacrificio), 17 (InmS-Inf 1ra), 18 (InmS-Inf 2da), 19 (InmS-Inf 3ra), 20 (InmS-Inf 4ta), 21 (InmS-Inf sacrificio), 22 (Inf-InmS 1ra), 23 (Inf-InmS 2da), 24 (Inf-InmS 3ra), 25 (Inf-InmS 4ta), 26 (Inf-InmS sacrificio).

En la Fig. 18, podemos observar las bandas proteicas con IgM anti-*T. spiralis*, a partir de los 7 días en el control infectado se observa ya una banda de aproximadamente 67kDa (banda 3) y a partir de los 15d PI hasta los 28d ya se observa el triplete característico, una proteína de 67kDa y antes de los 28d PI una de 19kDa aproximadamente, en el grupo 3 (inmunizado vía parenteral) no se identifican bandas proteicas hasta la 4ta inmunización se ven algunas bandas (banda 10), y hasta el reto se identifica el triplete característico, en el grupo 4 (infectado e inmunizado vía parenteral) el triplete característico fue identificado desde la infección hasta cada una de las inmunizaciones, presentándose también una proteína de más alto peso molecular.

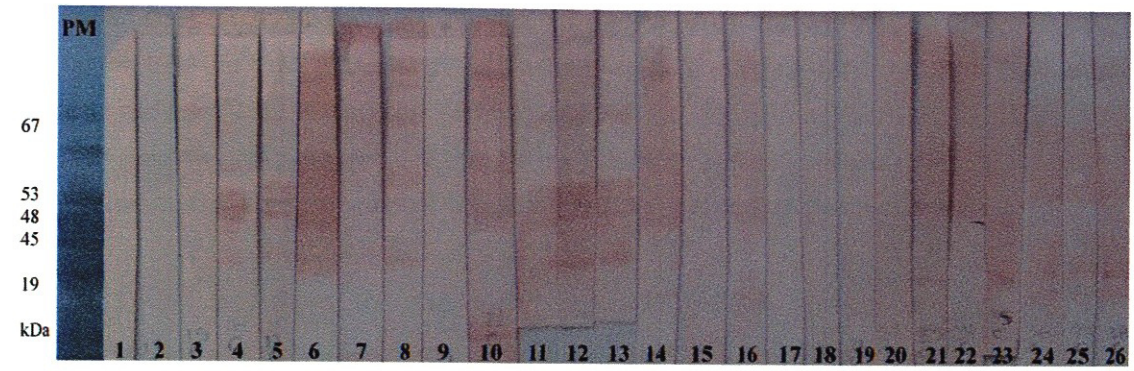


Fig. 19. Inmunoelectrotransferencia de los sueros obtenidos de grupos experimentales con anticuerpo IgG.

1 (control sano), 2 (CI, 24h PI), 3 (CI, 7d PI), 4 (CI, 15d PI), 5 (CI, 21d PI), 6 (CI, 28 d PI), 7 (InmP-Inf 1ra), 8 (InmP-Inf, 2da), 9 (InmP-Inf 3ra), 10 (InmP-Inf 4ta), 11 (InmP-Inf sacrificio), 12 (Inf-InmP 1ra), 13 (Inf-InmP 2da), 14 (Inf-InmP 3ra), 15 (Inf-InmP 4ta), 16 (Inf-InmP sacrificio), 17 (InmS-Inf 1ra), 18 (InmS-Inf 2da), 19 (InmS-Inf 3ra), 20 (InmS-Inf 4ta), 21 (InmS-Inf sacrificio), 22 (Inf-InmS 1ra), 23 (Inf-InmS 2da), 24 (Inf-InmS 3ra), 25 (Inf-InmS 4ta), 26 (Inf-InmS sacrificio).

La inmunoelectrotransferencia realizada con la IgG (Fig. 19) a partir de los 15d PI en el control infectado (banda 4) se puede observar que ya hay IgG anti-*T. spiralis* donde se pueden observar las proteínas de 45, 48 y 53kDa características de la infección y una banda de menor peso molescular, en el grupo control sano (banda 1) y del control infectado hasta los 7d PI no hay una identificación de anticuerpos (bandas 2 y 3), respecto al grupo inmunizado vía sublingual fue hasta el reto cuando se identificaron anticuerpos IgG, mientras que por la vía parenteral a partir de la 3ra inmunización ya se visualizaron, así como en el infectado e inmunizado vía parenteral, grupo 5 (bandas 12-13) y en el grupo 6.

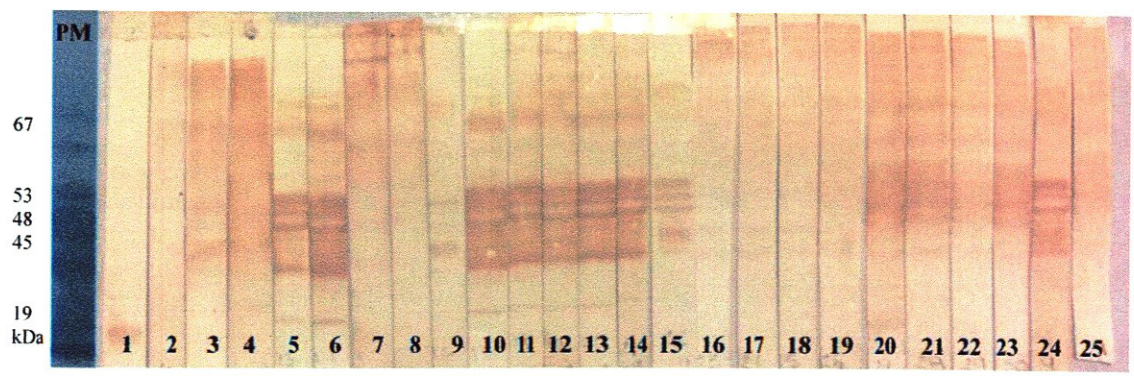


Fig. 20. Inmunoelectrrotransferencia de los sueros obtenidos de grupos experimentales con anticuerpo policlonal (IgA, IgM e IgG).

1 (control sano), 2 (CI, 24h PI), 3 (CI, 7d PI), 4 (CI, 15d PI), 5 (CI, 21d PI), 6 (CI, 28 d PI), 7 (InmP-Inf 1ra), 8 (InmP-Inf, 2da), 9 (InmP-Inf 3ra), 10 (InmP-Inf 4ta), 11 (InmP-Inf sacrificio), 12 (Inf-InmP 1ra), 13 (Inf-InmP 2da), 14 (Inf-InmP 3ra), 15 (Inf-InmP 4ta), 16 (Inf-InmP sacrificio), 17 (InmS-Inf 1ra), 18 (InmS-Inf 2da), 19 (InmS-Inf 3ra), 20 (InmS-Inf 4ta), 21 (InmS-Inf sacrificio), 22 (Inf-InmS 1ra), 23 (Inf-InmS 2da), 24 (Inf-InmS 3ra), 25 (Inf-InmS 4ta), 26 (Inf-InmS sacrificio).

Después de realizarse la inmunoelectrotransferencia por cada una de las inmunoglobulinas se realizó la identificación de anticuerpos (IgA, IgM e IgG) (Fig. 20) donde se identifico en a mayoría de las bandas, anticuerpos, con excepción del control sano (banda 1) y del control infectado a las 24h PI (banda 2), pero en todos se identificaron bandas proteicas unas con menos intensidad, donde claro se ve un bandeo característico es en el control infectado a los 21 y 28d PI (banda 5 y 6) en los grupos infectados e inmunizados por ambas vías (banda 10-14 y 20-25), presentándose tanto el triplete característico como proteínas de 67kDa y 19kDa aproximadamente.

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Los sueros de murinos obtenidos en los diferentes tiempos de las inmunizaciones y grupos fueron analizados por medio de inmunofluorescencia indirecta en microcopio confocal con IgA, IgM, IgG y policlonal (IgA, IgM, e IgG), donde se pudo observar la interacción de los anticuerpos presentes, en base a los controles negativos y positivos, y como se ha llevado a cabo en cortes histológicos por otros autores, los sueros que marcaban una fluorescencia en la cuticula y esticosoma son determinados como positivos y en los que no había fluorescencia o solo se presentaba en el esticosito se clasificaron como negativas (Tabla 19).

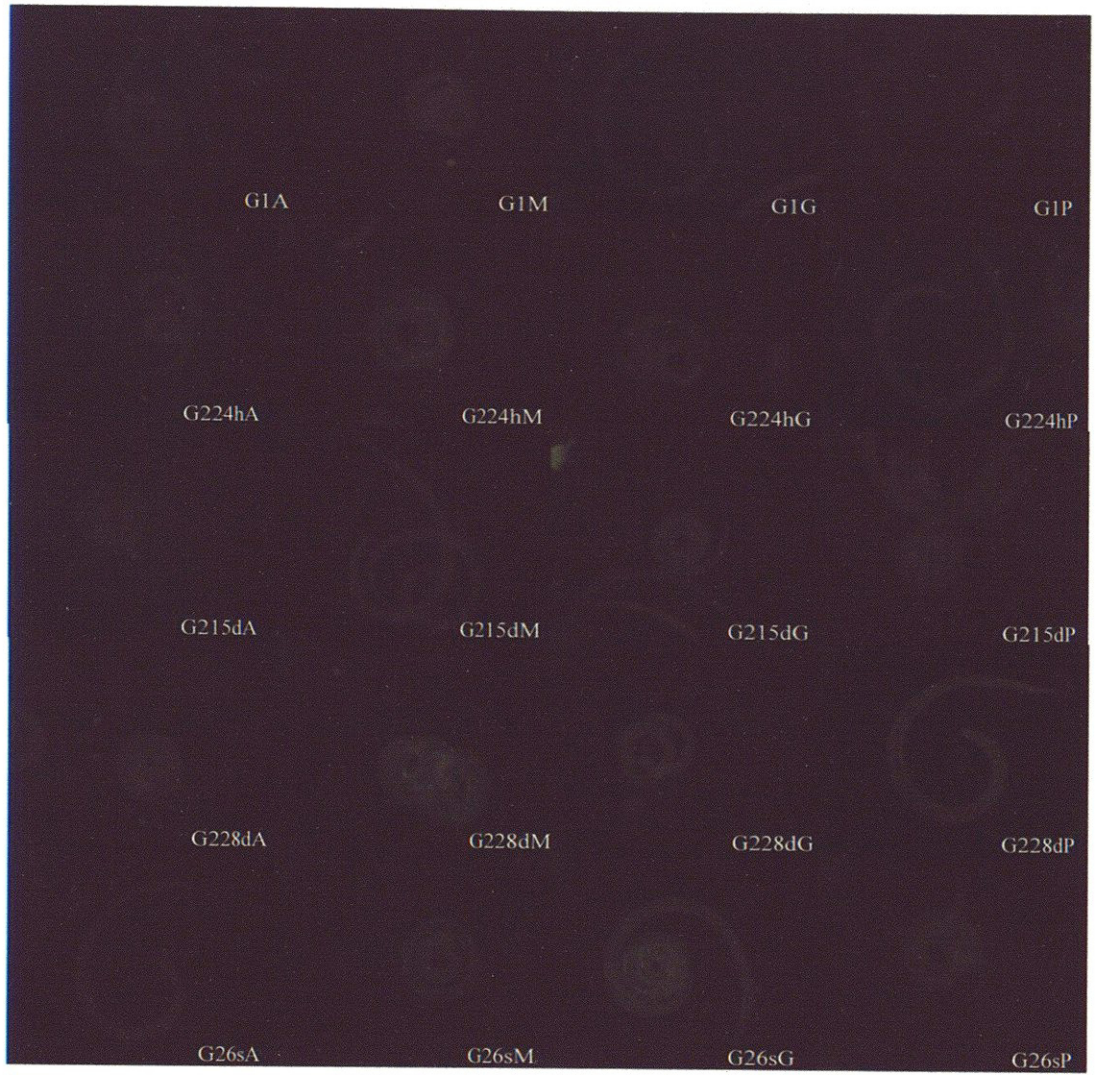


Fig. 21. Inmunofluorescencia en sueros de grupo 1 (control sano) y grupo 2 (control infectado)
G1(Grupo 1), G2 (Grupo 2), 24h (24 horas PI), 15d (15 días PI), 28d (20 días PI), 6s (6 semanas PI), A (IgA), M (IgM), G (IgG), P (Policlonal: IgA, IgM, IgG).

Tabla 19.

Resultados de inmunofluorescencias del grupo 1 (Control sano) y grupo 2 (Control infectado) Fig. 21 negativo (-), positivo (+).

G1A (--)	G1M (--)	G1G (--)	G1P (--)
G224hA (--)	G224hM (+)	G224hG (--)	G224hP (--)
G215dA (--)	G215dM (--)	G215dG (+)	G215dP (+)
G228dA (--)	G228dM (+)	G228dG (+)	G228dP (+)
G26sA (--)	G26sM (--)	G26sG (+)	G26sP (+)

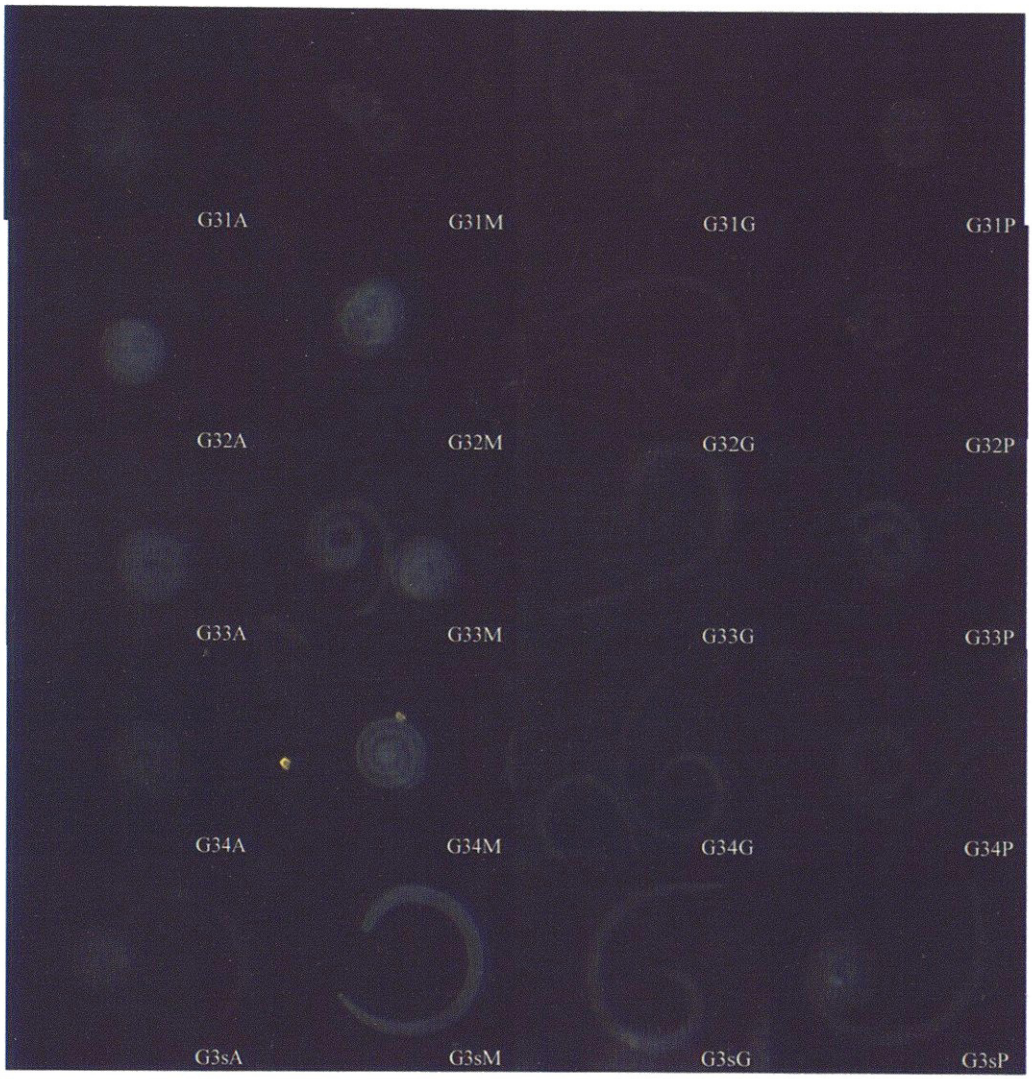


Fig. 22. Inmunofluorescencia en sueros de grupo 3 (inmunizado vía parenteral y retado) G3 (Grupo 3), 1 (primera inmunización), 2 (segunda inmunización), 3 (tercera inmunización), 4 (cuarta inmunización) s (sacrificio), A (IgA), M (IgM), G (IgG), P (Policlonal: IgA, IgM, IgG).

Tabla 20.

Resultados de inmunofluorescencias del grupo 3 (inmunizado vía parenteral y retado), Fig. 22 negativo (-), positivo (+).

G31A (+)	G31M (--)	G31G (--)	G31P (+)
G32A (+)	G32M (+)	G32G (--)	G32P (+)
G33A (--)	G33M (+)	G33G (+)	G33P (+)
G34A (--)	G34M (+)	G34G (+)	G34P (+)
G3sA (+)	G3sM (+)	G3sG (+)	G3sP (+)

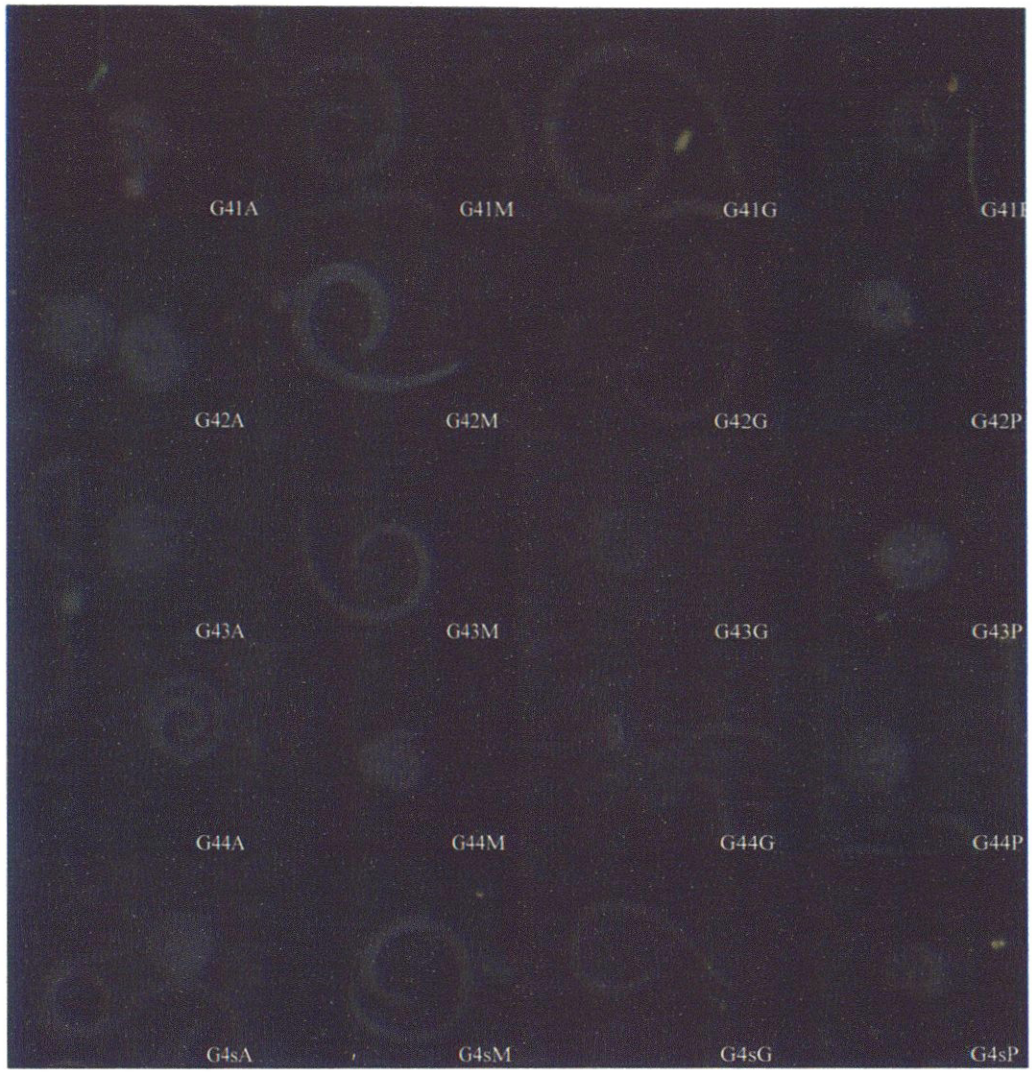


Fig. 23. Inmunofluorescencia en sueros de grupo 4 (infectados e inmunizado vía parenteral)
G4 (Grupo 4), 1 (primera inmunización), 2 (segunda inmunización), 3 (tercera inmunización), 4 (cuarta inmunización), s (sacrificio), A (IgA), M (IgM), G (IgG), P (Policlonal: IgA, IgM, IgG).

Tabla 21.

Resultados de inmunofluorescencias del grupo 4 (infectados e inmunizado vía parenteral), Fig. 23 9, negativo (-), positivo (+).

G41A (--)	G41M (+)	G41G (+)	G41P (+)
G42A (+)	G42M (+)	G42G (+)	G42P (+)
G43A (+)	G43M (+)	G43G (+)	G43P (+)
G44A (+)	G44M (+)	G44G (+)	G44P (+)
G4sA (+)	G4sM (+)	G4sG (+)	G4sP (+)

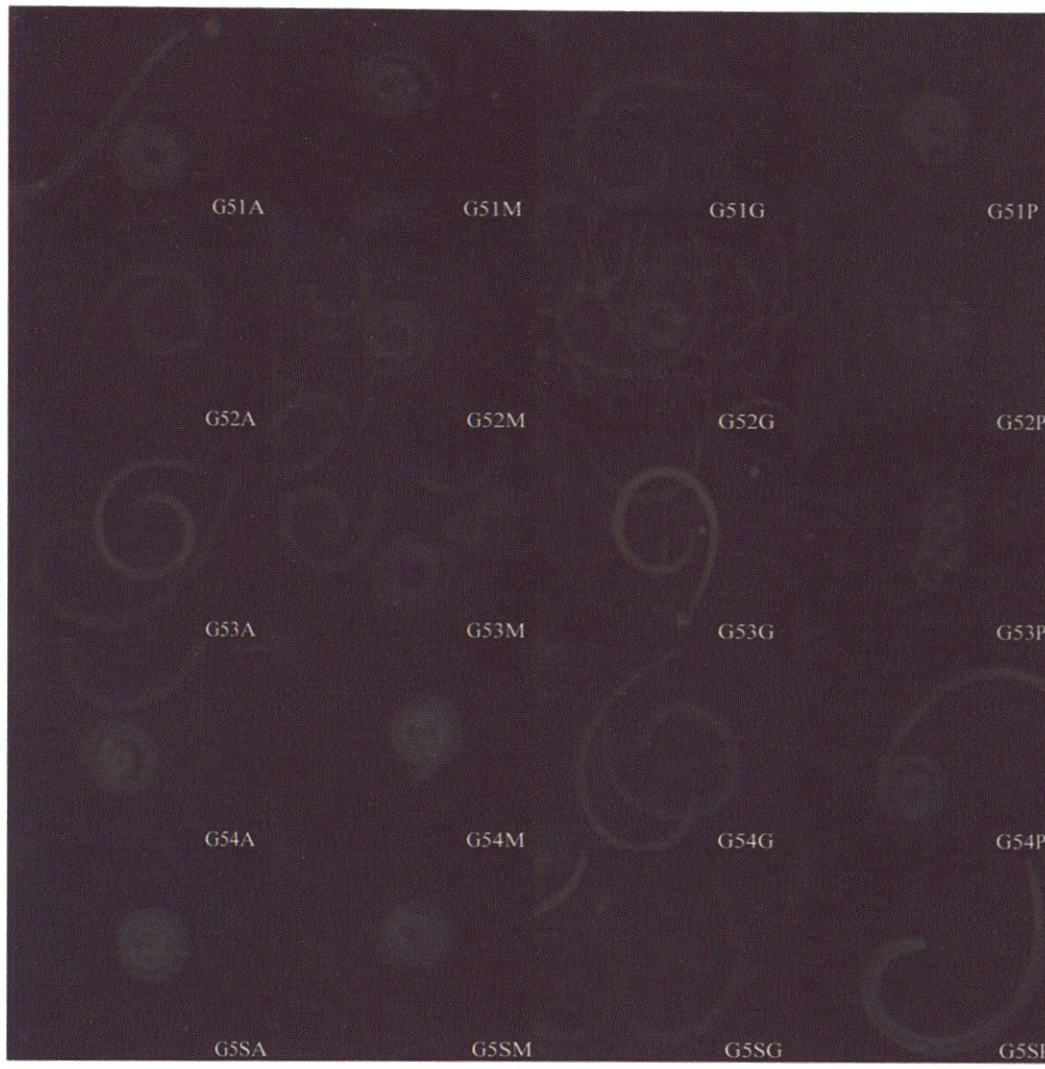


Fig. 24. Inmunofluorescencia en sueros de grupo 5 (inmunizado vía sublingual y retados) G5 (Grupo 5), 1 (primera inmunización), 2 (segunda inmunización), 3 (tercera inmunización), 4 (cuarta inmunización), S (sacrificio), A (IgA), M (IgM), G (IgG), P (Policlonal: IgA, IgM, IgG).

Tabla 22.

Resultados de inmunofluorescencias del grupo 5 (inmunizado vía sublingual y retados), Fig. 24 negativo (-), positivo (+).

G51A (--)	G51M (--)	G51G (--)	G51P (+)
G52A (--)	G52M (--)	G52G (--)	G52P (+)
G53A (+)	G53M (--)	G53G (+)	G53P (+)
G54A (+)	G54M (+)	G54G (+)	G54P (+)
G5SA (+)	G5SM (+)	G5SG (+)	G5SP (+)

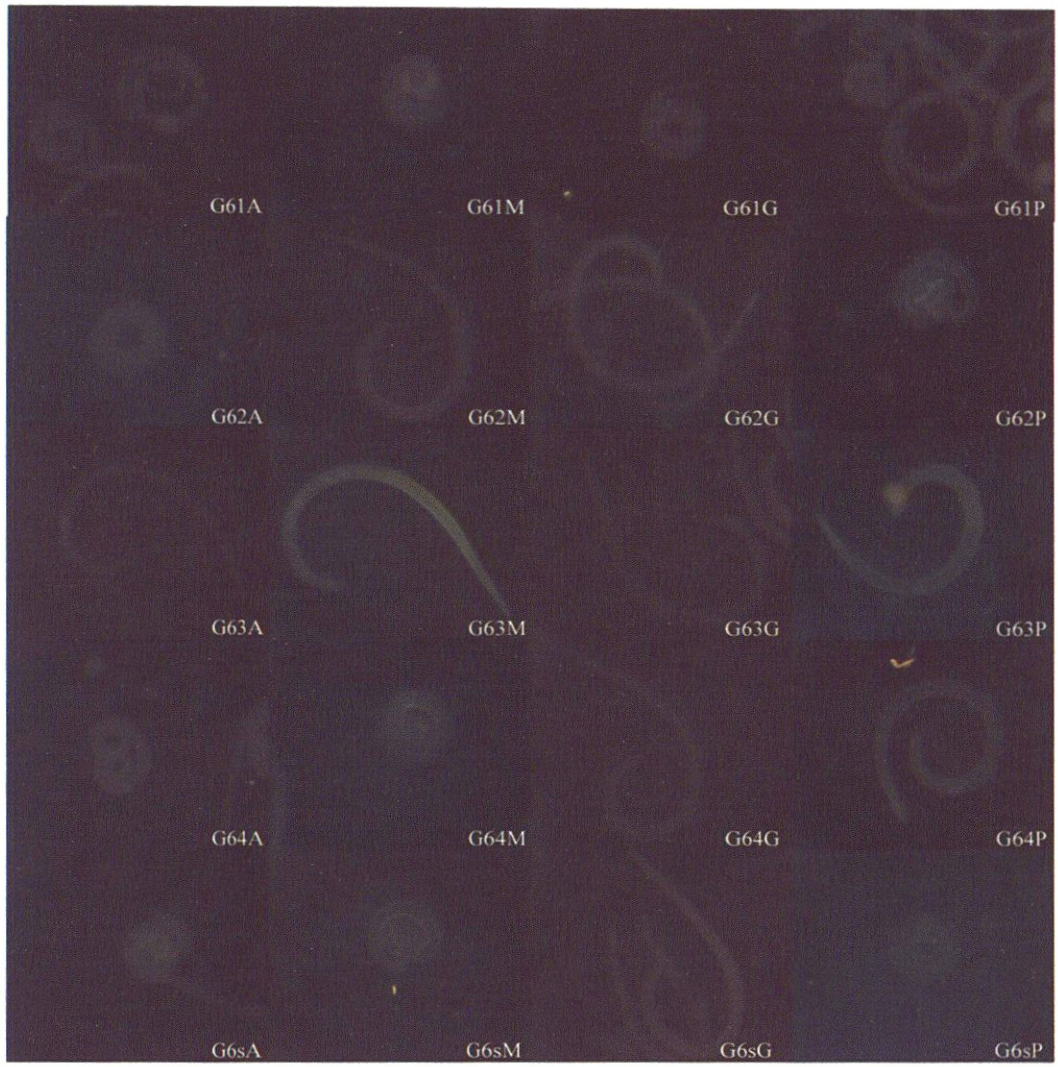


Fig. 25 Inmunofluorescencia en sueros de grupo 6 (infectados e inmunizado vía sublingual) G6 (Grupo 6), 1 (primera inmunización), 2 (segunda inmunización), 3 (tercera inmunización), 4 (cuarta inmunización), s (sacrificio), A (IgA), M (IgM), G (IgG), P (Policlonal: IgA, IgM, IgG).

Tabla 23.

Resultados de inmunofluorescencias del grupo 6 (infectados e inmunizado vía sublingual), Fig. 25 negativo (-), positivo (+).

G61A (--)	G61M (+)	G61G (+)	G61P (+)
G62A (+)	G62M (+)	G62G (+)	G62P (+)
G63A (+)	G63M (+)	G63G (+)	G63P (+)
G64A (+)	G64M (+)	G64G (+)	G64P (+)
G6sA (+)	G6sM (+)	G6sG (+)	G6sP (+)

Objetivo 4. Comparación de las modificaciones morfológicas y la viabilidad de la célula nodriza en murinos tratados con el inmunógeno de 45kDa por medio de Compresión de Tejido y Hematoxilina-Eosina.

La compresión de tejido realizada en músculos (Diafragma, masetero, lengua, intercostal y pierna) de los diferentes grupos experimentales dio como resultado en el control sano (Fig. 26) ausencia de LI de *T. spitalis*, en el control infectado (Fig. 27) LI con su morfología característica, bien enrolladas, con una cutícula de colágeno bien formada, y al ser teñida con azul de tripano (Fig. 27 B) se aprecian las LI sin teñir.

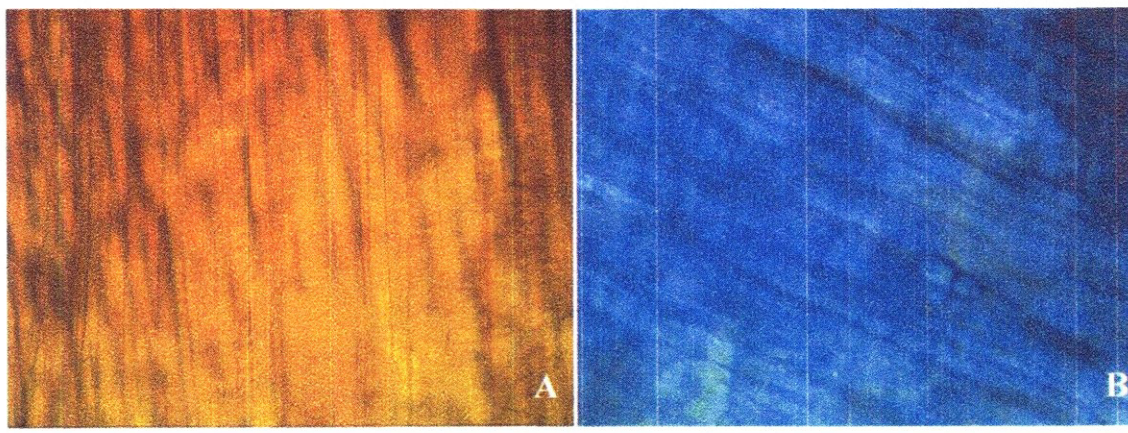


Fig. 26. Corte histológico analizado por compresión de tejido de grupo 1 (control sano)
A) Sin teñir B) Tenido con azul de tripano.

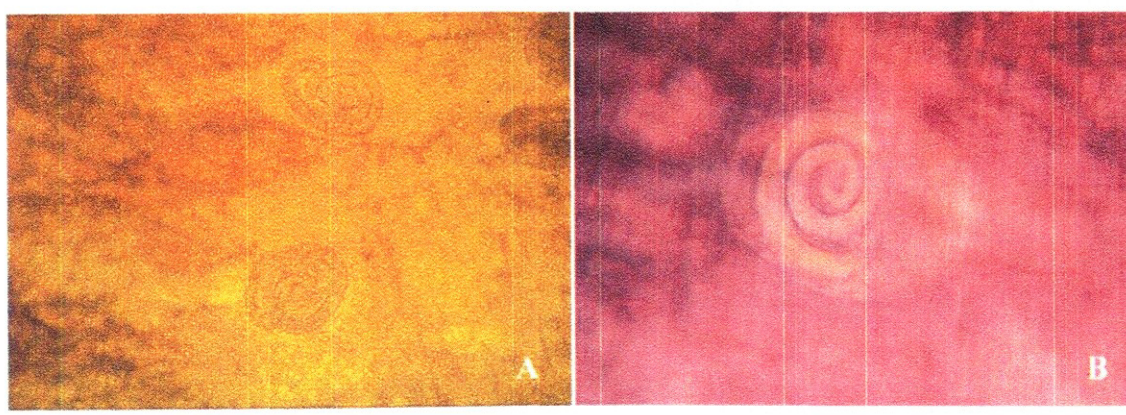


Fig. 27. Corte histológico analizado por compresión de tejido de grupo 2 (control infectado)
A) Diafragma, B) corte de diafragma infectado y teñido con azul tripano para evaluar viabilidad, tomado 10x amplificado zoom .

En los grupos experimentales se aprecio una disminución en la concentración de LI por campo, en el grupo 5 (inmunizado vía sublingual) se aprecia oscurecimiento del contenido interno de la célula nodriza (Fig. 28) sin embargo no se pudo apreciar entrada de colorante en ninguna de las muestras de los diferentes grupos experimentales, por lo cual podemos asumir que las LI siguen presentándose viables.

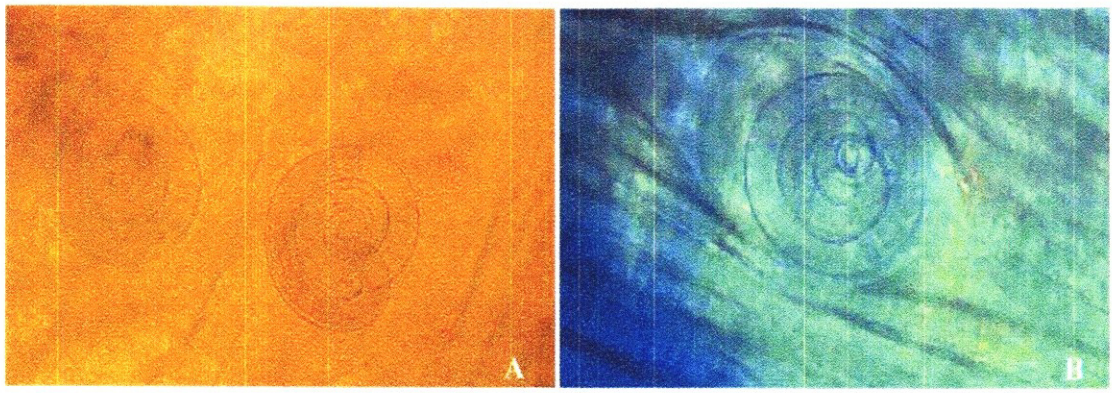


Fig. 28. Corte histológico analizado por compresión de tejido de grupo 3 (Inmunizado convencional e infectado) de diafragma A) corte 40x, B)corte 40x teñido con azul tripano.

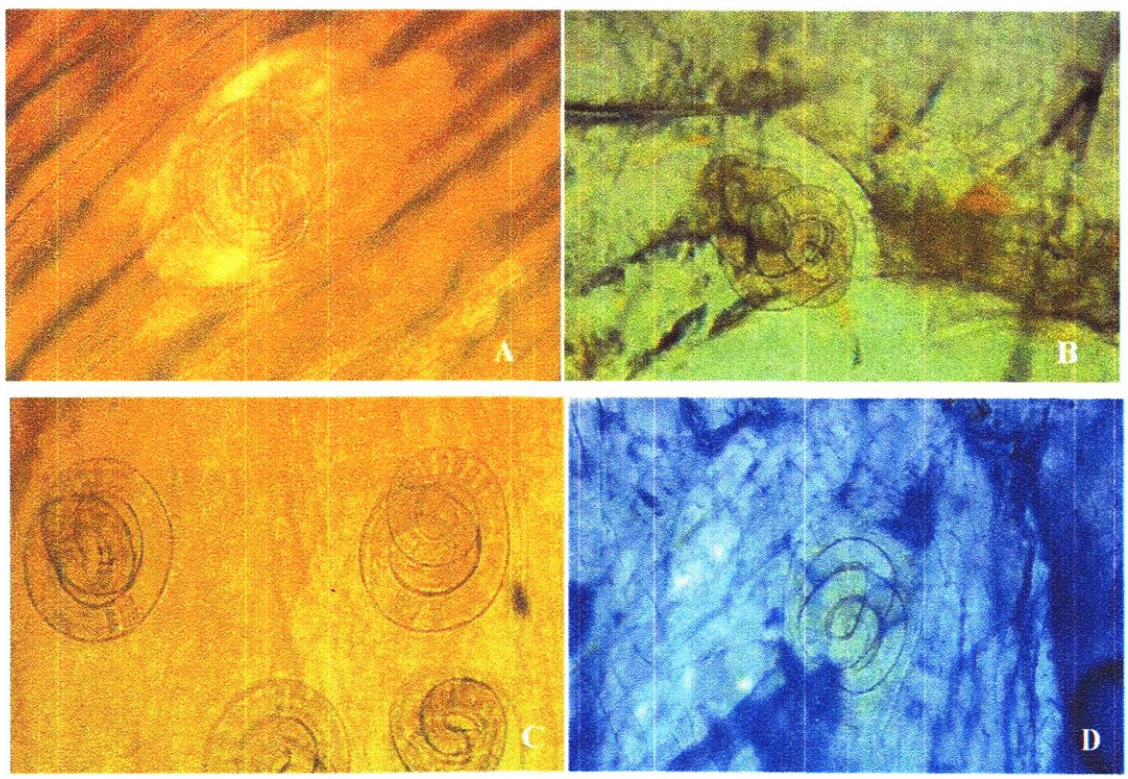


Fig. 29. Corte histológico analizado por compresión de tejido de grupo 4 (infectados e inmunizados vía convencional) de Masetero A)sin teñir 40x, B) A 40x teñido con azul de tripano para evaluar viabilidad.

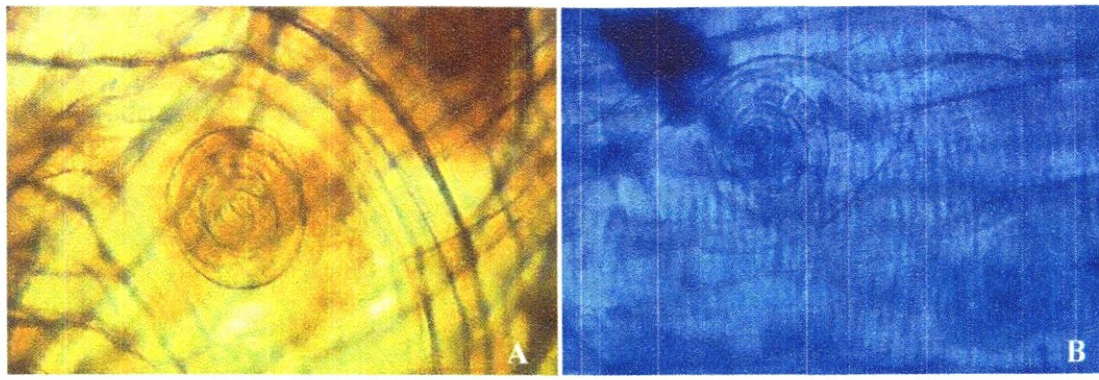


Fig. 30. Corte histológico analizado por compresión de tejido de grupo 5 (Inmunizados vía sublingual e infectados) de Pierna A) sin teñir, B) teñidos con azul de tripano.

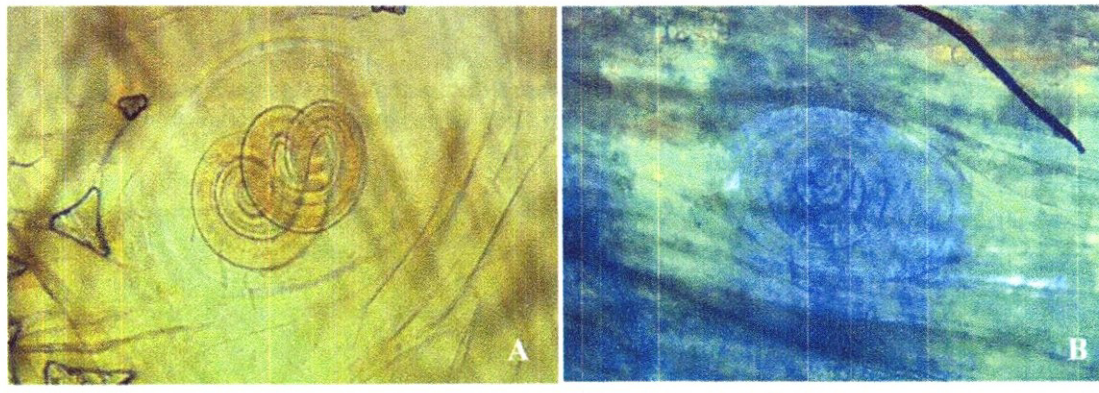


Fig. 31. Corte histológico analizado por compresión de tejido de grupo 6 (Infectados e Inmunizados vía sublingual) de Diafragma. A) Sin teñir, B) teñidos con azul de tripano.

El diagnóstico histológico realizado por medio de la técnica de tinción con hematoxilina-eosina nos permitió analizar las diferentes muestras de tejido muscular, observándose en el control sano (Fig. 32) se ven las fibras musculares bien definidas y formadas.

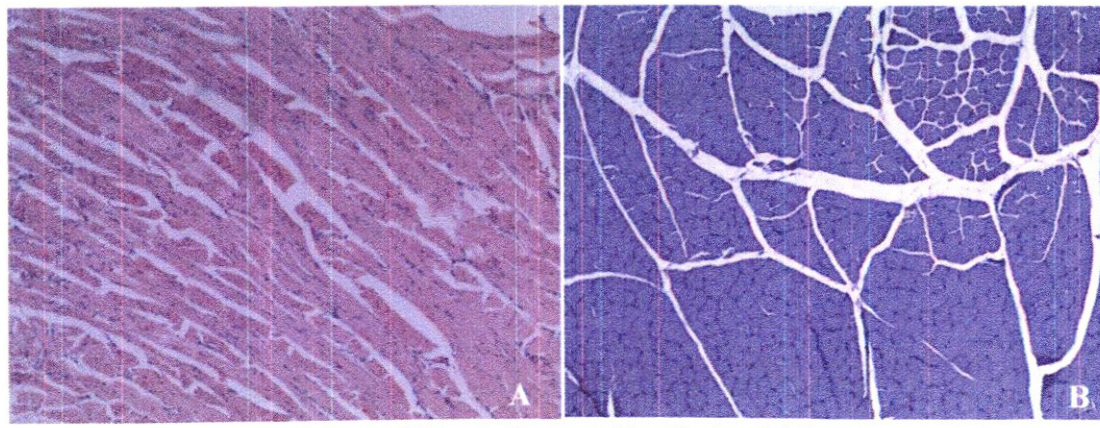


Fig. 32. Cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina del Grupo 1, control sano A) corte histológico de lengua, microscopio óptico, 10x; B) corte histológico de masetero, microscopio óptico, 10x.

En el control infectado (Fig. 33) podemos observar una buena implantación de la célula nodriza con el rearreglo de las fibras musculares.

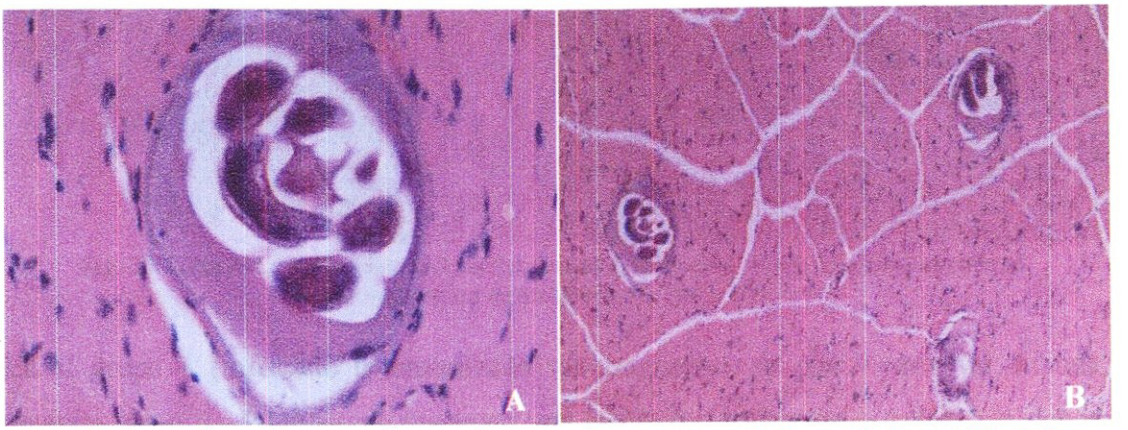


Fig. 33. Cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina del Grupo 2, control infectado
corte histológico de masetero con LI de *T. spiralis*, microscopio óptico: A) 40x; B) 10x.

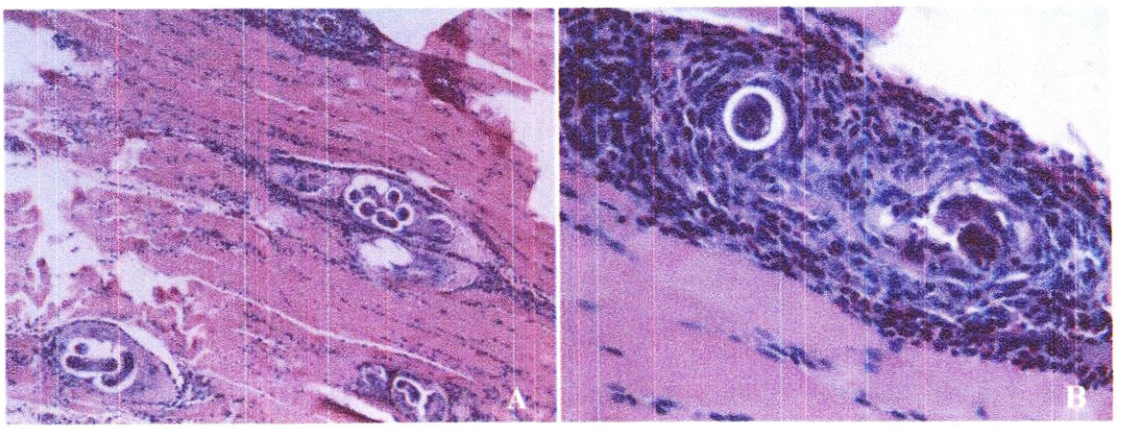


Fig. 34. Grupo 3, cortes histológicos de grupo 3, inmunización parenteral e infección
corte histológico de masetero: A) 10x y B) 40x.

En el corte histológico teñido con Hematoxilina-Eosina del grupo 3 (inmunizado vía parenteral e infectado) se puede observar un 25% hialinizados, con una respuesta inflamatoria crónica periquística con linfocitos, eosinofilos y piocitos en la muestra (Fig. 34).

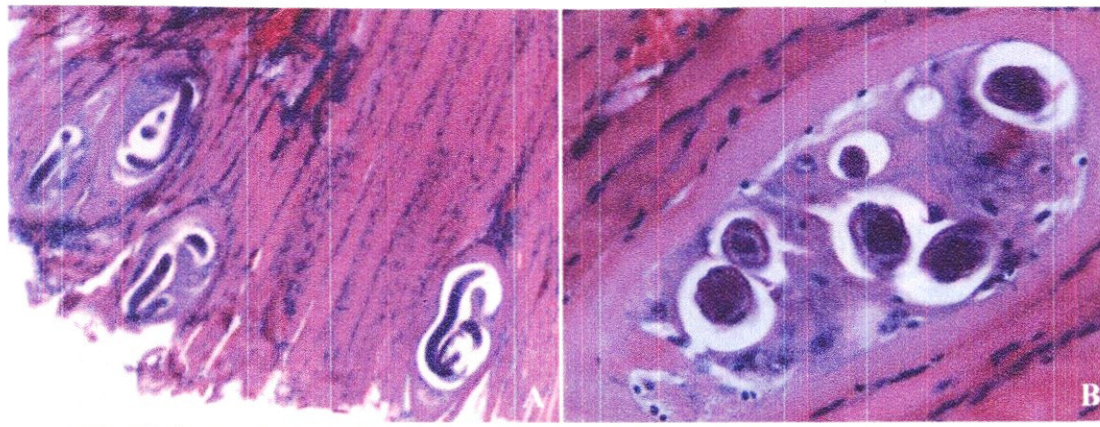


Fig. 35. Grupo 4, cortes histológicos del grupo 4, infección-inmunización parenteral
corte histológico de masetero, A) 10x y B) 40x.

En el grupo 4 (infectado e inmunizado vía parenteral) se puede observar en una muestra obtenida del musculo masetero una respuesta inflamatoria crónica, algunos quistes hialinizados y con cápsula engrosada.

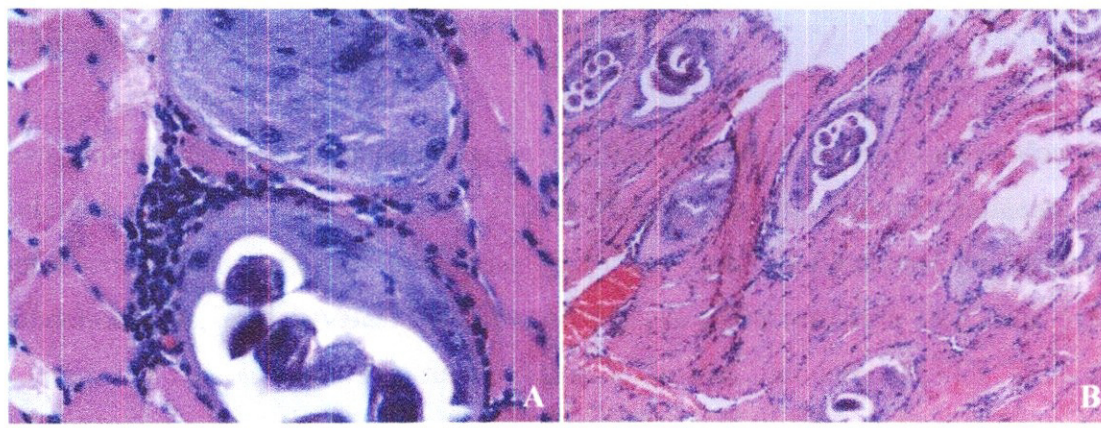


Fig. 36. Grupo 5, corte histológico teñido con Hematoxilina-Eosina
A) Masetero QTS 1 por campo, 40x; B) Diafragma, larva muscular, cápsula engrosada, 10x.

La figura 36 nos muestra dos cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina del grupo 5 (inmunización sublingual e infección), en el corte de masetero se observa una LI en la célula nodriza con el 50% hialinizado y con una reacción inflamatoria moderada (A) mientras que en el corte de diafragma se ve un 25% hialinizado (B). En el grupo 6 (infectado e inmunizado vía sublingual) se puede observar en la Fig en collar linfocitico acentuado y un 60% esclerosados.

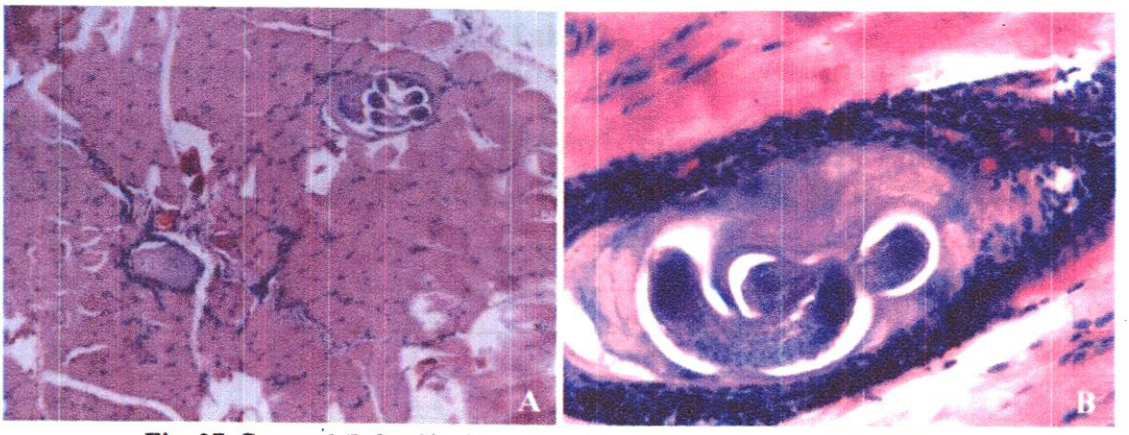


Fig. 37. Grupo 6 (Infección-inmunización sublingual), corte histológico
Corte de masetero con larva muscular con collar linfocítico acentuado, 60% esclerosados A) 10x y B) 40x.

Objetivo 5. Evaluar el mecanismo inmunológico de hipersensibilidad retardada por la aplicación del inmunógeno de 45kDa de *T. spiralis* por medio de la Triple respuesta de Lewis.

Este proceso de hipersensibilidad tardía mediada por linfocitos T y sus productos solubles, que ocurre de las 24 a las 72hrs posteriores a la aplicación del antígeno, la inflamación generada se caracteriza por una gran infiltración de células mononucleares, en la evaluación por medio de la triple respuesta de Lewis que consiste en el análisis de: rubor, calor y edema, ninguno de los grupos experimentales presento rubor en la zona de aplicación del inmunógeno, mientras que en el edema la reacción más fuerte se dio a las 24 horas.

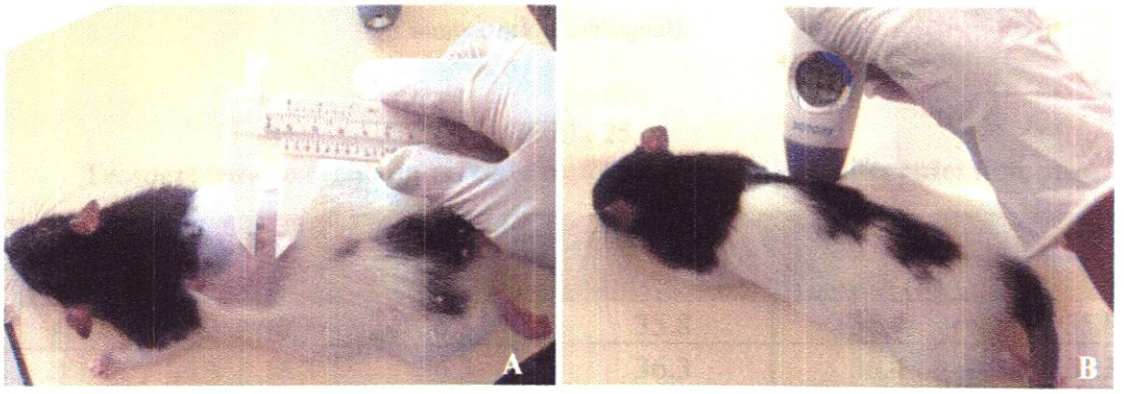


Fig. 38 Evaluación de la triple respuesta le Lewis
A) medición de la induración, B) medición de la temperatura

Tabla 24.
Edema presentado en cada uno de los murinos a diferentes tiempos

Edema (ml)						
Horas	**CI**	**CS**	**InmC-Inf**	**Inf-InmC**	**InmS-Inf**	**Inf-InmS**
0 h	1.6	1.8	2.3	1.4	2.8	1.7
2 h	2.6	0.6	3.1	2.5	3.5	2.8
6 h	5.8	0	6.2	4.7	5.4	3.9
24 h	8	0	7.5	6.9	7.6	7
48 h	5.8	0	5.2	3.5	5.4	2.7
72 h	0	0	4	1	3.8	1

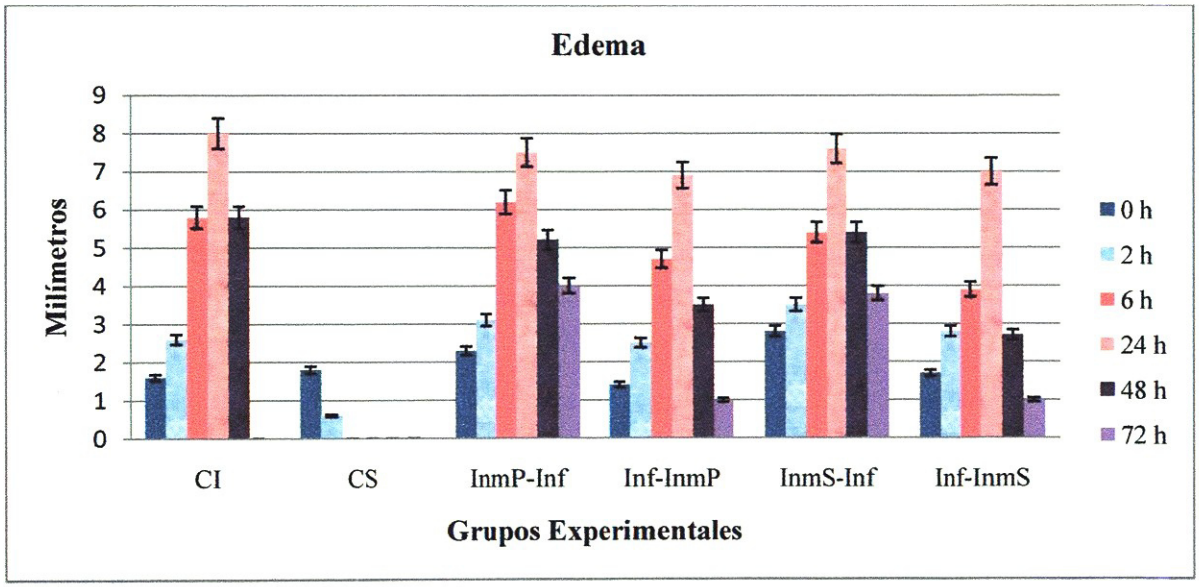


Fig. 39. Gráfica del edema presentado en cada uno de los murinos

(CI-control infectado, CS-control sano, InmP-Inf- Inmunización parenteral y reto, InmS-Inf- Inmunización sublingual y reto, Inf-InmP-Infección e inmunización parenteral, Inf-InmS- Infección e inmunización sublingual).

Tabla 25.
Temperatura presentada en cada uno de los murinos a diferentes tiempos

Temperatura (°C)						
Horas	**CI**	**CS**	**InmT-Inf**	**Inf-InmT**	**InmS-Inf**	**Inf-InmS**
0 h	36.3	36.3	36.3	35.8	36.4	35.8
2 h	36.3	36.3	36.3	36.3	36.4	36.3
6 h	36.9	36.3	36.3	36.3	36.4	36.3
24 h	36.5	36.3	36.6	36.4	36.4	36.5
48 h	36.7	36.2	36.4	36.2	36.4	36.6
72 h	36.8	36.2	36.4	36.3	36.4	36.4

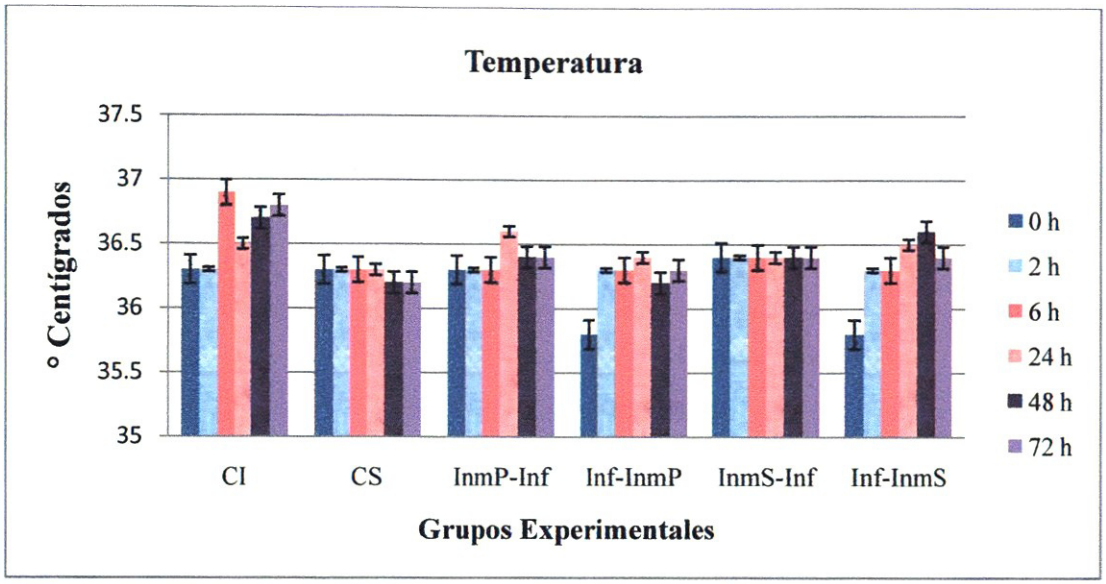


Fig. 40. Gráfica de la temperatura presentada en cada uno de los murinos

(CI-control infectado, CS-control sano, InmP-Inf- Inmunización parenteral y reto, InmS-Inf- Inmunización sublingual y reto, Inf-InmP-Infección e inmunización parenteral, Inf-InmS- Infección e inmunización sublingual).

Objetivo 6. Cuantificar la carga parasitaria y viabilidad de larvas infectantes de *T. spiralis* en control infectado por *T. spiralis* e inmunizados por vía sublingual y vía parenteral con el antígeno de 45 kDa, por digestión artificial y tinción de azul tripano.

Por medio de la técnica de digestión artificial se obtuvo un promedio de 3000 larvas en el grupo control infectado, 0 larvas en control sano, 2000 en el grupo inmunizado vía parenteral e infectado, 1500 en el grupo inmunizado vía sublingual e infectado, 2300 larvas en el grupo infectado e inmunizado vía parenteral, 1800 larvas en el grupo infectado e inmunizado vía sublingual.

El tratamiento con la mayor disminución de carga parasitaria es el inmunizado vía sublingual e infectado con 500 LI dando como resultado una cantidad de 1500 larvas infectantes.

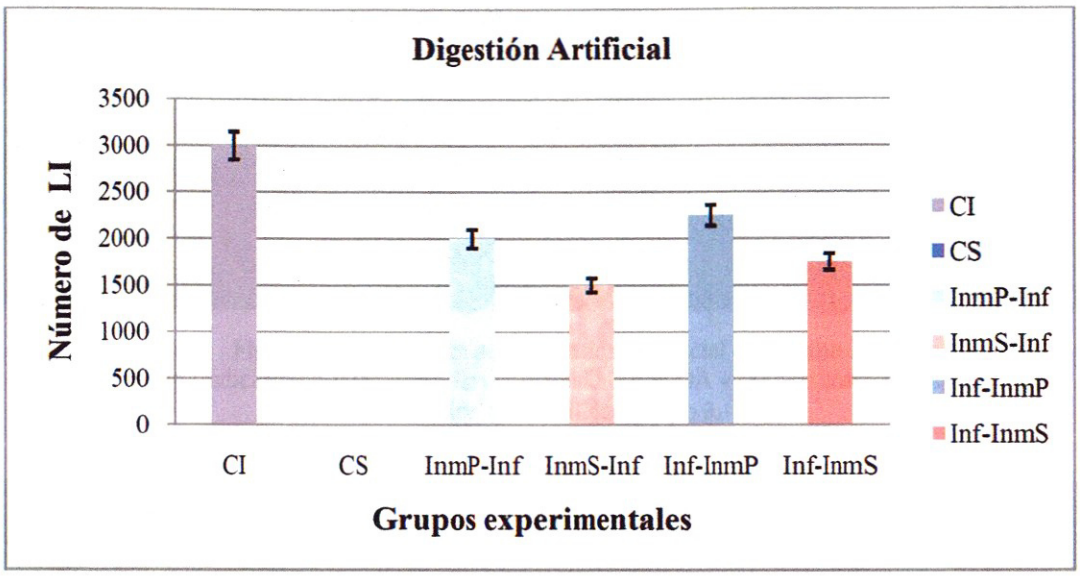


Fig. 41. Gráfica del número de LI por medio de digestión artificial

(CI-control infectado, CS-control sano, InmP-Inf- Inmunización parenteral y reto, InmS-Inf- Inmunización sublingual y reto, Inf-InmP-Infección e inmunización parenteral, Inf-InmS- Infección e inmunización sublingual).

Las LI obtenidas por medio de digestión artificial de cada uno de los grupos experimentales, se observaron, contabilizaron y tiñeron con colorante azul tripano, en el control sano no se observo ningún parásito adulto, en el control infectado presentan su forma característica de espiral (Fig. 42) y se ve una gran cantidad de larvas en la muestra tomada para el análisis (Fig. 42 A). Las LI control infectado teñidas con azul tripano para analizar la viabilidad de la larva muestran que no hay penetración del colorante por lo cual se concluye que estas LI están viables (Fig. 42 C).

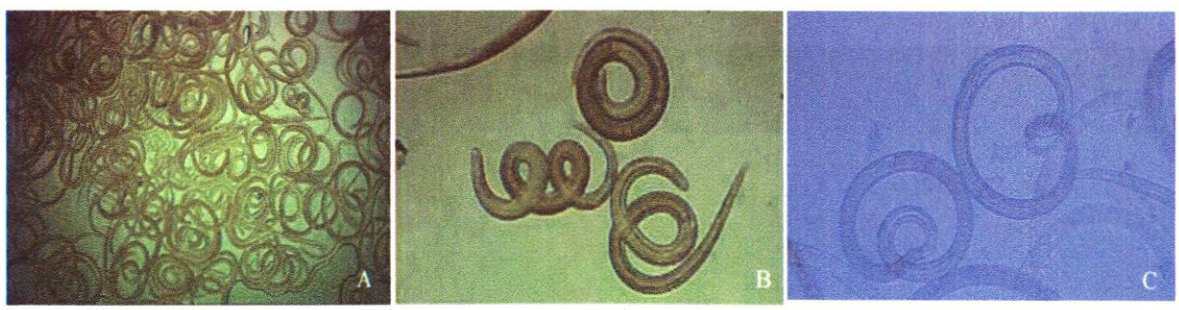


Fig. 42. Larvas obtenidas por digestión artificial (DA) del grupo 2 (control infectado)

Larvas obtenidas por DA y teñidas con azul tripano para evaluación de viabilidad del grupo 2.



Fig. 43. LI obtenidas por digestión artificial del grupo 3
(Inmunizado tradicional e infectado), larvas obtenidas por DA y teñidas con azul tripano para evaluación de viabilidad grupo 3.

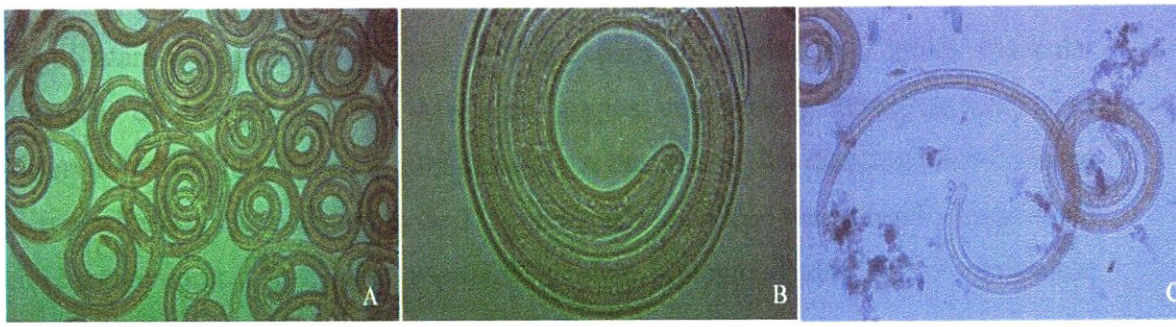


Fig. 44. LI obtenidas por digestión artificial del grupo 4
(Infectado e inmunizado vía tradicional), LI del grupo 4 obtenidas por DA y teñidas con azul tripano para evaluar viabilidad.

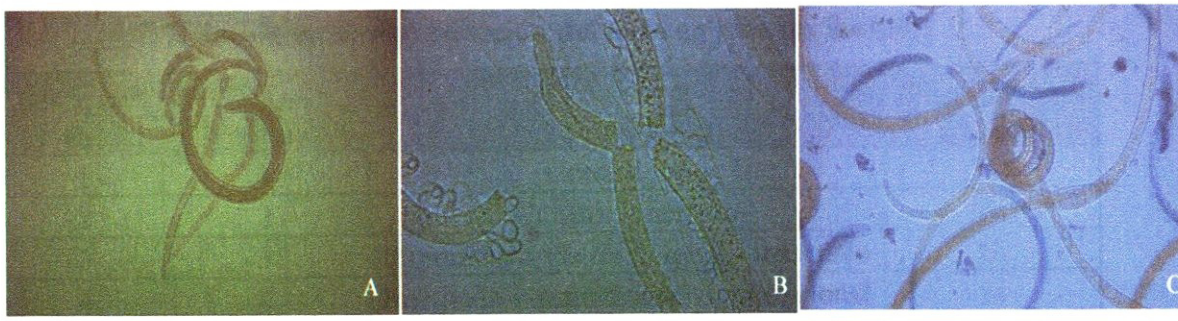


Fig.45. LI obtenidas por digestión artificial del grupo 5
(Inmunizados vía sublingual e infectados), LI del grupo 5 obtenidas por DA y teñidas con azul tripano para evaluar viabilidad.

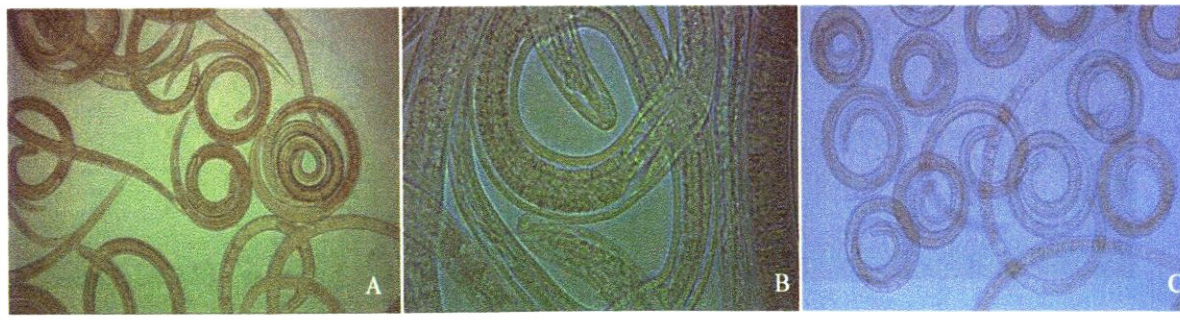


Fig. 46. LI obtenidas por digestión artificial grupo 6
(Infectados e inmunizados vía sublingual), LI obtenidas por DA del grupo 6 y teñidas con azul tripano para evaluar viabilidad.

Dentro de los grupos experimentales, las LI obtenidas por digestión artificial muestran una disminución del número de LI, pero solo en el grupo 5 (inmunizado vía sublingual e infectado) muestra algunas LI fraccionadas y desenrolladas (Fig. 45), que al ser teñidas con azul tripano (Fig. 45 C), este penetra en la larva coloreándola, por lo cual se resume que estas larvas no son viables.

Objetivo 7. Verificación de la reproducción del ciclo biológico de los diferentes grupos en ratones BALB/c.

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c para infectarlos con tejido muscular obtenido de los murinos de diferentes grupos controles y experimentales para observar por medio de compresión de tejido si después de los diferentes tratamientos se reproducía el ciclo biológico de *T. spiralis*, obteniéndose como resultado que solo en el grupo control sano no se reprodujo el ciclo biológico (tabla 26), observándose mayor cantidad en el grupo control infectado.

Tabla 26.

Relación de la reproducción del ciclo en ratones BALB/c

Número de Ratón	Grupo experimental	Tratamiento	Reproducción de ciclo
1	1	Control sano	No
2	2	Control infectado	Si
3	3	Inmunizado vía tradicional - infectado	Si
4	4	Infectado - inmunizado vía tradicional	Si
5	5	Inmunizado vía sublingual - infectado	Si
6	6	Infectado - inmunizado vía sublingual	Si

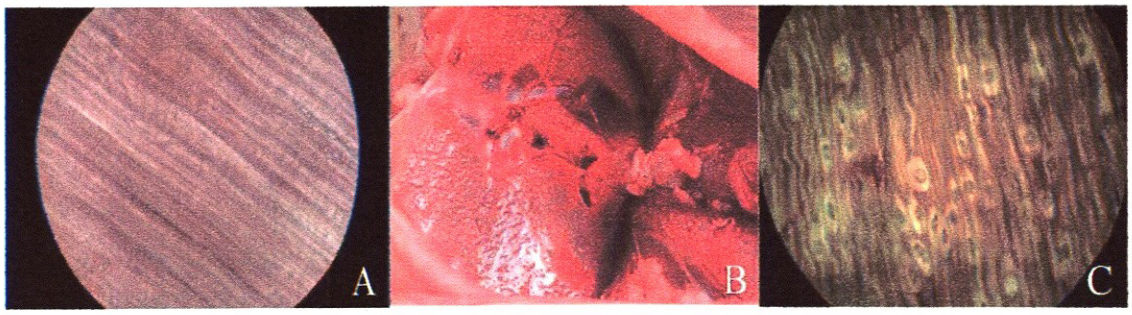


Fig. 47. Compresión de tejido en muestras obtenidas de ratón BALB/c para reproducción del ciclo biológico de *T. spiralis*

A) control sano, microscopio óptico, 4x; B) muestra de diafragma de ratón del grupo control infectado; C) control infectado, microscopio óptico, 4x.

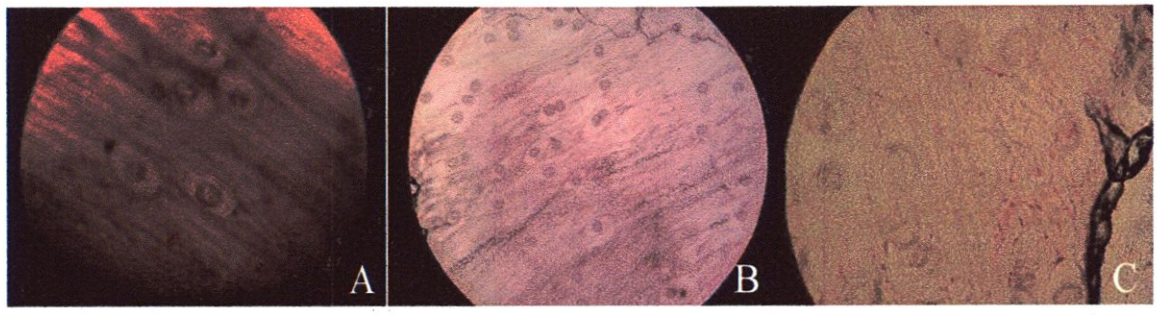


Fig. 48. Compresión de tejido en muestras obtenidas de ratón BALB/c para reproducción del ciclo biológico de *T. spiralis*

A) inmunizado vía sublingual e infectado, microscopio óptico, 10x; B) infectado e inmunizado vía sublingual, microscopio óptico, 4x; C) inmunizado vía tradicional e infectado, microscopio óptico, 10x.

8.1 Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de varianza de los datos obtenidos con el programa Stargraphics Centurion. En el ANOVA simple teniendo como variable dependiente LI y como factor, los grupos de tratamiento se realizaron 180 observaciones.

Tabla 27.

ANOVA para larvas por grupo

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*GI*	*Cuadrado medio*	*Razón de F*	*Valor de P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Rata	620000.	4	155000.	4.69	**0.0013**
B:Tratamiento	1.516E8	5	3.032E7	917.15	**0.0000**
TOTAL (CORREGIDA)	1.5784E8	179			

En la tabla 27, se puede observar que al analizar la recuperación de LI que se realizó en cada grupo de tratamiento, presenta un $P < 0.05$ mostrando que es estadísticamente significativo, con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 28.

Tabla de cuadrados medios de número de LI con intervalos de confianza del 95%

Nivel	*Numeración*	*Media*	*Error Estándar*	*Limite Inferior*	*Limite Superior*
Total	180	1766.67			
Rata					
1	36	1783.33	30.3035	1723.51	1843.15
2	36	1766.67	30.3035	1706.85	1826.49
3	36	1700.0	30.3035	1640.18	1759.82
4	36	1716.67	30.3035	1656.85	1776.49
5	36	1866.67	30.3035	1806.85	1926.49
Tratamiento					
1	30	0.0	33.1958	-65.5292	65.5292
2	30	3000.0	33.1958	2934.47	3065.53
3	30	2000.0	33.1958	1934.47	2065.53
4	30	2300.0	33.1958	2234.47	2365.53
5	30	1500.0	33.1958	1434.47	1565.53
6	30	1800.0	33.1958	1734.47	1865.53

La tabla 28, muestra el número de LI medias para cada nivel de los factores, también muestra el error estándar de cada media, que es una medida de su variabilidad de muestreo. Las dos columnas a la derecha muestran un 95% de intervalo de confianza para cada uno de los medios.

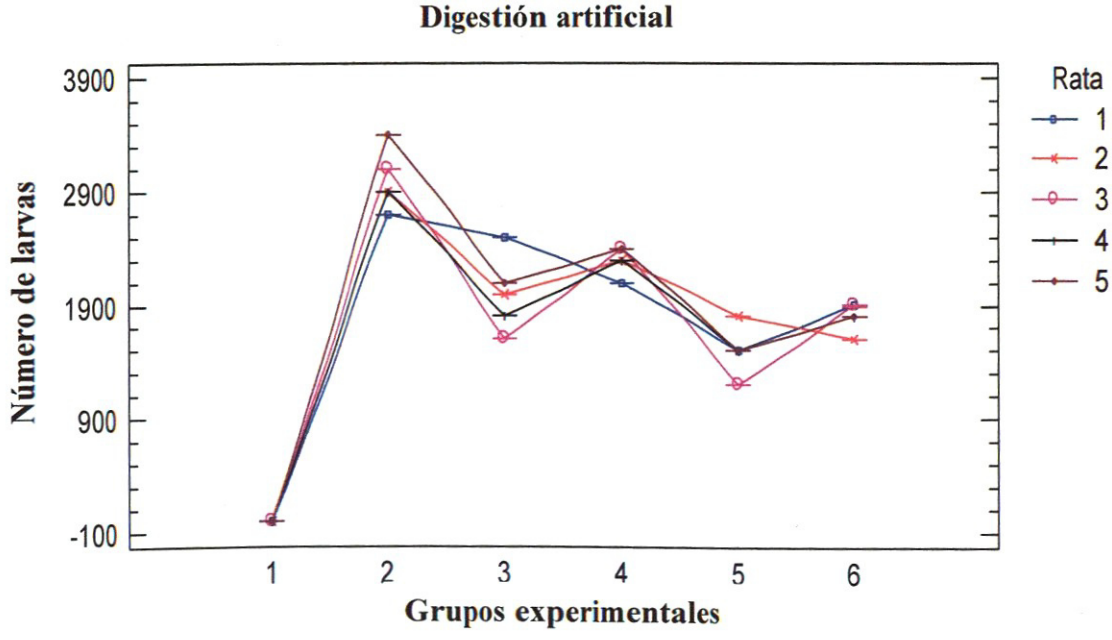


Fig. 49. Gráfica de interacción del porcentaje del número de larvas con los diferentes tratamientos por medio de Tukey.

Además se realizó un análisis multifactorial varianza para la respuesta de hipersensibilidad retardada, por medio de intradermorreacción, donde se construyeron varias pruebas y gráficos para determinar qué factores tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre el edema. También puso a prueba las interacciones significativas entre los factores. Las pruebas F de la tabla ANOVA le permitió identificar los factores significativos.

Tabla 29.

ANOVA para la respuesta de hipersensibilidad retardada

Fuente	*Suma de cuadrados*	GI	*Cuadrado medio*	*Razón de F*	*Valor de P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	155.327	12	12.9439	3.93	**0.0000**
B:Tratamiento	284.161	5	56.8322	17.24	**0.0000**
RESIDUAL	534.065	162	3.2967		
TOTAL (CORREGIDA)	1081.95	179			

En la tabla 29, se puede observar que al analizar la relación del edema con la temperatura y el tratamiento, presenta un $P < 0.05$ mostrando que es estadísticamente significativo, con un nivel de confianza del 95%.

9. DISCUSIÓN

La Trichinellosis como enfermedad parasitaria zoonotica, no solo afecta la salud pública, si no también representa un problema económico en la producción porcina y la seguridad alimentaria (Cui *et al.,* 2014; Gao *et al.,* 2014; Lia *et al.,* 2014; Wang *et al.,* 2014) se encuentra clasificada por la OMS como una de las enfermedades parasitarias trasmitidas por alimentos con mayor impacto mundial (FAO/WHO, 2014), la población mexicana consume anualmente 22 millones de cerdos, la carne que se produce en México atraviesa por varios procesos de Tipo Inspección Federal (TIF) que aseguran una mayor calidad (Díaz *et al.,* 2007) pero ninguno de estos procesos son para el diagnóstico de *T. spiralis* y debido a que la pobreza en México se estima que un 53% de la población mantiene en un nivel de consumo por debajo de las necesidades mínimas de alimentos básicos, existen programas de apoyo que pretenden la utilización de cerdos de traspatio como estrategia para aliviar la pobreza (Rivera *et al.,* 2007), por lo cual su control se basa principalmente en la inspección de los animales en matadero, así como en la cocción adecuada de la carne antes del consumo (Bruschi-Dupouy-Camet, 2014).

Debido a la importancia zoonótica, los principales esfuerzos en muchos países se ha centrado en el control y eliminación del parásito de la cadena alimentaria (Gajadhar *et al.,* 2009; Molina *et al.,* 2012), Pérez *et al.,* 2010 mencionan que los tratamientos de elección para la trichinellosis, dependen de la presencia: clínica, muscular, neurológica o cardiaca y consiste en el uso de albendazol o mebendazol a los que se asocian corticosteroides, pero debido a la toxicidad que implica el uso de fármacos y la cada vez más presente resistencia a los mismos, se ha buscado la implementación de una vacuna para el control y eliminación de la parasitosis. El problema principal en el desarrollo de vacunas en parásitos helmintos está representado por la complejidad de estos organismos, en la última década se han desarrollado vacunas a base de extractos de LI crudos, productos de excreción-secreción (ES), ADN, o proteínas recombinantes, induciendo inmunidad protectora parcial (Gu *et al.,* 2013), sin embargo se sigue buscando la producción de una vacuna con un enfoque rentable más seguro, la función inmunomoduladora de la proteína de 45 kDa durante la infección por *T. spiralis* nos ha llevado a explorar su potencial como una posible vacuna para el control de la parasitosis, además de que es una de las proteínas

inmunodominantes presentes en el triplete característico de *T. spiralis* y que se ha encontrado en varias especies animales y puede ser identificada en diferentes estadios del parásito.

Las vacunas a base de extractos de LI crudo, productos de excreción-secreción, ADN o proteínas recombinantes se han reportado en modelos animales. Durante la última década, varias proteínas secretadas por *T. spiralis* o involucrados en el establecimiento de parasitismo han sido desarrolladas como componentes de las vacunas recombinantes, y se ha logrado una protección parcial contra el desafío de LI de *Trichinella,* sin embargo, debido a que los antígenos del parásito cambian durante su desarrollo en el hospedero y las múltiples moléculas implicadas en el establecimiento de parasitismo, es difícil obtener altos niveles de protección o inmunidad con un único antígeno (Wei *et al.,* 2011).

La inmunoterapia para combatir la Trichinellosis se ha utilizado a través del tiempo con gran éxito. En el 2000, Reveles *et al;* utilizó antígeno soluble total para modificar el implante de LI enquistadas de *T. spiralis* en músculo estriado de cerdo, obteniendo como resultado que los animales que recibieron inmunoterapia subieron de peso 10 kg como promedio, su pelo se hizo brillante y menos erizo, en la compresión inicial, al observarla al microscopio de luz, se encontraron LI de *T. spiralis* calcificadas. Posterior a la inmunoterapia, hubo un aumento de vascularización, aumento de acúmulos de grasa, aumento de polimorfonucleares y disminución del número de LI calcificadas, lo cual llevo a utilizar otro modelo experimental, Moreno en el 2000 llevó a cabo un estudió donde se utilizaron Ag de *T. spiralis* en rata, lo que permitió una reducción en la carga parasitaria y daño a la célula nodriza y la LI, concordando con Laredo *et al.,* 2012 quien inmunizo ratas long Evans con AST de *T. spiralis* y sacrificadas a diferentes tiempos, se ha encontrado una disminución en la carga parasitaria, mostrando un efecto protector al trascurrir los cuatro meses, observándose la perdida de espiral y modificación del quiste del parasito, debido a los resultados obtenidos en estos dos modelos y detectándose tanto en los grupos experimentales como en los controles infectados, un triplete característico de *T. spiralis,* Maldonado en el 2007, utilizó Ag de *T. spiralis* de 45 kDa en rata, con lo que pudo obtener una disminución en la carga parasitaria, inhibición en la implantación del parásito, y daño a la célula nodriza, lo cual nos

llevo a probar el antígeno inmunoprotector por dos diferentes vías: la parenteral y la sublingual, encontrando una disminución del 50% en la sublingual con respecto al control infectado, Bautista en el 2004, realizó un experimento donde se aplicó Ag de *T. spiralis* con *Lactobacillus casei* en ratón BALB/c, para lograr la protección contra la infección y la disminución de carga parasitaria. Dea en el 2006, logró la disminución de la carga parasitaria por medio de la utilización de Ag TSL1 en copolímeros de ratón y Gamble, 1985, utilizó Ag purificados con Ac monoclonales de ratón, con lo que pudo observar una disminución en la cantidad de parásitos intestinales, menos fecundación de la hembra adulta y menos carga parasitaria, Chávez, 2013 comparo el AST de *T. spiralis* con el inmunógeno de 45kDa observando una mejor respuesta inmunólogica con el inmunógeno, por lo cual en el presentes estudio se opto por utilizarlo por diferentes vías de inmunización para evaluar la diminución de carga, así como la presencia de IgA, IgM e IgG anti-*T. spiralis* a diferentes tiempos de inmunización.

En 2011, Wei *et al.,* presenta un antígeno protector que induce inmunidad parcial contra la infección por *T. spiralis* en ratones, la paramiosina (Ts-PMY) que es un importante componente estructural que ensambla las proteínas de miosina y el núcleo para formar los filamentos gruesos macromoleculares, se expresa constitutivamente en varias etapas del desarrollo de los parásitos helmintos. Ratones BALB/c vacunados con esta proteína desarrollaron una respuesta inmunitaria Th2 y fueron parcialmente protegidos con el desafío de LI de *T. spiralis,* mientras tanto en 2014 Cui *et al.,* (b) caracterizaron 12 Ac monoclonales (3A11, 7D9, 7F6, 5A7, 6H7, 39F3, 38H2, 37E7, 35B9, 29A11, 39C9 y 39A6), de los cuales 10 reconocieron por medio de Western blot bandas entre 19.3-119.8kDa (principalmente 28.7-68.4kDa), con la generación y caracterización de estos anticuerpos monoclonales proporcionan bases para el desarrollo de técnicas de diagnóstico serológico especificas para trichinellosis, Yang *et al.,* 2014 purificaron y evaluaron una proteína recombinante TsDAF-21 como potencial antígeno por western blot el cual fue reconocido en suero de ratones a los 14, 21 y 28 días PI no así en la etapa temprana de la infección (7 días), Wei *et al.,* 2011 lograron una inmunidad protectora contra la infección por *T. spiralis* el cual mostro una disminución de la carga parasitaria de un 44.1% en comparación con el grupo control.

Wei *et al.,* 2015 clonaron e identificaron un gen Tspst en un sistema de expresión de *E. coli*, que codifica una proteína de 29kDa la cual tiene una buena inmunogenicidad en ratones y se puede utilizar como un inmunógeno para producir anticuerpos, este gen se encuentra principalmente en la cutícula y los órganos internos del parásito, los ratones inmunizados con el rTspst muestran una reducción de 47,5% de la carga de gusanos adultos en los intestinos.

Feng *et al.,* 2013 identificó un gen que codifica la serina proteasa (Ts-ADSP) de *T. spiralis* (Ts-ADSP) identificado por inmunoexploración de ADN de *T. spiralis* adulto, Ts-ADSP fue clonada y purificada por cromatografía de afinidad para ser utilizada como un potencial candidato de vacuna para el control de *T. spiralis* en ratones inmunizados BALB/c en combinación con un adyuvante y desafiados con LI, obteniendo una disminución en la carga de larvas musculares de 46.5% en relación con el grupo control, limitando así la invasión de *T. spiralis*. Diferentes estrategias durante los años se han empleado con el fin de obtener un cierto nivel de protección como se muestra en la tabla (Bruschi y Dupouy-Camet, 2014). Mientras que Zhang *et al.,* en el 2016 diseñaron ARN de doble cadena TsND-especifica (dsRNA) para silenciar la expresión de TsND de larvas de *T. spiralis*, un gen que codifica una proteína de 46 kDa y que desempeña un papel importante en la invasión de *T. spiralis* en las células epiteliales, la cual fue inoculada con larvas: 1) empapadas con TsNd dsRNA, mostrando una reducción de 49.9% en gusanos adultos y 39.9% en músculo y 2) los ratones infectados por las larvas a electroporación con TsNd dsRNA mostraron una reducción de 83,4% en gusanos adultos y la reducción de 69,5% en el músculo.

La inmunoterapia subcutánea se mantuvo durante mucho tiempo como la única ruta disponible y eficaz para la administración de alérgenos, sin embargo tiene cierto nivel de efectos secundarios, por ello se inició la búsqueda de una vía más segura de administración como la vía sublingual, en menos de 25 años desde su primer informe esta vía ha ganado credibilidad y se vio como una alternativa de la inyección clásica. La inmunoterapia sublingual se utiliza y se comercializa rutinariamente en muchos países como Europa y EUA (Passalacqua, 2014) y como pudimos observar en el presente trabajo fue la vía más eficaz para la protección contra *T. spiralis* con una disminución del 50% respecto al control infectado, así también se presento una

disminución en el grupo previamente infectado e inmunizado por esta vía, además que fue de fácil aplicación en comparación con la inmunización vía parenteral.

Tabla 30.

Niveles de protección contra Trichinellosis, obtenidos de diferentes formulaciones de vacunas

Antígeno	Adyuvante	Hospedero	Ruta de administración	Nivel protección a nivel intestinal	Nivel protección en el músculo (%)	Referencia
Extracto crudo de LRN	CFA	Cerdo	Intraperitoneal	no estimado	78	Marti *et al.*, 1978
Proteína Ts39	CFA	BALB/c ratón	Intraperitoneal	no estimado	78	Sun *et al.*, 1994
Gp-43 30 mer	Subunidad de toxina cólera B	NIH ratón	Intranasal	68.3 (fecundidad 6 d.p.i.)	No realizado	Mcguire *et al.*, 2002
rTs-87	CFA	BALB/c ratón	Subcutánea	no estimado	29	Yang *et al.*, 2009
DNA Ts-31	Ninguno	BALB/c ratón	Intramuscular	no estimado	36.9	Wang *et al.*, 2006
Ts87 (fago epítopos)	Ninguno	BALB/c ratón	Subcutánea	no estimado	28.7	Gu *et al.*, 2008
Ts-HPS 70	CFA	BALB/c ratón	Subcutánea	no estimado	37	Wang *et al.*, 2009
Ts-paramyosin	CFA	BALB/c ratón	Subcutánea	no estimado	36.7	Yang *et al.*, 2010[a]
Ts-paramyosi	Monstanide ISA 720	BALB/c ratón	Subcutánea	no estimado	34.9	Yang et al., 2010[a]
Ts-paramyosi	Monstanide ISA 206	BALB/c ratón	Subcutánea	no estimado	33.7	Yang *et al.*, 2010[a]
DNA Ts87	*Salmonella typhimurium*	BALB/c ratón	Oral	29.8 (4 d.p.i.)	34.2	Yang *et al.*, 2010b
Gp-43 30 mer	*Salmonella typhimurium*	BALB/c ratón	Intraperitoneal	61.8 (8 d.p.i. expulsión)	No realizado	Pompa-Mera *et. al.* 2011
TsNd dsRNA 46		BALB/c ratón	Oral larvas empapadas	49.9%	39.9%	Zhang *et al.*, 2016

TsNd dsRNA 46		BALB/c ratón	Oral larvas electroporación	83.4%	69.5%	Zhang *et al.*, 2016

En un estudio realizado con el péptido Ag30 sintético y desafiado con 150 larvas musculares y sacrificados a los 8 días después de la infección, recuperándose adultos de intestino, se observo una disminución del 36% con respecto al control infectado (Andrade, 2011), Ilic *et al.,* 2014 en un estudio realizado comprobaron que los antígenos de ES para la detección de anticuerpos por ELISA dio como resultado una mejor especificidad que lon antígenos obtenidos de gusanos adultos, Ilic *et al.,* en el 2012 menciona que los estudios obtenidos de la relación huésped parásito de algunos helmintos pueden ser moduladores potentes de la respuesta inmune y permite que puedan ser utilizados como una herramienta terapéutica para la prevención y/o supresión de eventos pro-inflamatorios con ello reafirmamos la importancia de nuestro estudio al buscar inmunógenos provenientes de *T. spiralis* para estimular una respuesta inmune. Cui *et al.,* 2014 purificaron una proteína de 31kDa que se expreso en todas las etapas del desarrollo del parásito, se encuentra en la cutícula y los esticositos y se presenta como un antígeno de diagnóstico potencial para Trichinellosis humana, con una sensibilidad y especificidad por ELISA de 97.83% y 99.13%, además lo proponen como un inmunógeno para producir anticuerpos, ya que indujo una fuerte respuesta inmune humoral (IgG), en la electroforesis realizada en sueros obtenidos de la fase muscular con la proteína de 31 kDa se detecto una banda de 45kDa y otra de 47kDa, en la fase larvaria, mientras que en el western blot se detectaron proteínas de 25-55kDa.

Además de utilizarse algunas proteínas o silenciar genes, se han utilizado algunos fármacos para la disminución de la carga parasitaria, no estrictamente desparasitantes, tal es el caso de Othman *et al.,* 2016 que utilizaron como tratamiento metformina y atorvastatina, dos medicamentes de uso común, metformina para el tratamiento de Diabetes mellitus tipo II, que a parte de sus diferentes efectos bioquímicos incluye acción antiinflamatoria, además disminuye factores pro-angiogenicos, disminuyendo la carga parasitaria en músculo, resultando solo la disminución de carga muscular en el tratamiento con atorvastatina estadísticamente

significativa, la reducción no está clara, pero se cree que podría haber afectado a la población adulta en el intestino delgado o podría haber hecho las células del músculo esquelético sean menos hospitalarias para las larvas de *Trichinella.*

Para el diagnóstico de Trichinellosis en el laboratorio de Biología Celular y Microbiología se ha implementado la utilización de la técnica de microinmunodifusión, como una técnica complementaria de la interacción antígeno-anticuerpo, Moreno *et al.,* 2012 utilización de 3 diferentes inmunógenos para evaluar el efecto protector en modelo murino y suino, mostró que el AST de *T. spiralis* tiene mayor efecto protector en comparación con anticuerpos Anti-*trichinella* y complejos inmunes de *T. spiralis*, se evaluaron diferentes grupos utilizando esquemas de inmunización en ratas de 4 dosis de 10 mg a los 0, 7, 14 y 21 días, y el de mayor respuesta fue utilizado en cerdos, como resultados se observó que por técnicas como compresión de tejido, DA y H-E no se encontró LI de *T. spiralis*, por MIID los sueros fueron negativos como en nuestro estudio, que no se mostro una interacción Ag-Ac en ninguna de las inmunizaciones si no hasta el reto y en el control infectado hasta los 21d PI y en los grupos 3 y 5 hasta el reto, mientras que en los grupos 4 y 6 la reacción estuvo presente desde la infección y se mantuvo durante el tratamiento de inmunizaciones, debido a la necesidad que representa esta técnica de que los sueros cuenten con altas concentraciones de Ac anti-*Trichinella* creemos que es una técnica solo de referencia en el diagnóstico, nunca se debe descartar o confirmar un suero analizado por esta.

Castañeda, 2010, midió la respuesta inmune humoral utilizando el modelo suino para la aplicación de antígenos secresión-excresión (SE) como inmunoterapia en un esquema semanal, contando con grupos a los cuales se les aplicó un esquema semanal de inmunoterapia y después infectar con 1 LI por gramo de peso corporal e infectados y aplicando el esquema. La respuesta inmune humoral se determinó por medio de técnicas de MIID, IFI e IET, en las cuales se observó por medio de MIID una banda de precipitación a las semana 4 postinfección, por IET hubo reconocimiento de Ag a partir de la semana 2 después de la inmunización o infección, además de que hubo identificación de Ag comprendidos entre los 97 y 14 kDa predominando de 30, 43 y 97 kDa.

Los estudios inmunológicos y epidemiológicos sugieren que una respuesta de tipo Th2 con la producción de anticuerpos específicos se asocia a la protección contra algunas infecciones por nematodos gastrointestinales. Por lo tanto, la identificación de epítopos de células B puede ser crítico para el desarrollo de vacunas basadas en péptidos contra nematodos parásitos, Martínez *et al.,* 2009 menciona que en el caso del uso de los antígenos de E/S microencapsulados en la inmunización de ratones BALB/c, se observó la inducción de respuestas conjuntas tipo Th1 y Th2, con altos niveles de IFN-γ y la inhibición de IL-4 en el bazo y en los nódulos linfáticos mesentéricos. Los títulos de anticuerpos específicos IgG1 en suero e IgA fueron elevados.

Al igual que en algunos otros helmintos, *T. spiralis* ha desarrollado estrategias para poder sobrevivir en el organismo del hospedero, incluyendo la expresión de epitopos similares a los del hospedero.

La hipersensibilidad retardada que se evaluó con intradermorreacción por medio de la Triple Respuesta de Lewis (induración, calor y eritema) a las 2, 6, 24 y 48h posteriores a la inoculación de los diferentes antígenos mostraron tanto en el grupo control infectado como en los diferentes tratamientos un pico máximo de induración a las 24hrs difiriendo de la mayoría de los autores que mencionan que la manifestación más notoria se da a las 48h con diferentes tipos de antígenos, se realizó esta técnica con el fin de que, además de ser un inmunógeno pontencial para la protección contra la enfermedad causada por *T. spiralis*, pueda ser utilizada en la técnica de intradermorreacción o reacción cutánea intradérmica buscando una respuesta inmunitaria positiva o negativa, con fines de diagnóstico, tratamiento, pronóstico o los tres (Rodríguez *et al.,* 2008) como en otras afecciones.

La intradermorreacción utilizada en otras enfermedades como la leishmaniasis a reportado una sensibilidad alta para el diagnóstico en una concentración de 10μg/ml al igual que el utilizado con el antígeno de 45 kDa. En Trichinellosis todavía no se utiliza como método de diagnóstico, por lo cual en estudios anteriores utilizando el AST mostró una respuesta aumentada por el gran número de proteínas presentes (Chávez, 2013), por lo cual creemos que este puede dar un mayor número de resultados falso-positivos, mientras que el antígeno de 45 kDa en los diferentes

tratamientos con fármacos se ve un mejor respuesta, presumiblemente por ser una proteína característica de la enfermedad. En el caso de falsos positivos Rodríguez *et al.,* 2008, menciona que en la mayoría de los casos se da una respuesta de hipersensibilidad inmediata de los 30 min hasta las 18 horas, desapareciendo completamente, por lo cual en el caso del grupo control sano que hubo una reacción al momento de inoculación y en las siguientes 2h debido al traumatismo de la aplicación, pero desapareció en las próximas horas, la respuesta negativa se traduce a una ausencia de exposición al inoculo estudiado o que se carece de una respuesta celular adecuada. También se difiere de una de las técnicas realizadas para el diagnóstico por medio de la hipersensibilidad retardada con mayor impacto en diagnóstico es la prueba de tuberculina que consiste en producir una pequeña pápula a las 48 o 72hrs de haber inyectado subcutáneamente una cierta cantidad de derivado purificado de proteína de tuberculina (Cabarcos *et al.,* 2001). Este tipo de hipersensibilidad se inicia por el reconocimiento del antígeno por linfocitos T, los cuales se activan y destruyen la célula blanco por dos mecanismos diferentes: uno en el que se secretan citocitas (TNF – factor de necrosis tumoral e interferón gamma) y por linfocitos (Madero y Madero, 2002). Cabarcos *et al.,* 2002, utilizó una prueba de hipersensibilidad retardada con múltiples antígenos para evaluar y tener una aproximación del estado de inmunidad celular, el *Multitest* IMC®, es un aplicador de resina acrílica, precargado con 7 antígenos (tetanos, difteria, estreptococo, tuberculina, testigo glicerina, *Candida albicans*, trichophyton, proteus) y un testigo, para la punción múltiple, con la parte destinada a la parte proximal de la punción acabada en «T», cada cabeza contiene 0,03 ml de antígeno en solución glicerinada al 70% donde se considera positiva cuando la semisuma de los diámetros es mayor o igual a 2 mm, desechando las inferiores. La suma de todos los diámetros medios obtenidos se conoce con el nombre de *score*, comparando con este dato, lo obtenido en nuestros resultados podemos argumentar que los grupos control infectado, inmunizado vía parenteral e infectado, infectado e inmunizado vía parenteral, inmunizado vía sublingual e infectado, infectado e inmunizado vía sublingual a partir de las 24h muestran su mayor reacción.

Por medio del *score* en trabajos anteriores se clasifico el resultado en humanos como normoérgico, hipoérgico y anérgico: *a)* un resultado corresponde de un paciente normoérgico cuando el *score* es mayor o igual a 10 mm en varones, 5 mm en

mujeres; *b)* un resultado es anérgico cuando el *score* es 0 mm, y *c)* un *score* es hipoérgico cuando se sitúa entre 0 y 10 mm en varones y 0 y 5 mm en mujeres (Cabarcos *et al.*, 2002). En comparación con algunos antígenos utilizados por medio de intradermorreacción (Tabla), pudimos clasificar nuestros resultados como positivos a las 24h y los mayores a 6mm.

Tabla 31.

Interpretación de Intradermorreacciones

Antígeno o reacción	*Lectura*	*Tipo de respuesta*	*Valor*
Tuberculina	48-72h	Induración 10mm	Contacto previo, orienta el diagnóstico
		Induración 5-9mm	Dudosa
		Induración < 4mm	Negativa
Lepromina	21 días	Nódulo > 5mm	Contacto previo, clasificación y pronóstico
Esporotricina	24-48h	Induración de 5mm	Diagnóstico
Coccidioidina	24-48h	Induración de 5mm	Contacto previo/pronóstico
Leishmanina	24-48h	Induración de 7mm	Diagnóstico/clasificación
Kveim	4 semanas	Induración > 5mm	Orienta el diagnóstico
Candidina	24-48h	Induración de 5mm	Contacto/inmunidad celular
Tricofitina	24-48h	Induración de 5mm	Contacto/inmunidad celular
Histoplasmina	24-48h	Induración de 5mm	Contacto/epidemiología
Paracoccidioidina	24-48h	Induración de 5mm	Contacto/epidemiología
Blastomicina	24-48h	Induración de 5mm	Pronóstico
Nocardina	24-48h	Induración de 15mm	Diagnóstico de micetoma
Casoni	24h	Induración de 5mm	Diagnóstico de equinococciasis
Tulargina	24-48h	Induración de 5mm	Diagnóstico de tularemia
Antraxina	24-48h	Induración de 5mm	Diagnóstico de ántrax agudo
Frei-Reilly	48-72h	Induración de 5mm	Diagnóstico de linfogranuloma venéreo
Foshay	24-48h	Induración de 5mm	Diagnóstico de bartonelosis
Ito-Reenstierna	48h	Induración de 7mm	Infección por *H. ducreyi*
Frenkel	48h	Induración de 5mm	Toxoplasmosis

Además se realizó un análisis de varianza multifactorial de los datos que arrojo un P-value menor a 0.05 con un nivel de confianza del 95%.

Ilic *et al.*, 2014 consideran que la prueba estándar de oro por serología para el diagnóstico de *Trichinella* es western blot para distinguir los antígenos de reacción cruzada diferencia de técnicas comúnmente utilizadas como lo son inmunofluorescencia indirecta y ELISA, en cada uno de los grupos controles se pudo identificar el triplete característico de *T. spiralis.*

Está técnica ha sido utilizada de forma industrial para el diagnóstico de *T. spiralis*, Yera *et al.,* 2013 utilizaron la técnica para evitar reacciones cruzadas observadas con imnufluorescencia indirecta y ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas, utilizaron antígenos de extractos crudos de *T. spiralis* para analizar 60 sueros de pacientes con *T. spiralis,* 11 sueros de pacientes sanos y 51 sueros de pacientes con otras enfermedades parasitarias (cisticercosis, esquistosomiasis, strongyloidosis, fascioliasis, toxocariasis, amebiasis hígado, anisakiasis, filariasis, la toxoplasmosis, la hidatidosis, malaria), bandas de 43, 44 y 64 se encontraron en 51 sueros con *T. spiralis* y 4 de 9 sueros de pacientes en etapas tempranas de la enfermedad.

En un estudio realizado en 2014 en el Laboratorio Nacional de Referencia de Serbia para la detección de Trichinellosis en sueros de diferentes hospederos (humano, caballo, cerdo y perro) por la técnica de western blot, se pudo apreciar la presencia de una triada de bandas con masas moleculares de 45, 49 y 53 kDa, esta misma triada reconocida por un anticuerpo monoclonal especifico 7C2C5 (Ilic *et al.,* 2014) e identificada en nuestro estudio en los sueros controles a partir de los 21d PI hasta las 6 semanas, en los grupos 3 y 5 al reto con LI y en los grupos 4 y 6 desde la infección y durante las 4 inmunizaciones con el anticuerpo policlonal (IgA, IgM e IgG) al igual que con el anticuerpo de IgG. Radovic *et al.,* en 2012 realizaron transferencias por western de antígenos de ES de *T. spiralis* para determinar qué componentes parasitarios fueron responsables de la reactividad cruzada observada por IFI, de sueros con autoanticuerpos y sueros infectados con *T. spiralis*, para determinar que antígenos podían estar conservados evolutivamente en el parásito y en hospedero, se pudo observar que el suero positivo control, que contenía anticuerpos específicos anti-*Trichinella* reconocía bandas de 45, 49 y 53 kDa (la tríada-*Trichinella* específica) que contiene el epítopo inmunodominante para la etapa de larvas musculares del género *Trichinella*, mientras que el realizado en suero con autoanticuerpos reacciono con uno o dos de las bandas en esta tríada (Fig. 50), por lo cual el patrón de bandas observado en transferencias de Western blot realizadas con los sueros que contienen autoanticuerpos difería del patrón obtenido usando los sueros positivos de *T. spiralis.*

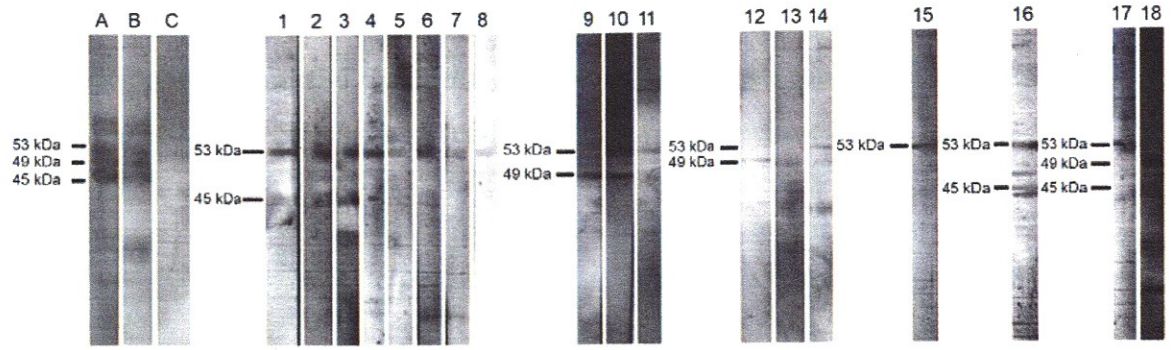


Fig. 50. Comparación por western blot de sueros con anti-*T. spiralis* y autoanticuerpos

T. spiralis con triada especifica (45, 49 y 53kDa), B) control positivo, C) control negativo, 1-18) sueros con autoanticuerpos con una o dos bandas de la triada de *T. spiralis* (45, 49, 53kDa).

En inmunizaciones con AST de *T.* spiralis se detecto por medio de WesterBlot el 60 % de sueros inmunizados y posteriormente se reto con LI de *T. spiralis* los cuales fueron todos positivos, al igual que en nuestro trabajo por medio del western blot con en anticuerpo policlonal (IgA, IgM e IgG), (Moreno *et al.*, 2012).

Sun *et al.*, 2015 analizaron por medio de ELISA la sensibilidad y especificidad de tres diferentes antígenos de *T. spiralis* (antígenos crudos de parásitos adultos, antígenos de ES de adultos y antígenos de ES de larvas musculares) para detectar IgG anti-*Trichinella* en sueros de ratones experimentalmente infectados y en sueros de pacientes con trichinellosis, en sueros de los 8 a 10 d PI infectados con 500 LI se detectaron anticuerpos anti-*T.spiralis* con cada una de los antígenos (Tabla 32), sin embargo a los 12 d PI con el antígeno de larvas musculares no hubo presencia de anticuerpos, así como en los sueros de pacientes infectados a los 19d PI (75%), concordando con este estudio que los mejores antígenos para el diagnóstico de anticuerpos anti-*T. spiralis* son los de ES de adultos.

Tabla 32.

Detección de IgG anti-*Trichinella* en ratones infectados con *T. spiralis* y otros parásitos por ELISA con tres diferentes preparaciones de antígenos

Suero de ratón infectado con	No. de sueros	No. de sueros positivos (%)	No. de sueros positivos (%)	No. de sueros positivos (%)
T. spiralis	35	35 (100)	35 (100)	35 (100)
A. cantonensis	12	0 (0)	0 (0)	0 (0)
S. mansoni	26	0 (0)	0 (0)	0 (0)
S. Japonicum	16	0 (0)	0 (0)	0 (0)
T. gondii	6	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Sano	46	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Cui *et al.*, 2014 en el estudio realizado con la purificación de la proteína de 31kDa se reveló que la inmunotinción fue ampliamente distribuido en la totalidad del cuerpo de los parásitos (larva muscular, gusanos adultos, larva preencapsulada y larva recién nacida), en el mismo año Cui *et al.*, 2014b, caracterizaron anticuerpos monoclonales que al realizar esta técnica, mostró que 9 de los 12 anticuerpos reaccionaron en cutícula y órganos internos de *T. spiralis*.

Yang *et al.*, 2014, purificaron y evaluaron la proteína recombinante TsDAF-21 para ser utilizada como un antígeno para el diagnóstico de *T.* spiralis y realizaron un ensaño de inmunolocalización el cual arrojó que esta proteína se expresa en las diferentes etapas de *T. spiralis* (larvas recién nacidas, larvas musculares y gusanos adultos).

En la necesidad de encontrar nuevos métodos para el control de la enfermedad, se han implementado el uso de bacterias inmunoestimulantes, ácido lácticos (*Lactobacillus casei*), ya que son parte de las bacterias comensales que contribuyen al mantenimiento de la homeostasis inmunológica en el intestino y se ha comprobado que con una solo aplicación induce protección inespecífica contra este nematodo (Martinez, *et al.*, 2009).

La exclusión inmune representa la primera línea de defensa contra helmintos intestinales y se refiere a la protección de la superficie de la mucosa por medio de anticuerpos (IgA e IgM de secresión) y otros factores innatos (Contreras, 2001), por

lo cual en el presente trabajo la vía de administración sublingual presentó una mayor protección contra la infección por *T. spiralis* y por medio de inmunofluorescencia se puede apreciar que a partir de la tercera inmunización vía sublingual hay presencia de IgA anti-*T. spiralis*, ya que en trichinellosis la respuesta humoral y celular especifica del hospedero se desarrolla así los diversos estadios del ciclo de vida del parásito. Este se manifiesta a nivel intestinal como una respuesta inflamatoria que causa la expulsión del parásito, y a nivel muscular como la formación de infiltrados celulares (Alcantara y Correa, 1993), por lo cual podemos sospechar que la disminución de la carga parasitaria fue debida al aumento de inmunoglobulinas en mucosas. Takashashi *et al.,* 1995 menciona que en el humano está comprobado que los antígenos de respuesta lenta, son detectados por anticuerpos de la clase IgM, mientras que antígenos de respuesta rápida por la clase IgG, aumentándose ambas en el presente trabajo.

10. CONCLUSIONES

La proteína de 45kDa es un potente inmunógeno que reduce la infección por *Trichinella spiralis* en un modelo murino hasta en un 50% utilizado antes de la infección y en un 40% utilizado post infección, podría ser utilizado en otras especies animales, así como la vía de administración sublingual es la más recomendada por su facilidad de aplicación, eliminación de efectos adversos y mayor reducción en la carga parasitaria que la vía parenteral.

La aplicación del inmunógeno de 45kDa por vía parenteral y vía sublingual aumenta la producción de inmunoglobulinas IgA e IgM anti-*Trichinella spiralis* desde la tercera inmunización, siendo la vía sublingual la más rápida en la producción de anticuerpos de tipo IgA, aumentando con esto la producción de inmunoglobulinas a nivel de mucosas y permitiendo una mayor expulsión de adultos.

La técnica de intradermorreacción para evaluar la respuesta de hipersensibilidad retardada es factible para utilizarla en el diagnóstico de la infección por *T. spiralis* y su mayor respuesta se presenta a las 24h PI.

Las técnicas de Inmunofluorescencia y western blot tienen una alta sensibilidad y especificidad para la detección de anticuerpos anti-*T. spiralis* ya que se pueden identificar anticuerpos específicos de la parasitosis.

El ciclo fue reproducible tanto el grupo control infectado como los grupos experimentales inmunizados con la proteína de 45kDa por las diferentes vías.

11. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar BR, Bautista G, Rojas J, De Novoa M, Ixta O, Martínez F. 2000. Experimental Swine Trichinellosis: Use of Dot-ELISA and Western Blot with Excretion/Secretion (ES) from Infective Larvae to Detect Anti-*Trichinella spiralis* antibodies. Revista Latinoamericana de Microbiología. 42:57-62.

Airas N, Näreaho A, Lindén J, Valo E, Hautamiemi S, Jokelainen P, Sukura A. 2013. Early *Trichinella spiralis* and *Trichinella nativa* infections induce similar gene expression profiles in rat jejuna mucosa. Experimental Parasitology. 135: 363-369.

Alcantara P y Correa P. 1993. Human humoral immune response agains *Trichinella spiralis*. Journal Parasitology. 23:657-660.

Andrade JI. 2011. Evaluación de la protección inducida por una vacuna de DNA contra la infección de *Trichinella spiralis* en modelo de raton. Instituto Politécnico Nacional. Disponible en: http://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/8442.

Arraiga C, Yépez-Mulia L, Morilla A, Ortega G. 1995. Detection of circulating Trichinella spiralis muscle larva antigens in serum samples of experimentally and naturally infected swine. Veterinary Parasitology. 58:319-326.

Bradford H, Lancetti A. 1976.A Rapid and Sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, A. Biochemistry.72: 248-254.

Bautista CR, Posada A, Ixta O. 2004. Inmunización de ratones BALB/c con un antígeno de larvas musculares de *Trichinella spiralis* utilizando *Lactobacillus casei* como adyuvante. Veterinaria México. 35:359-368. Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42335408.

Bell R. 1998.The generation and expression of inmunity of *Trichinellaspiralis* in laboratory rodents.AdvancesinParasitology. 41:149.

Berumen VT, Muñoz EJJ, Moreno MAG. 2002. Trichinellosis en perros callejeros de la ciudad de Zacatecas México. Parasitol.Latinoam. 57: 72-74.

Bien J, Näreaho A, Varmanen P, Gozdzik K, Moskwa B, Cabaj W, Nyman T, Savijoki k. 2012. Comparative analysis of excretory-secretory antigens of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* muscle larvae by two-dimensional

difference gel electrophoresis and immunoblotting. Proteome Science. http://www.proteomesci.com/content/10/1/10 20/08/14.

Bien J, Cabaj W, Monskwa B. 2013. Recognition of antigens of three different stages of the *Trichinella spiralis* by antibodies from pigs infected with *T. spiralis*. Exp. Parasitol. PubliMed.gov. 134(2):129-37.

Blum LK, Mohanan S, Fabre MV, Yafawi RE, Appleton JA. 2013. Intestinal Infection with *Trichinella spiralis* induces distinct, regional immune responses. Veterinary Parasitology. 194:101-105.

Bradford H, Lancetti A. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle dye binding. Anal. Biochemistry. 72:248-254.

Bruschi F y Dupouy-Camet J. 2014. Helmint Infections and their Impacto n Global Public Health. Springer. 229-279.

Bruschi F, Biandi M, Fornaro M, Naccarato G, Menicagli M, Gomez-Morales M, Pozio E y Pinto B. 2014. Matrix metalloprotenase (MMP)-2 and MMP-9 as inflammation markers of *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudoespiralis* infections in mice. Parasite Immunology. 36:540-549.

Cabarcos A, Lado F, Pestoni C, Lorenzo V. 2001. Utilidad de los tests cutáneos (mantoux y prueba de hipersensibilidad retardada) en la infección por VIH. Anales de medicina interna. SciElo. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992001001200008.

Cabarcos A, Lado F, Gómez A, Regueiro M. 2002. Pruebas cutáneas y tuberculosis: aplicación e indicaciones en la profilaxis, con especial incidencia en la coinfección con el VIH. Medicina Integral. Elsevier. http://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-pruebas-cutaneas-tuberculosis-aplicacion-e-13029947.

Capo V. y Despomier D. 1996. Clinical Aspects of Infection with *Trichinella spp.* Clinical Microbiology Reviews. (9):47-54.

Carrada T. 1992. Las parasitosis del hombre en la República Mexicana. Avances recientes y Perspectivas. Infectología. 12 (8):497-517.

Castañeda CV. 2010. Evaluación de la Inmunoterapia en infección de *Trichinella spiralis* en modelo experimental en cerdo. Tesis de Maestría Unidad Académica de Biología Experimental. UAZ.

Chapa RMR, Salinas T, Aguilar A, Martínez M. 1992. Recognition of *Trichinella spiralis* muscle larvae antigens by sera from human infected with this parasite and its potential use in diagnosis. Revista Latino Americana de Microbiología. 34:2. 95-99.

Chávez F. 2012. Caracterización de la Respuesta Inmune e Histológica en Ratas Long Evans infectadas con *Trichinella spiralis* y Tratadas con ALbendazol e Ivermectina. Universidad Autónoma de Nuevo León. Tesis de Maestria.

Chávez F, Chávez I, Muñoz J, Reveles R, Morales M, Moreno A. 2013. Caracterización de la respuesta inmune e histológica de ratas Long Evans infectadas con *Trichinella spiralis* y tratadas con albendazol e ivermectina. Revista Ibero-Latinoamericana. 1: 75-81.

Chávez EG. 2013. Caracterización de la respuesta inmune generada por la inmunización e inmunoterapia de la proteína de 45 kDa y del antígeno soluble total (AST) de *Trichinella spiralis*. Tesis de Doctorado en Ciencias con Acentuación en Microbiología. UANL. 65.

Chávez EG, Saldivar SE, Muñoz JJ, Moreno MA. 2006. Trichinellosis una zoonosis vigente. Revista electrónica de veterinaria. REDVET. [Online]. Disponible en: http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060606/060601.pdf.

Chávez MI, Saldivar S, Muñoz JJ, Morales MR y Moreno GM. 2004. "Comparación del efecto terapéutico del albendazol, ivermectina y nitazoxanida en infección por *Trichinella spiralis* con diferente carga parasitaria en fase intestinal en modelo experimental murino". Disponible en: http://www.vet-uy.com/articulos/artic-porc/019/porc019.htm.

Chávez MI, Reveles HG, Muñoz JJ, Maldonado C, Moreno MA. 2011. Utilidad del modelo experimental de cerdo en el estudio y tratamiento de Trichinellosis. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria. 12: 1-18. http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050511B/051152.pdf.

Chu KB, Kim S, Lee SH, Joo KH, Lee K, Lee Y, Zheng S y Quan F. 2014. Enhanced protection agains *Clonorchis sinensis* induced by co-infection with *Trichinella spiralis* in rats. Parasite Immunology. 36: 522-530.

Calcagno MA, Teixeira C, Forastiero MA, Costantino SN, Venturiello SM. 2005. Aspectos clínicos, serológicos y parasitológicos de un brote de triquinelosis humana en Villa Mercedes, San Luis, Argentina. Las fases aguda y crónica de la infección. Medicina (B Aires) 65: 302-306.

Contreras A. 2001. Trichinellosis humana: análisis longuitudinal de la respuesta de anticuerpos IgM e IgG sericos dirigidos contra el estadio adulto de *Trichinella spiralis* y de su utilidad en el diagnóstico de la trichinellosis humana. Dirección General UNAM.

Contreras M, Sandoval L, Salinas P, Saavedra T, Schenone H. 2001. Inmunodiagnóstico de la triquinosis humana. Boletín Chileno de Parasitología. 56:3-4. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-94022001000200003.

Correa D, Coballase UE, Solís RD, Huerta GB, Hernandez J. 2006. Triquinelosis. Aprendizaje de la parasitología basado en problemas. Editores textos mexicanos. (50):560 -570.

Cui J, Wang L, Sun G, Liu LN, Zhang SB, Liu RD, Zhang X, Jiand P y Wang ZQ. 2014. Characterization of *Trichinella spiralis* 31 kDa protein and its potential application for the serodiagnosis of Trichinellosis. Acta Tropica. 142:52-63.

Cui J, Jing FJ, Fu GY, Ren HJ, Liu LN y Wang ZQ. 2014. Preparation and characterization of monoclonal antibodies agains ES antigens of *Trichinella spiralis*. Helminthologia. 51:253-261.

Cvetkovic J, Ilic N, Sofronic-Milosavljevic L y Gruden-Movsesijan A. 2014. Glycans expressed on *Trichinella spiralis* excretory-secretory antigens are important for anti-inflamatory immune response polarization. Comparatuve Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 37: 355-367.

Dea A, Rama I. Bolas-Fernandez F. 2006. Vaccination of mice against intestinal Trichinella spiralis infections by oral administration of antigens microencapsulated in methacrilic acid copolymers. Vaccine. 24:2772-2780. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16446017.

Del Rio A y Herrera DR. 1986. Triquinosis experimental: Extracción de antígenos y procedimientos para detectar anticuerpos. Archivos de Investigación Médica. 359-367.

Departamento de Bioprocesos. 2008. Unidad Profesional Interdiciplinaria de Biotecnología. Instituto Politécnico Nacional. Disponible en: http://www.biblioteca.upibi.ipn.mx/Archivos/Material%20Didactico/Manual%20Inmunolog%C3%ADa%20Aplicada.pdf.

Despommier D. 2004. Biology of *Trichinella.* The *Trichinella* Page. Disponible en: www.trichinella.org/biology.htm.

Díaz MA, Mejía D, Moral LE. 2007. El mercado de la carne de cerdo en canal en México. Revista Análisis Económico. 51:273-287. Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41311486014

Falduto GH, Vila CC, Saracino MP, Calcagno MA, Venturiello SM. 2015. *Trichinella spiralis*: Killing of newborn larvae by lung cells. Parasitol Reserch. 114: 679-685.

Feng S, Wu X, Wang X, Bai X, Shi H, Tang B, Liu X, Song Y, Boireau P, Wang F, Zhao Y, Liu M. 2013. Vaccination of Mice with an Antigenic Serine Protease-Like Protein Elicits a Protective Immune Response Against *Trichinella spiralis* Infection. Journal of Parasitology. 99:426-432. Disponible en: http://www.journalofparasitology.org/doi/abs/10.1645/12-46.1

Fiandor RA. 2008. Inmunoterapia específica con alérgenos. Sistema Nacional de Salud 32 (2): 39-43.

Flisser A, Velasco A, Martinez C, Gonzalez F, Briseno B, Garcia R, Caballero A, Hernandez I, Garcia H, Gutierrez L. 2002. Infectious diseases in Mexico. A survey from 1995–2000. Arch. Med. Res. 33:343–350.

Fragoso R, Tavizón P, Villacaña H. 1981. Un brote de triquinosis (triqunelosis) en laguna de carretero, Zacatecas. Salud Pública. XXIII:24-41.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), World Health Organization (WHO). 2014. Multicriteria-Based Ranking for Risk Managemente of Food-Borne Parasites. Microbiological Risk Assessment Series (MRA) 23. Disponible en: http://www.fao.org/publications/card/en/c/ee07c6ae-b86c-4d5f-915c-94c93ded7d9e/

Frey C, Shuppers M, Nockler K, Mariculic A, Pozio E, Kihm U. 2009. Validation of a Western Blot for the detection of anti-*Trichinella spp*. Antibodies in domestic pigs. Parasitology Reserch. 6:1269-1277.

Gajardhar AA, Pozio E, Gamble HR. 2009. *Trichinella* diagnostics and control: mandatory and best practices for ensuring food safety. Vet. Parasitol. 23:197-205.

Galindo SB. 2004. Homenaje en el 200 Aniversario de la introducción de la vacuna de la viruela en América. Revista Cubana de Medicina Tropical. 56:3

Gamble HR. 1985. *Trichinella spiralis*: immunization of mice using monoclonal antibody affinity-isolated antigens. Exp. Parasitol. 59:398-404. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2581801.

Gamble HR, Rapic D, Marmculic A, Murrell KD.1988. Evaluation of excretion-secretory antigens for the serodiagnosis of swine trichinellosis.Vet. Parasitol. 30: 131-136.

García MJ, Reveles G, Muñoz J, Moreno M. 2012. Utilidad del albendazol/quinfamida en el tratamiento de la fase intestinal de la infección por *Trichinella spiralis* en modelo murino. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica. 31: 51-61.

Garibay A. 2006. Manual de Prácticas de Inmunología. Universidad de Sonora. 1: 86-89.

Gao F, Wang R y Liu M. 2014. *Trichinella spiralis*, potential model nematode for epigenetics and its implication in metazoan parasitism. Frontiers in physiology. 4:1-5.

Gridley M. 1957. Manual of Histology and special staining technique. Armed Forces. Institute of Pathology.2:57-16.

Gómez-Lucia E, del Mar BM, Doménech A. 2007. Manual de Inmunología Vetrinaria. Ed. Pearson, Prentice Hall. 405-406.

Gottstein B, Pozio E, Nockler K. 2009. Epidemiology, Diagnosis, Tratment, and Control of Trichinellosis.Clinical Microbiology Reviews. 22: 127-145

Gu Y, Wei J, Yang J, Huang J, Yang X, Zhu X. 2013. Protective Immunity against *Trichinella spiralis* infectiom induced by a Multi-epitope Vaccine in a Murine Model. Departament of Parasitology. PLOS ONE. www.plosone.org

Guzmán TM. 2012. Cuban Society of Microbiology and Parasitology. Revista Cubana de Medicina Tropical. [Online]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sjci_arttext&pid=S0375-07602012000200001.

Hernández R, Bermúdez R, Fonseca R, García P, Le F, Boireau P, Ortega-Pierres G. 2008. Identification, molecular characterisation and differential expression of caveolin-1 in *Trichinella spiralis* maturing oocytes and embryos. International Journal of Parasitology. 38: 191-202.

Ilic N, Gruden-Movsesijan A, Sofronic-Milosavljevic L. 2012. *Trichinella spiralis*: shaping the immune response. Immunology in Serbia. 82:111-119.

Ilic N, Gruden-Movsesijan A, Zivojinovic M, Sofronic-Milosavjevic L. 2014. Characteristic Band Pattern in Western Blots for Especific Detection of Anti-*Trichinella spiralis* Antibodies in Different Host Species. Acta Veterinaria-Beograd. Versitia. 64:33-43.

Jansen A, Schoneberg I, Stark K, Nockler K. 2008. Epidemiology of trichinellosis in Germany, 1996-2006. Vector Borne Zoonotic. 8:189-196. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18171103

Jay D and Nadeau K. 2014. Immune Mechanisms of Sublingual Immunotherapy. Current Allergy and Asthma Reports. 14: 1-7.

Kang SA, Cho MK, Park M, Kim D, Hong YC, Lee YS, Cha H, Ock MS, Yu HS. 2011. Alteration of helper T-cell related cytokine production in splenocytes during *Trichinella spiralis* infection. Veterinary Parasitology. (186): 319-327.

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

Laredo SV, Martínez MP, Reveles RG, Muñoz J, Moreno M. 2012. Modificaciones de la célula nodriza de *Trichinella spiralis* en ratas Long Evans inmunizadas con antígeno soluble total de *Trichinella spiralis* y sacrificadas a diferentes tiempos. Revista Ibero-latinoamericana Parasitología. 71:160-166.

Latin Salud. 2001. Triquinosis. 2001. 355:43. Disponible en: http://www.latinsalud.com/temas/triquinosis.htm (17-03-2002).

Laverde L, Builes L, Masso C. 2009. Detección de *Trichinella spiralis* en cerdos faneados en dos plantas de beneficio en el municipio de bello. Revista CES. Medicina Veterinaria y Zootecnia. 4: 47-56. Disponible en: http://www.redalyc.org/pdf/3214/321428102005.pdf

Lawrence C, Paterson J, Wei XQ, Liew FY, Garside P, Kennedy MW. 2000. Nitric oxide mediates intestinal phatology but not immune expulsion during *Trichinella spiralis* infection mice. Journal of Inmunology. 164:4229.

Lia C, Liu M, Bai X, Liu P, Wang X y Li T. 2014. Characterisation of a plancitoxi-1-like DNase II gene in *Trichinella spiralis*. PLoS Negected Tropical Diseases. 8:8.

Lloyd JR. 2000. Bibliografía Epidemiológica. Triquinelosis. Universidad de Comahué. Disponible en: http//www.apuntesuniversitarios.com/Triquinelosis/triquine.htm

López, FM, y Marco, CP. 2012. Inmunoterapia: mecanismos de acción, indicaciones y beneficios. Terapéutica. Disponible en: http://www.jano.es/ficheros/sumarios/1/63/1448/42/1v63n1448a13038855pdf001.pdf.

Madero M y Madero J. 2002. El sistema inmune cutáneo. Dermatología práctica. http://www.medicosecuador.com/librodermatología/capitulos/capitulo_3.htm

Maldonado C. 2007. Evaluación del efecto protector del inmunógeno de 45 kDa en la infección por *Trichinella spiralis* en ratas nutridas y desnutridas. Universidad Autónoma de Nuevo León. 67-82.

Maldonado TC, Reveles RG, Saldivar ES, Muñoz JJ, Morales MV, Moreno MA. 2007. Evaluación del efecto protector de 2 inmunógenos de *Trichinella spiralis* en ratas long Evans con modificación nutricional e infectado con *Trichinella spiralis*. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S07986420070002000007&script=sci_arttext&tlng=en.

Maldonado C, Reveles R, Saldivar E, Muñoz J, Morales M, Moreno A. 2011. Evaluación del efecto protector de 2 inmunogenos de *Trichinellaspiralis* en rata Long Evans con modificación nutricional e infectado con *Trichinellaspiralis*. Revista Electrónica Veterinaria. http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010002.html

Makedonka M. y Douglas P. 2006. Biology and genome og*Trichinellaspiralis*. Wormbook the online review of elegan Biology. 708://www.wormbook.org/chapters/www_genomesTrichinella/genomesTrichinella.html

Martínez G, Santiago R, Bautista G. 2009. Effect of *Lactobacillus casei shirota* strain intraperitoneal adminstration in CD1 mice on the establishment of *Trichinella spiralis* adult worms and on IgA anti-*T. spiralis* production. Veterinary Parasitology. 162: 171-175.

Martínez R. 1998. Revisión Bibliográfica: Situación de la Triquinosis en Chile. Departamento de Epidemiología. Ministerio de Salud. [Online]. Disponible en: http://www.chilemedcl/xxi/articulos/feb99/

Medina L, Ramírez A, Ochoa M, Montes A, Franco C, Martín R. 2006. Determinación de la presencia de anticuerpos anti-*Trichinella spiralis* en

cerdos por la prueba de ELISA. Avances de Investigación científica en la CUCBA. 771-775.

Mitreva M, Jasmer DP. 2006. Biology and Genome of *Trichinella spiralis*. WormBook. 23:1-21. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18050431.

Mitreva M, Jasmer DP, Zarlega DS, Wang Z, Abubucker S, Martin J, Taylor CM, Yin Y, Fultor L, Minx P, Yang SP, Warren WC, Fulton RS, Bhonagiri V, Zhang X, Pepin HK, Clifton SW, McCarter JP, Appleton J, Mardis ER, Wilson RK. 2011. The draft genome of the parasitic nematode *T. spiralis*. Nature genetics.43:228-235.

Molina V, Albarracín S, Krivokapich S, Chiosso C, Mancini S, Bigatti R, Arbusti P, Avila A, Larrieu E. 2012. Seroepidemiología y control de Trichinellosis en cerdos en Sierra Grande, Argentina. InVet, 14(1):33-40.

Moreno A, Muñoz J, Rumayor A. 1990. The 45 kDa Antigen of *Trichinella spiralis* Induces Protection in Experimental Infections.

Moreno A, Ávalos E, Muñoz J, Herrera R. 1996. Detención de Antígenos Inmnunodominantes de *Triquinella spiralis* en conejo como modelo experimental, Investigación Científica. 9: 5-8.

Moreno MA, Reveles R, Saldivar S, Muñoz J. 2000. Los modelos experimentales, Herramientas de estudio en la Trichinellosis. Revista Lat. De Microbiología. 42:662.

Moreno A, García A, Saldivar S, Reveles R, Muñoz, J. 2012. Evaluación del Efecto Protector de 3 inmunógenos en modelo experimental murino y cerdo e infectado con *Trichinella spiralis*. Revista Electrónica Veterinaria. http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020212.html.

Muñoz JJ. 2013. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de la resiniferatoxina en fase intestinal en la infección por *Trichinella spiralis* en modelo murino. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Zacatecas.

Murrell D, Bruschi F. 1994. Clinical trichinellosis. In: Tsien Sun. Progress in Clinical Parasitology. Boca Raton: CRC Press. 117–150.

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

Nocker K, Reckingers S, Broglia A, Mayer-Scholl A, Bahn P. 2009. Evaluation of a Western Blot and ELISA for the detection of anti-*Trichinella*-IgG in pig sera. Veterinary Parasitology. 4:341.347

NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo sural. Diario Oficial de la Federación.

Núñez GG. 2011. Trichinellosis: Respuesta immune y actualización en el diagnóstico inmunoserológico. MANLAB, Área Inmunoserología y Autoinmunidad. 1:14-20.

Oliver MC, Zárate PB, Torres LG, Muñoz RB, Molina H, Cortés H. 2008. Manual de Prácticas de Laboratorio de Inmunología Aplicada. Departamento de Bioprocesos. Instiituto Politecnico Nacional. Disponible en: http://www.biblioteca.upibi.ipn.mx/Archivos/Material%20Didactico/Manual%20Inmunolog%C3%ADa%20Aplicada.pdf

Ouchterlony O. 1958. Difussion in Gel Methods for Immunological Analysis in: Progress Allergy. Vol. V. Ed. Gallio, P., Basel and New York, Krager, New York. USA. 1 – 78.

Ortega MG, Arriaga C, Yépez ML. 2000. Epidemiology of trichinellosis in Mexico, Central and South America.Veterinary Parasitology. 93:201-225

Othman AA, Rayia DM, Ashour DS, Saied EM, Zineldeen DH. El-Ebiary AA. 2016. Atorvastatin and metformin administration modules experimental *Trichinella spiralis* infection. Parasitology international. 65:105-112.

Pardo O. 1996. La inmunización con ADN: Una nueva generación de vacunas?. Biotecnología Aplicada. University of Toronto. 13:81-88. Disponible en: https://tspace.library.utoronto.ca/handle/1807/22185

Park JN, Park SK, Cho MK, Park M, Kang S, Kim DH, Yu HS. 2012. Molecular characterization of 45kDa aspartic protease of *Trichinella spiralis*. Veterinary Parasitology. 190:510-518.

Passalacqua G, Baena-Cagnani CE, Bousquet J, Casale TB, Cox L, Durham S, Larenas-Linnemann D, Ledford D, Pawankar R, Potter P, Rosario N, Wallace D, Lockey R. 2013. Grading local side effects of sublingual immunotherapy for respiratory allergy: Speaking the same language. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 132: 93-98.

Passalacqua G. 2014. Recommendations for appropriate sublingual immunotherapy clinical trials. World Allergy Organization Journal. 7:21.

Pérez JA, Díaz M, Pérez A, Ferrere F, Monje B, Norman F, López R. 2010. Treatment of diseases caused by parasites. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 28:44-59. Disponible en: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X09005059

Philipp M, Taylor PM, Parkhouse RM, Ogilvie BM. 1981. Inmune response to stage specific surface antigens of the parasite nematode *Trichinella spiralis*. Journal of Expremimental Medicine. 154:210.

Pompa M, Yépez M, Ocaña E, García E, Ortega G, González C. 2011. *Trichinella spiralis*. Intranasal immunization with attenuated *Salmonella enterica* carrying a gp43 antigen-derived 30-mer epitope elicits protection in BALB/c mice. Exp. Parasitol.

Quiroz RH. 2011. Parasitología y enfermedades parasitarias de animals domésticos. 1a ed. México. Editorial Limusa.

Radovic I, Gruden-Movsesijan A, Ilic N, Mostarica-Stojkovic M, Sofronic-Milisavljevic L. 2012. *Trichinella spiralis* shares epitopes with human autoantigens. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 107:503-509.

Ramírez IM. 1981. Epidemiología de la Triquinelosis. Departamento de Medicina Preventiva. FMVZ-UNAM. 278-334.

Reveles H. RG., Villalobos R., Saldivar S., Moreno M. A. 1997. Implante histológico de *Trichinella spiralis* experimental. Parasitología al Día. 114 – 118.

Reveles G, Muñoz J, Saldivar SJ, Moreno MA. 2000. Efectos de la inmunoterapia sobre larvas infectadas (LI) de *Trichinella spiralis* implantadas en músculo estriado en modelo experimental. Bioline International. [Online]. Disponible en:http://www.bioline.org.br/request?ba00039.

Riva E, Steffan PE, Fiel CA. 2007. Trichinellosis: Aspectos múltiples de una zoonosis global. Mejoramiento del control de la trichinellosis. FAO América Latina y el Caribe, Roma. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 94-109. Disponible en: http://helminto.inta.gob.ar/pub%20triquinosis/Trichinellosis%20aspectos%20multiples.pdf

Riva E, Steffan P, Fiel C. 2011. Muscular de Ratones cadavéricos y el rol potencial de larvas de *Dermetstesmaculatu.* Área de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Revista Veterinaria. 1-9

Rivera J, Losada H, Cortes J, Grande, Vieyra J, Castillo A, Gonzalez R. 2007. Cerdos de traspatio como estrategia para aliviar pobreza en dos municipios conurbados al oriente de la Ciudad de México. Livestock Research for Rural Development 19.

Rodríguez M, Lizarraga C, Jurado F. 2008. Intradermorreacciones en dermatología. Dermatol Rev. Mex. 166-174.

Roitt I, Brostoff J, Male D. 2000. Inmunológia. Editorial. Harcourt. 5ta ed. Madrid España. 243.

Romaris F, North SJ, Gagliardo LF, Butcher BA, Ghosh K, Beiting DP, Panico M, Arasu P, Dell A, Morris HR, Appleton JA. 2002. A putative serine protease among the excretory-secretory glycoproteins of L1 *Trichinella spiralis.* Mol Biochem Parasitol. 122:149-160. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12106869.

Salinas TM, Navarrete LA, Mendez LB, Esquivel AD, Martínez A, Hernandez S. 2007. *Trichinells spiralis:* strong antibody response to a 49kDa newborn larva antigen in infected rats. Exp. Parasitol. 2:160-167.

Shuang F, Xiuping W, Xuelin W, Xue B, Haining S, Bin T, Xiaolei L, Yanxia S, Pascal B, Feng W, Ying Z, Mingyuan L. 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.

Solórzano CC, Anchus J, Periago MR. 2004. El desarrollo de nuevas vacunas: generación de información para la toma de decisiones. Revista Panamericana de salud Pública. Disponible en: http://www.scielosp.org/scielo.php?pid=S102098920040001000 01&script=sci_arttext.

Steffan P. 2006. Trichinellosis en el cono sur de América: Situación actual y prospectiva ancentral. Área de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Departamento de Sanidad animal y medicina preventiva, Fac. de Ciencias Veterinarias, UNICEN, Tandil, Argentina, Red de Helmintología de FAO

para América Latina y el Caribe. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar.

Sun G, Wang Z, Liu C, Jiang P, Liu R, Wen H, Qi X, Wang L, Cui J. 2015. Early serodiagnosis of trichinellosis by ELISA using excretory-secretory antigens of *Trichinella spiralis* adult worms. Parasites y Vectors. (484): 1-8.

Takahashi Y, Mizuno N, Uno T, Aisaka A, Araki T. 1990. A spectrum of antibody response with time after Trichinella spiralis infection in rats. Journal Parasitology. 76:230-239. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2319424?dopt=Abstract.

Takahashi Y, Goto C, Kita K. 1995. Ultraestructural study of *Trichinella spiralis* with emphasis on adult female reproductive organs. Journal Helminthol. 69: 247-252.

Takahashi Y. 1997. Antigens of *Trichinella spiralis.* Parasitology Today. 13:104-106

Tay ZJ, Sánchez VJ y Sánchez RD. 2002. Helmintiasis y cisticercosis. Rev Fac Med UNAM 45:3.

Tolnai Z, Széll Z, Marucci G, Pozio E, Sréter T. 2014. Environmental determinants of spatial distribution of *Trichinella britovi* and *Trichinella spiralis* in Hungary. Veterinary Parasitology. 204:426-429.

Todorova VK, Stoyanov DI. 2000. Partial characterization of serine proteinases secreted by adult Trichinella spiralis. Parasitology research. 86:684-687. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10952270.

Towbin HT, Sthanlin TG. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocelulosa sheets, procedure an some application. Proct. Nathl. AcadoSci. USA 76:4350.

Trichinella.org, 2014. Nurse Cell Formation. Biology of the Nurse Cell-Parasite Complex. The Trichinella Page. Disponible en: http://www.trichinella.org/bio_nursecell.htm.

Valencia VC, Muñoz AH, Torres HM. 2003. Triquinosis: Entre el temor y el deber de informar la fuente de infección. Rev Chil lnfct. 20:99-103.

Venturiello S, Ben G, Malmassaris, Nunez G, Veeroni R, Traversa M. 1998. Diagnosis of porcine trichinellosis parasitological and inmunoserological test in pigs from endemic areas of Argentina.Veterinary Parasitology. 74: 215-228.

Venturiello SM, Malmassari SN, Costantino SN, Nuñez G. 2000. Cytotoxicity-blocking antibodies in human chronic trichinelosis. Parasitology Research. .86:9.762-767.

Venturiello S, Constantino SN, Nuñez GG. 2007. Alteraciones fisiopatológicas y relación inmunológica hospedador-parásito en trichinellosis. Revista Farmáceutica Reviews. 2:35.

Wang L, Cui J, Hu D, Lui R and Wang Z. 2014. Identificación of early diagnostic antigens from major excretory-secretory proteins of *Trichinella spiralis* muscle larvae using inmmunoproteomics. Parasites y Vectors. Disponible en: http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/40 20/08/2014.

Watabe, N. 2014. Imparied protection against *Trichinella spiralis* in mice with high levels of IgE. Parasitology International. 63:332-336.

Wei J, Gu Y, Yang J, Yang Y, Wang S, Cui S, Zhu X. 2011. Identification and characterization of protective epitope of *Trichinella spiralis* paramyosin. Vaccine. 29:3162-3168.

Wei Y, Ling GL, Ruo DL, Ge GS, Chun YL, Shuai BZ. 2015. Molecular identification and characterization of *Trichinella spiralis* proteosome subunit beta type-7. Parasites y Vectors. 8:18.

Yan-Rong Y, Mig-Jun D, Wei-Wei L, Jin-Sheng Z, Mo-Zhi J, Jie H y Yong-Fen Q. 2014. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis is activated in intestines of mice with *Trichinella spiralis* infection. Experimental Parasitology. 145: 1-6.

Yang Y, Qin W, Quiu H y Liu Y. 2014. Characterization of TsDAF-21/HSP90 protein from the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. Parasitology Reserch. 113:2209-2217.

Yang J, Pan W, Sun X, Zhao X, Yuan G, Sun Q. 2015. Inmunoproteomic profile of *Trichinella spiralis* adult worm proteins recognized by early infection sera. Parasites y Vectors. 8:20.

Yera H, Andiva S, Perret C, Limonne D, Boireau P, Dupouy-Camet J. 2013. Development and Evaluation of a Western blot kit for Diagnosis of Human Trichinellosis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 10: 793-796.

Zhang SB, Jiang P, Wang Z, Lang SR, Liu RD, Zhang X, Yang W, Ren HJ, Cui J. 2016. DsRNA-mediated silencing of Nudix hydrolase in *Trichinella spiralis*

inhibits the larval invasion and survival in mice. Experimental Parasitology. 162: 35-42.

PRODUCCIÓN DURANTE EL DOCTORADO

ESTANCIAS Y MOVILIDAD

1. **Movilidad Extranjera:** Estancia Académica en el Laboratorio de Inmunoparasitología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, IDEHU_CONICET, Buenos Aires Argentina. 2013.
2. **Movilidad Nacional:** Estancia Académica Nacional en Modalidad Mixta apoyada por CONACyT en la Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas, agosto-diciembre 2015.

CURSOS

1. Tópicos de Parasitología. Parásitos del Tracto Gastrointestinal Humano. Fundación Winerlab. **Certificado. Valor curricular: 60 horas.**
2. Enfermedades Parasitarias Transmitidas por alimentos. Fundación Winerlab. **Certificado. Valor curricular: 80 horas.**

DIPLOMADOS

Ponente en el Diplomado de Cultura Ambiental y Desarrollo Sostenible, Universidad Autónoma de Zacatecas.

PRESENTACIONES ORALES

1. Primer Simposio Internacional de Trichinellosis, Proyecto RED: UAZ-UBA-UANL apoyado por PROMEP Universidad Autónoma de Zacatecas
2. Susceptibilidad de Trichinella spiralis a varios antihelmínticos en Congreso Internacional de Investigación de AcademiaJournals Chiapas 2013, **ISSN** 1946-2353 2/4
3. Respuesta Inmunitaria en Ratas Long Evans Infectadas con Trichinella spiralis y Tratadas con Albendazol e Ivermectina XXI Congreso Latinoamericano de Parasitología, Guayaquil, Ecuador
4. Análisis serológico e histopatológico en Murinos infectados con *Trichinella spiralis* y tratados con diferentes dosis de Albendazol y sulfoxido de albendazol XXI Congreso Latinoamericano de Parasitología, Guayaquil, Ecuador.
5. Protocolo para el manejo de Animales de Experimentación en Tratamientos con Inmunógenos en Trichinellosis Segundo Simposio Internacional de Cultura Ambiental y Desarrollo Sostenible. Zacatecas, México.

6. Comparación del efecto protector de un inmunógeno administrado por dos vías en una parasitosis en modelo murino, Doctorado en Ciencias en la Especialidad de Farmacología Médica y Molecular, Medicina Humana, UAZ.
7. Resinuferatoxina disminuye los mediadores proinflamatorios TNF-α, NO y PGE2 en fase intestinal, así como la carga parasitaria en fase muscular de la infección por *T. spiralis*, XXII Congreso Nacional de Inmunología.

PRESENTACIONES EN CARTEL

1. Caracterización de la respuesta Inmunológica e histológica en murinos Infectados con *Trichinella spiralis* y Tratados con Albendazol e Ivermectica en XXV Jornadas Médicas de la Unidad Académica de Medicina Humana y C.S. Universidad Autónoma de Zacatecas
2. Utilización del Inmunógeno de 45kDa y Antígeno Soluble Total de *Trichinella spiralis* por Intradermorreacción III Congreso Interdisciplinario de Posgrados IPICYT, San Luis Potosí, México.
3. Antígeno de 45kDa de *Trichinella spiralis* como inmunógeno y antígeno para el tratamiento y diagnóstico de Trichinellosis II Simposio Nacional de Ciencias Químico-Biológicas, Zacatecas, México.
4. Comparación del efecto protector del inmunógeno de 45kDa de *Trichinella spiralis* administrado por vía sublingual y vía convencional en murinos infectados con *Trichinella spiralis* XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología ALAM 2014 y IV Congreso Colombiano de Microbiología 4CCM, Cartagena, Colombia.
5. Utilidad y eficacia de los tratamientos Farmacológicos en Trichinellosis en Modelo Experimental XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología ALAM 2014 y IV Congreso Colombiano de Microbiología 4CCM, Cartagena, Colombia.
6. Evaluación de la carga parasitaria y cambios Morfológicos en murinos infectados con *Trichinella spiralis* tratados con fármacos e Inmunógenos 1er Congreso Nacional de Investigaciones Microbiológicas, Puebla, México.
7. Evaluación de la protección del inmunógeno De 45kDa de *T. spiralis* administrado por vía Convencional y vía sublingual en la enfermedad Causada por *Trichinella spiralis* 22° semana nacional de Ciencia y Tecnología, UAZ, Zacatecas, México.
8. Cinética de inmunoglobulinas en murinos Tratados con el inmunógeno de 45kDa de *Trichinella spiralis*, XXIII Congreso Latinoamericano de Parasitología, Salvador, Bahía, Brasil.
9. Evaluación de las modificaciones de *Trichinella spiralis* en murinos tratados con el inmunógeno de 45kDa, XXIII Congreso Latinoamericano De Parasitología, Salvador, Bahía, Brasil.

FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS

1. Coasesora de Tesis de Licenciatura Químico Farmacéutico Biólogo: "Utilidad de la Inmunoflouorescencia Indirecta en la Detección de Anticuerpos Protectores Producidos en Modelo Murino Inmunizados por Vía Oral con el Inmunógeno de *Trichinella spiralis"* presentado por el C. Jaime Castañeda Cabral, Abril 2016.
2. Asesora externa y Vocal de Tesis de Licenciatura Químico Farmacéutico Biólogo "Ensayo y Evaluación en Modelo Experimental Murino de Ciclos Biológicos de Tres Parásitos Zoonóticos" presentado por el C. Juan Luis García Reveles, Abril 2016.
3. Revisor de Tesis de Licenciatura Químico Farmacéutico Biólogo "Determinación de Parásitos en felis silvestris catus por medio de técnicas coproparasitologicas directas" presentado por el C. Patricia Vázquez Cruz y Távata Janeth Serrano Ayala, Abril 2016.

ASISTENCIA A CURSOS Y CONGRESOS

1. Primer Simposio Internacional Trichinellosis en la Universidad Autónoma de Zacatecas.
2. Seminario del Departamento de Microbiología, Inmunología y Biotecnología "Mecanismos implicados en la fibrosis hepática desencadenada por la infección por *Brucella abortus*" IDEHU (CONICET-UBA) Buenos Aires, Argentina.
3. 1er Congreso Nacional de Investigaciones Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
4. III Simposio Internacional de Cultura Ambiental y Desarrollo Sostenible, UAZ. **Valor Curricular: 60 horas**
5. III Congreso Interdisciplinario de Posgrados IPICYT, San Luis Potosí.
6. II Simposio Nacional de Ciencias Químico-Biológicas, Zacatecas, Zac.
7. IV Congreso Interdisciplinario de Posgrados IPICYT San Luis Potosí.
8. XXIII Congreso Latinoamericano De Parasitología, Salvador, Bahía, Brasil.

ARTÍCULOS

1. **SUSCEPTIBILIDAD DE *TRICHINELLA SPIRALIS* A VARIOS ANTIHELMÍNTICOS**, Chiapas.academiajournals.com. **ISSN: 1946-5351. Colaborador.**
2. **COMPARACIÓN DE TRATAMIENTO FARMACÉUTICO E INMUNÓGENOS EN TRICHINELLOSIS EN MODELO MURINO**. 2013 Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica www.revistaavft.com **ISSN 0798-0264. Colaborador.**

3. **CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE E HISTOLÓGICA DE RATAS LONG EVANS INFECTADAS CON TRICHINELLA SPIRALIS Y TRATADAS CON ALBENDAZOL E IVERMECTINA.** 2013. Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología. vol. 72 (1): 75-81 **ISSN 0718-8730. Autor principal.**

4. **FÁRMACOS UTILIZADOS EN LA QUIMIOTERAPIA DE LAS HELMINTIASIS.** 2015. Revista Veterinaria Zacatecas. Vol. 4: 7-18 **ISSN 1870-5774. Colaborador.**

Artículos en revisión:

1. Parasitología Latinoamericana: "Evaluación del mecanismo inmunológico de hipersensibilidad retardada por la aplicación del inmunógeno de 45kDa de *Trichinella spiralis* por medio de Intradermorreacción". **Autor principal.**
2. Acta biológica Colombiana: "Immunofluorescence evaluation of anti-*Trichinella spiralis* in sublingual and conventional immunization with the 45 kDa protein". **Autor principal.**

Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad de Buenos Aires
Cátedra de Inmunología

CONICET
U B A

Buenos Aires, 28 de Junio de 2013

PROMEP
Universidad Autónoma de Zacatecas, México

Por medio de la presente certifico que la M. en C. Elsa Gabriela Chávez Guajardo y M. en C. Francisca Chávez Ruvalcaba, alumnas del Doctorado de la UAZ, han realizado una estancia en el Laboratorio de Inmunoparasitología, a mi cargo, perteneciente a la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, IDEHU-CONICET del 17 al 28 de Junio de 2013.

Esta pasantía ha sido realizada en el marco del proyecto de Red (Universidad Autónoma de Zacatecas, Universidad de Buenos Aires y la Universidad Autónoma de Nuevo León): *Fortalecimiento de la Formación de Recursos Humanos de Posgrado*, a través de proyectos de investigación con el fin de fortalecer los conocimientos de los cuerpos académicos para el *estudio de diagnóstico de trichinellosis* comparando material biológico y metodologías, concurrencia a un seminario del Instituto IDEHU-CONICET relacionado con un tema de investigación (1 hora) y a otro de Estudios de la inmunidad celular (4horas) desarrollados para los alumnos del último cuatrimestre de la carrera e Farmacia y Bioquímica de la UBA, asignatura Parasitología Superior de la orientación Microbiología-Inmunología.

Atentamente,

Prof. Dra. Stella M. Venturiello
Profesor Adjunto
Investigador CONICET

Prof. Dr. E. Poskus
Prof Titular
Director Instituto
IDEHU-CONICET

Prof. E. Malchiodi
Prof titular
Vice-Director Instituto

Fundación **Wiener lab.**

Al Servicio de la Bioquímica por la Salud del Hombre

Certificamos por la presente que el alumno:

Francisca Chávez Ruvalcaba

ha completado y aprobado el curso

Tópicos de Parasitología: Parásitos del Tracto Gastrointestinal Humano

Desarrollado entre el 1 de Agosto y el 10 de Septiembre de 2015, en la modalidad A Distancia, con Evaluación Final y los siguientes contenidos:

- Generalidades. Asociaciones biológicas. Elementos de las parasitosis. El parásito. El hospedero. El medio ambiente. Ficha epidemiológica.
- Características Generales de las Enteroparasitosis. Mecanismos de transmisión. Acción patógena de los parásitos. Clasificación clínica de las parasitosis. Patología de las enteroparasitosis. Sintomatología.
- Elementos no parasitarios. Diagnóstico de laboratorio de las parasitosis. Recolección de heces con conservantes. Técnicas de concentración. Métodos de diagnóstico. Coloraciones.
- Taxonomía de protozoos y helmintos. Frecuencia de enteroparasitosis. Descripción de los parásitos intestinales. Protozoos y Helmintos intestinales. Control y Prevención.

Calificación del curso: 74,17 puntos. (para una escala de 0 a 100)

Horas acreditadas: 60

18 de Septiembre de 2015

Dra. Hortencia Maria Magaró
Docente

Dra. Lidia Morisoli
Presidente
Comité Científico

bUqjCdfkHJ

Fundación **Wiener lab.**

Al Servicio de la Bioquímica por la Salud del Hombre

Certificamos por la presente que el alumno:

Francisca Chávez Ruvalcaba

ha completado y aprobado el curso

Enfermedades Parasitarias Transmitidas por Alimentos

Desarrollado entre el 1 de Octubre y el 10 de Noviembre de 2015, en la modalidad A Distancia, con Evaluación Final y los siguientes contenidos:

- La cadena alimentaria como riesgo para la Salud Pública.
- Contaminación de los alimentos.
- Características generales de las enfermedades de transmisión alimentaria.
- Sintomatología de las parasitosis alimentarias.
- Parasitosis de significación alimentaría.
- Parásitos intestinales (vistos en el curso anterior).
- Protozoos y Helmintos Cestodos adquiridos por alimentos: Toxoplasmosis, Hidatidosis, Fasciolosis.
- Helmintos Trematodos y Nematodos adquiridos por alimentos: Triquinosis, Toxocariosis, Anisakiosis.
- Control y Prevención.

18 de Noviembre de 2015

Calificación del curso: 95,24 puntos. (para una escala de 0 a 100)

Horas acreditadas: 80

Dra. Hortencia Maria Magaró
Docente

Dra. Lidia Morisoli
Presidente
Comité Científico

d9OU3je7H5

Universidad Autónoma de Zacatecas
"Francisco García Salinas"
Coordinación Vinculación

Otorga el presente

Reconocimiento

A:Francisca Chávez Ruvalcaba.

En virtud de haber Impartido el Diplomado en:

"CULTURA AMBIENTAL Y DESARROLLO SOSTENIBLE"

Realizado del 21 de marzo al 4 de julio 2014.
Con una duración de 40 horas teórico-prácticas y valor curricular de 5 créditos.
Zacatecas, Zac.

M. en C. Ángel Román Gutiérrez.
Coordinador de Vinculación de la U.A.Z.

Dr. en C. Sergio Hugo Sánchez Rodríguez.
Director de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas.
UAZ.

Dra. en C. María Alejandra Moreno G.
Coordinadora del Diplomado CA.BC y M. UAZ.

UBA
Universidad de Buenos Aires

CUERPO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MICROBIOLOGÍA

Consorcio de Universidades Mexicanas

LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS

A través del

Proyecto de RED: UAZ-UBA-UANL. Apoyado por PROMEP

el Cuerpo Académico de Biología Celular y Microbiología

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A la *M. en C. Francisca Chávez Rendeda*

Por su participación como **ponente** en el **"Primer Simposio Internacional de Trichinellosis"**

Zacatecas, México del 15 al 20 de abril 2013

M. en C. Francisco Javier Domínguez Garay
Coordinador General de Planeación de la UAZ

Dra. en C. Stella Venturiello
Universidad de Buenos Aires

Dra. en C. María Alejandra Moreno García
Iniciadora del Cuerpo Académico de Biología Celular y Microbiología

opus pro scientia et studium

Congreso Internacional de Investigación de
ACADEMIA JOURNALS
[redacted]

CHIAPAS 2013

Certificado

Otorgado a

DRA. MARÍA ISABEL CHÁVEZ RUVALCABA, MC. FRANCISCA CHÁVEZ RUVALCABA, MC. JOSÉ JESÚS MUÑOZ ESCOBEDO, DRA. MARÍA ALEJANDRA MORENO GARCÍA.

por su ponencia intitulada

Susceptibilidad de Trichinella spiralis a varios antihelmínticos

que fue presentada en el Congreso Internacional de Academia Journals Chiapas 2013
que se desarrolló los días 4 al 6 de septiembre de 2013
en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, y publicada en el portal de Internet
Chiapas.AcademiaJournals.com con **ISSN 1946-5351** Online y **1948-2353** CD ROM

Sabino Velázquez Trujillo
Presidente de la Comisión Organizadora
Profesor de Ingeniería Industrial
Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

Dr. Rafael Moras
Presidente del Comité de Programa del Congreso
Editor, AcademiaJournals.com
Profesor, St. Mary´s University, San Antonio, TX, EEUU

Guayaquil, 9 de Octubre del 2013

Doctor/a
Isabel Chávez
.....

CERTIFICADO

Distinguido/a Exponente/s:

Por la presente me permito hacerle conocer que el COMITÉ CIENTIFICO (CC) del **XXI CONGRESO LATINOAMERICANO DE PARASITOLOGIA FLAP 2013** realizándose en la ciudad de Guayaquil – Ecuador del 6 al 9 de Octubre del 2013, certifica su presentación del siguiente tema:

PRESENTACIÓN DE SU TEMA LIBRE EN LA FLAP 2013

MODALIDAD	TEMA
Trabajos Libres Orales	Análisis serológico e histopatológico en murinos infectados con Trichinella spiralis y tratados con diferentes dosis de albendazol y sulfóxido de albendazol.
	Autores: María Chávez, José Garay, Francisco Chávez, José Muñoz, María Moreno.

Agradeciéndole su participación en nuestro le reitero mis sentimientos de alta consideración y estima.

Congreso Latinoamericano de Parasitología FLAP Federación Latinoamericana de Parasitología 2013 ECUADOR

Atentamente.

Dr. Edgar Montalvo Mendoza
PRESIDENTE DE LA FEDERACIÓN LATINOAMERICANO DE PARASITOLOGÍA
FLAP 2013

Dirección: Azuay 709 y Lorenzo de Garaycoa. Telf: 2338229- 2337582- 2337984- Fax: 2343090
Celular: 593-985215901 - Email: flap2013@hotmail.com - dre_montalvo@yahoo.es - organizacion@flap2013.com
www.flap2013.com – www.congresoflap2013.blogspot.com

Cuerpo Académico de Biología Celular y Microbiología C-103

UAZ UACB-UAO

Consorcio de Universidades Mexicanas

OTORGA LA PRESENTE
CONSTANCIA A:

Chávez Ruvalcaba F., Barrón González P., Chávez Ruvalcaba I., Muñoz Escobedo J., Moreno García A.

Por su Participación con su Trabajo Libre: ***Protocolo para el Manejo de Animales de Experimentación con Tratamiento con Inmunógenos en Trichinellosis***, en el II Simposio Internacional de Cultura Ambiental y Desarrollo Sostenible, los días 8, 9 y 10 de Octubre 2014.

I.Q. Armando Silva Chairez
Rector
Universidad Autónoma de Zacatecas

Dr. en C. Sergio Hugo Sánchez Rodríguez
Director de la Unidad de Cs. Biológicas
Universidad Autónoma de Zacatecas

Dra. en C. Alejandra Moreno G.
Líder del Cuerpo Académico de Biología Celular y Microbiología. C-103. UAZ

EL DOCTORADO EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA MÉDICA Y MOLECULAR, DE LA UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD DE LA U.A.Z.

Otorga la presente

CONSTANCIA

a

M. en C. Francisca Chávez Ruvalcaba

Por su Participación como Ponente en el Seminario:

"Comparación del efecto protector de un inmunogeno administrado por dos vías en una parasitosis en modelo murino"

Actividad realizada conjuntamente por los cuerpos académicos:
UAZ-CA-036 Vigilancia Epidemiológicas en el Grupo Social Familia
UAZ-CA-175 Farmacología en Biomedicina Molecular
UAZ-CA-183 Biomedicina Experimental

Zacatecas, Zac., 20 de abril del 2016.

Dr. Genaro Ortega Monjarás
Director
Unidad Académica de Medicina Human y CS

SOCIEDAD MEXICANA DE INMUNOLOGIA

Otorga el presente

CONSTANCIA

a

Francisca Chávez Ruvalcaba

Por la presentación del trabajo

«Resiniferatoxina disminuye los mediadores proinflamatorios TNF-α, NO y PGE2 en fase intestinal, así como la carga parasitaria en fase muscular de la infección por *T. spiralis*.«

En el XXII Congreso Nacional de Inmunología, celebrado del 19 al 23 de abril en Zacatecas de 2016

Dr. Constantino III Roberto López Macías
PRESIDENTE SMI (2014-16)

Dra. Laura Bonifaz Alfonzo
SECRETARIA-TESORERA SMI (2014-16)

La Unidad Académica de Medicina Humana y C. S.

de la

Universidad Autónoma de Zacatecas

"Francisco García Salinas"

otorga la presente

Constancia

a *Francisca Chávez Ruvalcaba*

Por su participación como Ponente y Autor del Trabajo en Cartel

"Caracterización de la respuesta inmunológica e histológica en murinos infectados con TRICHINELLASPIRALIS y tratados con albendazol e ivermectina"

Presentado en la **Sesión** de **Trabajos en Cartel** durante las

XXV Jornadas Médicas

"Juan Manuel Gallardo Hernández"

realizadas del 13 al 15 de marzo de 2013.

Atentamente

"El Hombre por el Hombre"

Dr. Genaro Ortega Monjarás

Director

Dr. José Luis Alvarado Acosta

Coordinador del Comité Científico

1968-2013

El Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

Francisca Chávez Ruvalcaba

Por haber participado con el CARTEL

UTILIZACIÓN DEL INMUNÓGENO DE 45 KDA Y ANTIGENO SOLUBLE TOTAL DE TRICHINELLA SPIRALIS PARA EL DIAGNÓSTICO DE TRICHINELLOSIS POR INTRADERMORREACCIÓN

en el

III Congreso Interdisciplinario de Posgrados IPICYT

Dr. David Rios Jara
Director General

CONIP

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico

San Luis Potosí, S.L.P., Septiembre de 2014

SEMANA NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS
"Francisco García Salinas"

CUERPO ACADÉMICO FISIOPATOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR UAZ - 176

COZCyT
Consejo Zacatecano de Ciencia, Tecnología e Innovación

GOBIERNO DEL ESTADO 2010-2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS

"Francisco García Salinas"

CONSEJO ZACATECANO DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN

A través del

CUERPO ACADÉMICO FISIOPATOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR, UAZ 176

OTORGAN LA PRESENTE **CONSTANCIA**

A: **Francisca Chávez Ruvalcaba, María Porfiria Barrón González, María Isabel Chávez Ruvalcaba, José Jesús Muñoz Escobedo, María Alejandra Moreno García.**

POR SU LA PRESENTACIÓN DEL CARTEL:

" ANTIGENO DE 45 kDa de *Trichinella spiralis* COMO INMUNÓGENO Y ANTÍGENO PARA TRATAMIENTO Y DIAGNÓSTICO DE TRICHINELLOSIS"

Dentro del:

II SIMPOSIO NACIONAL DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

15 al 17 de Octubre de 2014, Zacatecas, Zacatecas

I.Q. Armando Silva Chairez
Rector
Universidad Autónoma de Zacatecas

Dr. Sergio Hugo Sánchez Rodríguez
Líder
Cuerpo Académico UAZ-176

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
1803

ACM Asociación Colombiana de Microbiología

ALAM Asociación Latinoamericana de Microbiología

XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología y 4 Congreso Colombiano de Microbiología

CERTIFICAN QUE

Dra. Francisca Chávez Ruvalcaba. , Dra. Marìa Isabel. Chàvez Ruvalcaba. , Dra. Marìa Porfiria Barròn Gonzàlez. , Dra. Marìa Alejandra Moreno García. , Dr. Josè Jesùs Muñoz Escobedo. [1]

PARTICIPARON CON EL TRABAJO TITULADO:

"COMPARACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DEL INMUNÓGENO DE 45 KDA DE TRICHINELLA SPIRALIS ADMINISTRADO POR VÍA SUBLINGUAL Y VÍA CONVENCIONAL EN MURINOS INFECTADOS CON TRICHINELLA SPIRALIS".

EN CATEGORÍA POSTER

Cartagena, Colombia
Noviembre 5 al 8 de 2014

HOWARD JUNCA
Presidente
Asociación Colombiana de Microbiologia y
Asociación Latinoamericana de Microbiología

LILIANA MARCELA OCHOA GALEANO
Directora
Escuela de Microbiología
Universidad de Antioquia

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
1803

ACM Asociación Colombiana de Microbiología

ALAM Asociación Latinoamericana de Microbiología

XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología y 4 Congreso Colombiano de Microbiología

CERTIFICAN QUE

Dra. María Alejandra Moreno García. [1], Dra. Francisca Chàvez Ruvalcaba. , Dra. Zuleika Quiroz Núñez. , Dr. Beatriz Adriana Dorado Bernal. , Dr. José Jesús Muñoz Escobedo. , Dra. Claudia Herminia Maldonado Tapia.

PARTICIPARON CON EL TRABAJO TITULADO:

UTILIDAD Y EFICACIA DE LOS TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS EN TRICHINELLOSIS EN MODELO EXPERIMENTAL.

EN CATEGORÍA POSTER

Cartagena, Colombia
Noviembre 5 al 8 de 2014

HOWARD JUNCA
Presidente
Asociación Colombiana de Microbiologia y
Asociación Latinoamericana de Microbiología

LILIANA MARCELA OCHOA GALEANO
Directora
Escuela de Microbiología
Universidad de Antioquia

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

CICM - ICUAP

OTORGAN LA SIGUIENTE

CONSTANCIA

A: **Francisca Chávez Ruvalcaba, María P. Barrón González, María I. Chávez Ruvalcaba, Jesús Muñoz Escobedo, María A. Moreno García**

Por su valiosa participación con el trabajo de investigación en modalidad de cartel con el tema:

EVALUACIÓN DE CARGA PARASITARIA Y CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN MURINOS INFECTADOS CON *Trichinella spiralis* TRATADOS CON FARMACOS E INMUNÓGENOS

Durante el 1er Congreso Nacional de Investigaciones Microbiológicas, llevado a cabo los días 26 al 28 de Noviembre de 2014 en la Unidad de Seminarios de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México.

(DGEC BUAP-CICM-ICUAP/Cong.-005/14)

D. en C. Jesús F. López Olguín
DIRECTOR DEL ICUAP-BUAP

Dra. Carolina Morán Raya
SECRETARIA ACADÉMICA DEL ICUAP-BUAP

D.C Fabiola Avelino Flores
COORDINADORA DEL CICM -BUAP

D. en C. Ricardo Carreño López
PRESIDENTE DEL COMITÉ
ORGANIZADOR DEL CONGRESO

COZCyT Consejo Zacatecano de Ciencia, Tecnología e Innovación · ZACATECAS Gobierno del Estado · MÉXICO Gobierno de la República · CONACYT 45 años

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, el
Consejo Zacatecano de Ciencia, Tecnología e Innovación

otorgan el presente:

RECONOCIMIENTO

a:

Francisca Chávez Ruvalcaba, María Isabel chávez Ruvalcaba, José Jesús Muñoz Escobedo, Carlos Eduardo Hernández Luna y María Alejandra Moreno García

Por su valiosa participación con

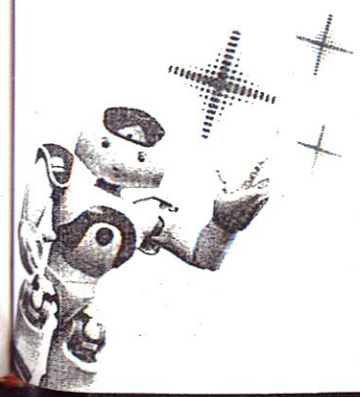
El cartel **"Evaluación de la protección del inmunógeno de 45 kDa de Trichinella spiralis administrado por vía convencional y vía sublingual en la enfermedad causada por Trichinella spiralis"**

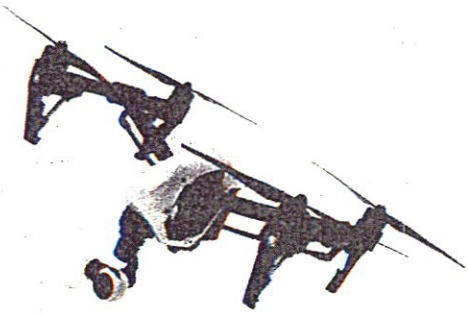
en el marco de la

22ª Semana Nacional de Ciencia y Tecnología

2015 Año Internacional de la Luz y las Tecnologías Basadas en la Luz

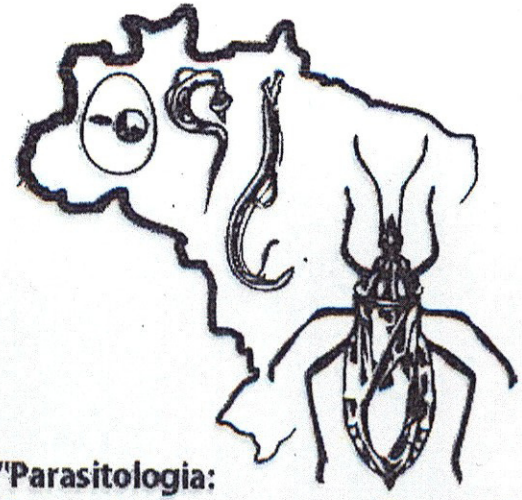
Del 19 al 23 de octubre de 2015





Dra. Gema A. Mercado Sánchez
Directora General del COZCyT

Zacatecas, Zacatecas a 23 de octubre de 2015



"Parasitologia:
Passado, presente e futuro"

27 a 31 de Outubro de 2015
Bahia Othon Palace
Salvador, Bahia, Brasil

REALIZAÇÃO

50 Anos
Sociedade Brasileira de Parasitologia
Federação Latinoamericana de Parasitologia

XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia - SBP
XXIII Congreso Latinoamericano de Parasitología - FLAP

CERTIFICADO

Certificamos que

FRANCISCA CHÁVEZ RUVALCABA

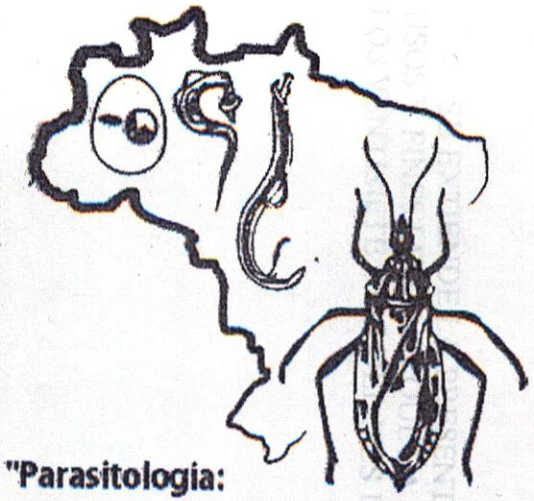
participou do XXIV CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA - SBP e do XXIII CONGRESO LATINOAMERICANO DE PARASITOLOGÍA - FLAP, realizados no Bahia Othon Palace Hotel, Salvador-BA.

na qualidade de autora do trabalho "Cinética de inmunoglobulinas en murinos tratados con el inmunógeno de 45kDa de Trichinella spiralis", apresentado como pôster.

Salvador, 31 de outubro de 2015

Artur Gomes Dias Lima
Presidente do Congresso

Alejandro Luquetti Ostermayer
Presidente da Sociedade Brasileira de Parasitologia (SBP) e da Federação Latinoamericana de Parasitologia (FLAP)



"Parasitologia:
Passado, presente e futuro"

27 a 31 de Outubro de 2015
Bahia Othon Palace
Salvador, Bahia, Brasil

REALIZAÇÃO

50 Anos
Sociedade Brasileira de Parasitologia
Federação Latinoamericana de Parasitologia

XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia - SBP
XXIII Congreso Latinoamericano de Parasitología - FLAP

CERTIFICADO

Certificamos que

FRANCISCA CHÁVEZ RUVALCABA

participou do XXIV CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA - SBP e do XXIII CONGRESO LATINOAMERICANO DE PARASITOLOGÍA - FLAP, realizados no Bahia Othon Palace Hotel, Salvador-BA.

na qualidade de autora do trabalho "Evaluación de las modificaciones de Trichinella spiralis en murinos tratados con el inmunógeno de 45kDa", apresentado como pôster.

Salvador, 31 de outubro de 2015

Artur Gomes Dias Lima
Presidente do Congresso

Alejandro Luquetti Ostermayer
Presidente da Sociedade Brasileira de Parasitologia (SBP) e da Federação Latinoamericana de Parasitologia (FLAP)

A QUIEN CORRESPONDA

LA QUE SUSCRIBE **Q.F.B. MARÍA MAGDALENA PARGA CASTRO,** RESPONSABLE DEL PROGRAMA ACADÉMICO DE QUÍMICO FARMÁCEUTICO BIÓLOGO, DE LA UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS, DEPENDIENTE DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS "FRANCISCO GARCIA SALINAS"

HACE CONSTAR:

QUE EL ALUMNO: **JAIME CASTAÑEDA CABRAL,** REALIZADO SU TRABAJO DE TESIS EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MICROBIOLOGÍA, EN LA UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS CON EL TEMA: **"UTILIDAD DE LA INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA EN LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS PROTECTORES PRODUCIDOS EN MODELO MURINO INMUNIZADOS POR VIA ORAL CON EL INMUNOGENO DE *Trichinella spiralis*"** FUNGE COMO DIRECTORA DE TESIS, **LA M. en C. FRANCISCA CHÁVEZ RUVALCABA.** DE LA LICENCIATURA DE QUÍMICO FARMÁCEUTICO BIÓLOGO.

SE EXTIENDE LA PRESENTE A SOLICITUD DEL INTERESADO, PARA LOS USOS Y FINES LEGALES QUE LA REQUIERA EN LA CIUDAD DE ZACATECAS, A LOS VENTISIETE DIAS DEL MES DE ABRIL DEL DOS MIL DIECISEIS.

Unidad Académica
Ciencias Químicas

PROGRAMA ACADÉMICO
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS

"Francisco García Salinas"

ÁREA CIENCAS DE LA SALUD
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS

QUÍMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

ENSAYO Y EVALUACIÓN EN MODELO EXPERIMENTAL MURINO DE CICLOS BIOLÓGICOS DE TRES PARASITOS ZOONÓTICOS

Para Obtener el Titulo de:

Químico Farmaceutico Biólogo

PRESENTA: C. Juan Luis García Reveles

ASESORA INTERNA: Dra. en C. María Isabel Chávez Ruvalcaba

ASESORA EXTERNA: M. en C. Francisca Chávez Ruvalcaba

ZACATECAS, ZAC., ABRIL DE 2016

M. EN C. FRANCISCA CHÁVEZ RUVALCABA
P R E S E N T E

Por este conducto le informo que ha sido nombrado **VOCAL** del jurado de Examen Profesional de (el) (la) **C. JUAN LUIS GARCÍA REVELES,** para obtener el Título de: **QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO** mediante el mecanismo de titulación por **TESIS Q.F.B.,** cuyo examen se llevará a cabo el próximo 25 de mayo del presente año, a las 10:00 a.m. en la sala de maestros del edificio E-5 del **CAMPUS UNIVERSITARIO SIGLO XXI**, debido a ello le pedimos su puntual asistencia.

Sin otro particular, me despido de Usted no sin antes enviarle un saludo cordial.

A t e n t a m e n t e
Zacatecas, Zacatecas., a 17 de mayo de 2016

P. A.

Q.F.B. EDMUNDO ZÚÑIGA CARRILLO
DIRECTOR DE LA UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS

M. EN C. FRANCISCA CHÁVEZ RUVALCABA
PRESENTE.

Por este conducto, me permito informarle que ha sido nombrado(a): REVISOR del trabajo de **"Tesis"** denominada: **"DETERMINACIÓN DE PARÁSITOS EN FELIS SILVESTRIS CATUS POR MEDIO DE TÉCNICAS COPROPARASITOLOGÍAS DIRECTAS"**. *Presentado por las alumnas:* **Patricia Vázquez Cruz y Távata Janeth Serrano Ayala.**

Además le comunico que dispone de diez días hábiles para informar por escrito a esta Unidad Académica, si el mencionado trabajo cumple con los requisitos establecidos por el reglamento de titulación.

Agradezco de antemano su colaboración y esperando su respuesta por escrito, me despido de Ud. Enviándole un afectuoso saludo.

ATENTAMENTE
Zacatecas, Zac., a 12 de mayo del 2016

Q.F.B. EDMUNDO ZÚÑIGA CARRILLO
DIRECTOR DE LA UNIDAD ACADÉMICA
DE CIENCIAS QUÍMICAS

Unidad Académica
Ciencias Químicas

PROGRAMA ACADÉMICO
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

UBA
Universidad de Buenos Aires

CUERPO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MICROBIOLOGÍA

Consorcio de Universidades Mexicanas

LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS

A través del

Proyecto de RED: UAZ-UBA-UANL. Apoyado por PROMEP

el Cuerpo Académico de Biología Celular y Microbiología

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A la *M. en C. Francisca Chávez Rivalcoba*

Por su participación como **asistente** al **"Primer Simposio Internacional de Trichinellosis"**

Zacatecas, México del 15 al 20 de abril 2013

M. en C. Francisco Javier Domínguez Garay
Coordinador General de Planeación de la UAZ

Dra. en C. Stella Venturiello
Universidad de Buenos Aires

Dra. en C. María Alejandra Moreno García
Iniciadora del Cuerpo Académico de Biología Celular y Microbiología

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica

IDEHU
CONICET
U B A

Se deja constancia que la alumna de Doctorado, M. en C. **Francisca Chávez Ruvalcaba** ha asistido al Seminario del Departamento de Microbiología, Inmunología y Biotecnología titulado "Mecanismos implicados en la fibrosis hepática desencadenada por la infección por *Brucella Abortus*". Dichos Seminarios son realizados una vez por semana durante los períodos lectivos. Su duración es de una hora y concurren al mismo los miembros del Departamento y del IDEHU (CONICET-UBA). Son realizados por Becarios, Docentes e Investigadores del Departamento e Instituto, así como por invitados especiales del país y del exterior.

Se extiende el presente certificado que así lo acredita.

Buenos Aires, 28 de junio de 2013.-

Dra. Andrea CANELLADA

Coordinadora de Seminarios

DRA. ANDREA CANELLADA
PROFESORA ADJUNTA
INMUNOLOGIA

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

CICM - ICUAP

OTORGAN LA SIGUIENTE

CONSTANCIA

A: **CHÁVEZ RUVALCABA FRANCISCA**

Por su valiosa participación como asistente al 1er Congreso Nacional de Investigaciones Microbiológicas, llevado a cabo los días 26 al 28 de Noviembre de 2014 en la Unidad de Seminarios de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla. México.

Valor Curricular: 20 horas (DGEC BUAP-CICM-ICUAP/Cong.-005/14)

D. en C. Jesús F. López Olguín
DIRECTOR DEL ICUAP-BUAP

Dra. Carolina Morán Raya
SECRETARIA ACADÉMICA DEL ICUAP-BUAP

D.C Fabiola Avelino Flores
COORDINADORA DEL CICM -BUAP

D. en C. Ricardo Carreño López
PRESIDENTE DEL COMITÉ
ORGANIZADOR DEL CONGRESO

Cuerpo Académico de Biología Celular y Microbiología C-103

UAZ UACB UAO

Consorcio de Universidades Mexicanas

OTORGA LA PRESENTE
CONSTANCIA A:

Francisca Chávez Ruvalcaba

Por su Asistencia y Apoyo en la Organización en el III Simposio Internacional de Cultura Ambiental y Desarrollo Sostenible, del 6- 8 de Octubre 2015.

I.Q. Armando Silva Chávez
Rector
Universidad Autónoma de Zacatecas

Dr. en C. Sergio Hugo Sánchez Rodríguez
Director de la Unidad de Cs. Biológicas
Universidad Autónoma de Zacatecas

Dra. en C. Alejandra Moreno G.
Líder del Cuerpo Académico de Biología Celular y Microbiología. C-103. UAZ

El Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

FRANCISCA CHÁVEZ RUVALCABA

Por haber asistido al

III Congreso Interdisciplinario de Posgrados IPICYT

los días 24, 25 y 26 de Septiembre de 2014.

Dr. David Ríos Jara
Director General

CONIP

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico

San Luis Potosí, S.L.P., Septiembre de 2014

SEMANA NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS "FRANCISCO GARCÍA SALINAS"

CUERPO ACADÉMICO FISIOPATOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR UAZ - 176

COZCyT Consejo Zacatecano de Ciencia, Tecnología e Innovación

GOBIERNO DEL ESTADO 2010-2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS

"Francisco García Salinas"

CONSEJO ZACATECANO DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN

A través del

CUERPO ACADÉMICO FISIOPATOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR, UAZ 176

OTORGAN LA PRESENTE **CONSTANCIA**

A: **Francisca Chavez Ruvalcaba**

POR SU ASISTENCIA AL:

II SIMPOSIO NACIONAL DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

15 al 17 de Octubre de 2014, Zacatecas, Zacatecas

15 horas de valor curricular

I.Q. Armando Silva Chairez
Rector
Universidad Autónoma de Zacatecas

Dr. Sergio Hugo Sánchez Rodríguez
Líder
Cuerpo Académico UAZ-176

IPICYT

IPICYT Posgrado

CONIP

El comité organizador del
IV Congreso Interdisciplinario de Posgrados (CONIP) y el
Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. (IPICYT)

Otorga la presente

CONSTANCIA

A: **Francisca Chávez Ruvalcaba**

Por su participación

Como Asistente

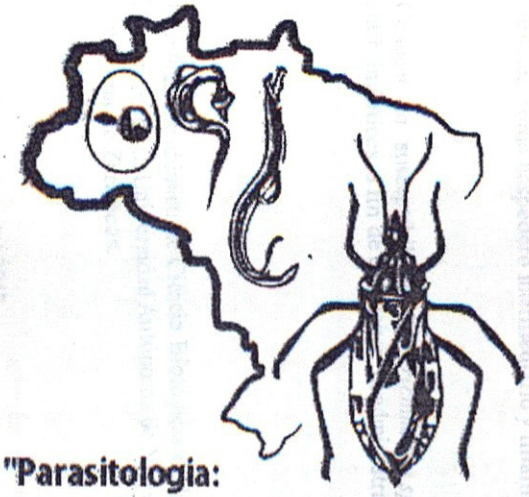
en el

IV CONGRESO INTERDISCIPLINARIO DE POSGRADOS IPICYT

Realizado del 30 de Septiembre al 2 de Octubre de 2015
en las instalaciones del IPICYT,
San Luis Potosí, SLP.

Dr. David Ríos Jara
Director General

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



"Parasitologia:
Passado, presente e futuro"

27 a 31 de Outubro de 2015
Bahia Othon Palace
Salvador, Bahia, Brasil

REALIZAÇÃO

50 Anos
Sociedade Brasileira de Parasitologia
Federação Latinoamericana de Parasitologia

XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia - SBP
XXIII Congreso Latinoamericano de Parasitología - FLAP

CERTIFICADO

Certificamos que

FRANCISCA CHÁVEZ RUVALCABA

participou do XXIV CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA - SBP e do XXIII CONGRESO LATINOAMERICANO DE PARASITOLOGÍA - FLAP, realizados no Bahia Othon Palace Hotel, Salvador-BA.

Salvador, 31 de outubro de 2015

Artur Gomes Dias Lima
Presidente do Congresso

Alejandro Luquetti Ostermayer
Presidente da Sociedade Brasileira de Parasitologia (SBP) e da Federação Latinoamericana de Parasitologia (FLAP)

ISSN: 1946-5351 ONLINE, 1948-2353 CD ROM
Vol. 5 No. 3

Susceptibilidad de de *Trichinella spiralis* a varios antihelmínticos

Dra. María Isabel Chávez Ruvalcaba [1, 3], MC. Francisca Chávez Ruvalcaba[2], MC. José Jesús Muñoz Escobedo[3], Dra. María Alejandra Moreno García[1].

Resumen

La Trichinellosis se trasmite al consumir carne infectada deficientemente cocida. El objetivo del siguiente estudio es conocer la susceptibilidad de *Trichinella spiralis* implantada en musculo de ratas Long Evans, a varios antihelmínticos a fin de establecer la administración más adecuada, en pautas simples o múltiples. El grupo experimental fueron 60 ratas formando 6 grupos, control sano, control infectado y 4 con fármaco. Al día 40 pos-infección se sacrificaron, se realizarón2 técnicas directas de compresión-tejido y digestión-artificial, se administraron los siguientes fármacos: 14 dosis de albendazol, 1 dosis de ivermectina y 1 dosis de sulfoxido de albendazol, 1 dosis de pamoato de pirantel con pamoato de oxantel. Se obtuvo suero para microinmunodifusión simple y se realizo tinción con azul tripan para observar la viabilidad del parasito. El análisis estadístico arrojo un resultado significativo con un p valué <0.05, con un 95% de nivel confianza.

Palabras clave: *Trichinella spiralis*, susceptibilidad, antihelmínticos.

Introducción

La trichinellosis es una zoonosis endémica en el estado de Zacatecas, según lo reportado por varios autores (, es de distribución mundial, causada por un nematodo del género *Trichinella* y especie *spiralis*. éste nematodo es de tipo autoheteroxeno (Caracostantogolo *et al.* 2009).

Trichinella spiralis es un parásito cosmopolita que infecta a mamíferos susceptibles y se trasmite al hombre cuando consume carne infectada deficientemente cocida regularmente de cerdo, es endémica en el estado de Zacatecas, en siete de los 56 municipios de Zacatecas han reportado casos (Fragoso *et. al.*, 1983; Del Río y Herrera, 1984; Villicaña *et. al.*, 1984; Cabral *et. al.*, 1988; Cabral *et. al.*, 1990; Carrada, 1992; Contreras y Herrera, 1992; y Berumen *et. al.*, 2002)). Es transmitida al hombre principalmente al consumir carne infestada de cerdo cruda o insuficientemente cocida. Hasta el momento los bencimidazoles son los fármacos que mayor acción antiparasitaria han presentado. Con el estudio de fármacos que actúen de manera adecuada en fase muscular, la investigación contribuye a tratar erradicar la enfermedad y por tanto a evitar la transmisión al humano. Se han realizado estudios con algunos fármacos antihelmínticos donde se han obtenido buenos resultados. En un trabajo realizado por Chávez en 2007, se mostró la diferencia de respuesta de ratas y cerdos al tratamiento con este albendazol, exhibiendo que en cerdo es 100% efectiva la dosis de 15 mg/Kg/día/14 días en fase muscular, mientras que en la rata presentó disminución de la carga parasitaria y efectos tóxicos evidentes. Por tanto se hizo patente la necesidad de realizar un estudio para observar la efectividad de los fármacos alternativos a diferentes dosis, para probar la efectividad de estos contra la Trichinellosis en fase muscular.

Se desconoce a ciencia cierta el tratamiento efectivo para esta parasitosis en fase muscular en ratas. Si los fármacos actuaran de manera adecuada en la fase muscular en la rata podría cortarse el ciclo vital de la parasitosis ya que esta participa como hospedero intermediario y finalmente a erradicar esta parasitosis que afecta al hombre.

Objetivo general

Conocer la susceptibilidad de *Trichinella spiralis* implantada en musculo de ratas Long Evans, a varios antihelmínticos a fin de establecer la administración más adecuada, en pautas simples o múltiples.

1-Unidad Académica de Ciencia Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas. 2- Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. 3-Unidad Académica de Odontología de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

Copyright 2013 Academia Journals

ISSN: 1946-5351 ONLINE, 1948-2353 CD ROM Vol. 5 No. 3

Con los objetivos particulares de estudiar el observar la susceptibilidad del parásito a los siguientes fármacos, de 14 dosis de Albendazol (ABZ) (7.5 mg/kg/24h/14 días), 1 dosis de Ivermectina IVM (200µg/ml/kg), 1 dosis de Sulfóxido de Albendazol(SOABZ) (2.5 mg/kg), y una dosis de Pamoato de pirantel y pamoato de oxantel (PP Y PO) (10mg/kg/)una dosis, en ratas infectadas con 500 LI, determinar la carga parasitaria de LI de *T. spiralis* en músculo en murinos controles y tratados, evaluar comparativamente el efecto mediante las técnicas de compresión de tejido, de digestión artificial y evaluar la viabilidad de las LI y cambio morfológico de *T. spiralis* en los tejidos infectados y tratados por medio de la tinción con azul tripano.

Metodología

El estudio se realizo en el Laboratorio de Biología celular y microbiología de la Unidad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

El modelo experimental que fue usado en este estudio, consistió en 60 ratas (machos) de la cepa Long Evans de 250 ± 20gr de peso, infectados con *T. spiralis*, en dosis de 500 LI para cada animal, se formaron 6 grupos cada grupo conformado por 5 animales, 1 control sano, 1 control infectado y 4 con fármaco. Se infectaron y al día 30 pos-infección se les aplico el fármaco, al día 60 pos-infección se sacrificaron. Se realizaron 2 técnicas directas de compresión de tejido y digestión artificial en las cuales se realizo conteo de larvas infectantes.

Los fármacos administrados fueron los siguientes: 14 dosis de albendazol, 1 dosis de ivermectina y 1 dosis de sulfoxido de albendazol, 1 dosis de pamoato de pirantel con pamoato de oxantel (figura No. 1). Se obtuvo suero para realizar las técnicas de microinmunodifusión simple y se realizo tinción con azul tripan para observar la viabilidad del parasito.

Figura No. 1 Cuadro de la metodología utilizada para el tratamiento de murinos infectados con *T. spiralis* y tratados con 4 antiparasitarios.

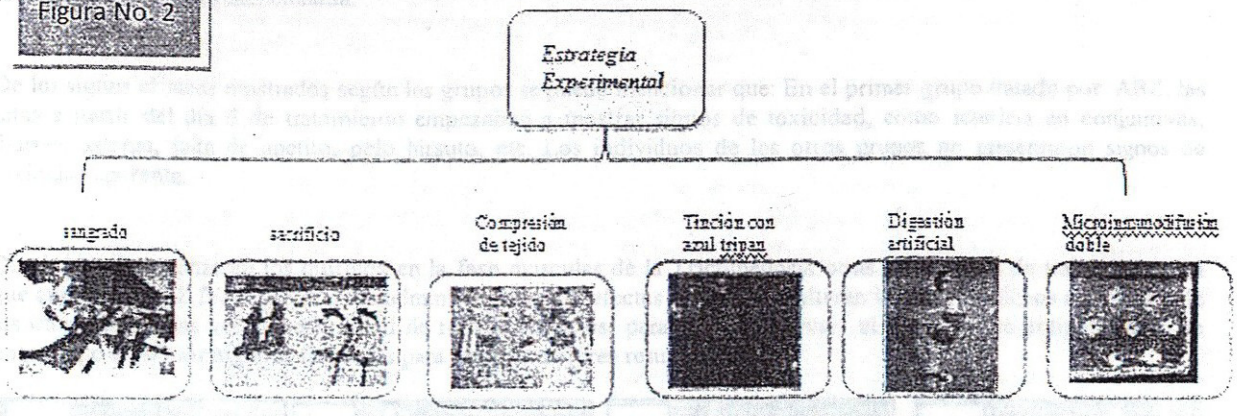
Grupos	Tratamiento	Vía de administración del fármaco	Número de Animales
1	Control sano	-	5
2	Control infectado	-	5
3	ABZ 15 mg/kg/14d	Oral	5
4	IVM 200 µg/kg/1d	Subcutánea	5
5	SOABZ 2.5/kg/1 d	Intramuscular	5
6	P.P. y P.O. 10mg/kg/1d	Oral	5

Mmiligramos (mg),microgramos (µg), kilogramos (Kg), unidades (u), días (d), albendazol (ABZ), ivermectina (IVM), sulfoxido de albendazol (SOABZ) y pamoato de pirantel en combinación con pamoato de oxantel (PP Y PO).

A todos los animales se les tomo 3 muestras de sangre para efectuar posteriormente pruebas inmunológicas. Se les realizaron las técnicas directas de compresión de tejido (CT) y digestión artificial (DA), además de tinción con azul tripan y se realizo la técnica de microinmunodifusión doble (figura No. 2).

Copyright 2013 Academia Journals

Figura No. 2



Como se observa en la imagen anterior, Se realizo toma de muestras de sangre, se sacrificaron las ratas, se realizo la técnica de compresión de tejido (se colocaron 3 porciones de tejido de masetero, lengua, diafragma, intercostales y pierna y se contaron 10 campos en cada uno, se promedio en cada musculo de cada rata de cada tratamiento y se obtuvo el dato), con una porción de tejido se sumergieron en un ependorf con aproximadamente 1ml de solución preparada con azul tripan por 3 a 4 horas. Se observaron al microscopio nuevamente y se analizó si el colorante entraba a la LI o no, evidenciado de esta forma si la LI era viable o no (Chávez, 2007). Se realizó digestión artificial (con una solución pepsina mas acido clorhídrico, imitando la digestión se incubo a 37°c por 24 horas y se recupero el paquete larval que se conto). Con las muestras de suero obtenidas de la sangre se realizo la técnica de microinmunodifusión simple para observar la interacción antígeno-anticuerpo y observar así la positividad de los sueros a *Trichinella spiralis*.

El modelo estadístico fue lineal asociado a un diseño experimental completamente al azar, los factores bajo estudio fue: A: tratamiento tuvo 6 niveles (1)-grupo control sano (2)- grupo control infectado, (3)- tratamiento con ABZ y (4)- tratamiento con SOABZ, (5) tratamiento con ivermectina y (6)- tratamiento con P.P. y P.O. y el factor B: Infección, que incluyo a cada grupo experimental con su respectivo tratamiento, resultando 12 tratamientos por ensayar.

Resultados

En este estudio se logró reproducir el ciclo vital del parásito *T. spiralis* en todos los murinos infectados al administrarles 500 LI por animal, con un peso aproximado de 250 ±50gr.

Se estudió el efecto desparasitarte del ABZ, SOABZ, IVM y PPYPO, determinando la carga parasitaria por dos métodos, compresión de tejido (C.T.) y digestión artificial (D.A.) y comparándolos con el grupo control. En compresión de tejido se encontró que el mayor porcentaje de efectividad fueron: 14 dosis de albendazol (83.6%) y se presento toxicidad en las ratas al 6to.día, 1 dosis de ivermectina (66%) y 1 dosis de sulfoxido de albendazol (68.5%), 1 dosis de pamoato de pirantel con pamoato de oxantel (22%) sin signos aparentes tóxicos, En la compresión de tejido se observaron cambios en las larvas y muerte de algunas con los bencimidazoles principalmente.

Los resultados revelan que aumenta la sensibilidad del parasito ante terapias sostenidas aunque se producen efectos tóxicos en las ratas. En la figura No. 3 se puede observar un corte de tejido de rata control infectado, en la figura No. 4 un corte de tejido con una larva negruzca aparentemente muerta con algunas sin cambios en su conformación característica, se observa además en la figura No. 5 un corte de tejido teñido con azul tripan donde sí se puede constatar que la figura negruzca pertenece a una larva muerta, atrás se observa una larva sin cambios aparentes y que no permitió la entrada del colorante, estas imágenes pertenecen a ratas tratadas con ABZ, la figura No. 6 Se puede observar las larvas obtenidas después de la digestión artificial de una rata control infectada. Los tejidos de las ratas

Copyright 2013 Academia Journals

ISSN: 1946-5351 ONLINE, 1948-2353 CD ROM Vol. 5 No. 3

de los demás tratamientos no presentaron cambios aparente significativos, solo disminuyó el no de larvas presentes en la proporción antes mencionada.

De los signos clínicos mostrados según los grupos se puede mencionar que: En el primer grupo tratado por ABZ, las ratas a partir del día 6 de tratamiento empezaban a mostrar signos de toxicidad, como ictericia en conjuntivas, diarrea, astenia, falta de apetito, pelo hirsuto, etc. Los individuos de los otros grupos no presentaron signos de toxicidad aparente.

Queda por determinar en los murinos en la fase muscular de la Trichinellosis otras alternativas de tratamientos ya que aunque el ABZ fue el mejor anti-helmíntico, dejo ver efectos tóxicos que alteran la salud de dichos animales y de las otras posologías ver la posibilidad de repetir las dosis, para poder observar si así el efecto antiparasitario se potencia, o combinar algunos fármacos para obtener mejores resultados.

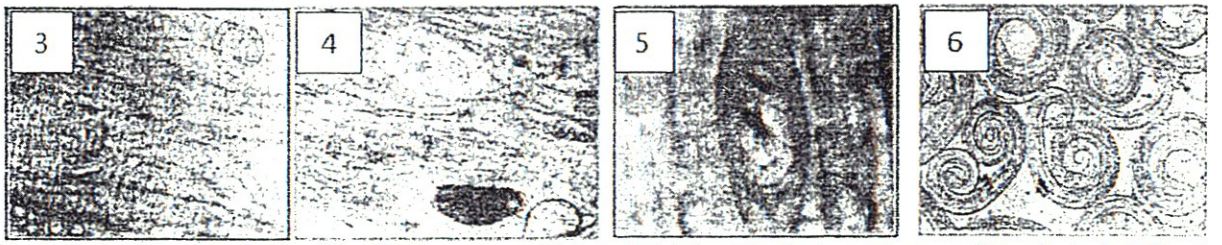
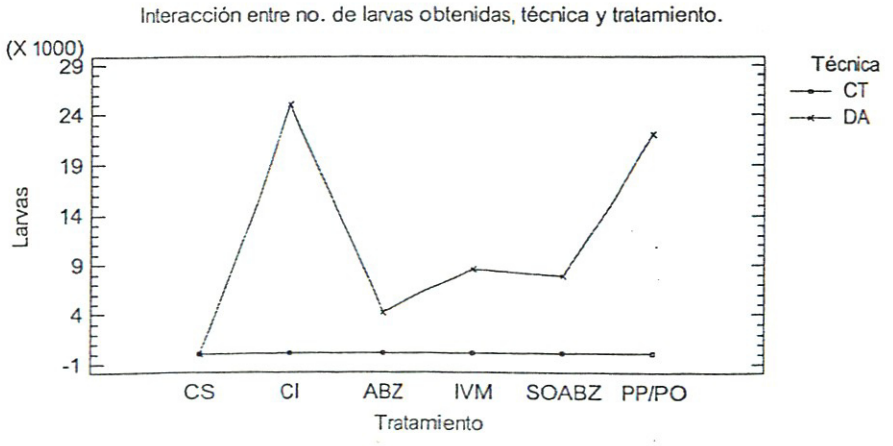


Fig. 3 técnica de compresión de tejido de una rata control infectado objetivo 10x, fig.4 masetero con Tratamiento de ABZ al objetivo 10x, fig. 5 tejido con tinción de azul tripan se puede observar como el colorante difundió hacia adentro de una larva rota y detrás se observa una larva sana en el tratamiento de ABZ 40x, sin colorante, fig. 6 larvas obtenidas de la digestión artificial de una rata control infectado 40x.

La microinmunodifusión simple fue positiva para todos los infectados y con tratamiento, excepto para grupo control sano. El análisis estadístico se observo que tomando como variable dependiente el número de larvas obtenidas de cada tratamiento y los factores técnica y tratamiento, la variable técnica resulta con un p. valué < 0.05, teniendo un efecto estadísticamente significativo sobre larvas con un 95% de nivel de confianza, a continuación se puede observar en la figura No. 7 la grafica relativa al ANOVA.

Figura No. 7. Interacción de factores en el tratamiento de trichinellosis



Copyright 2013 Academia Journals

ISSN: 1946-5351 ONLINE, 1948-2353 CD ROM Vol. 5 No. 3

Como se puede observar en esta grafica la técnica de compresión de tejido no es sencible al analisis estadistico, sin embargo la técniaca de digestión artificial si muestra sencibilidad y se muestra como el grupo tratado con ABZ es el que presento menor número de laravas infectantes en comparación al CI, siguiendo el SOABZ, la IVM y en ultimo lugar con mayor carga parasitaria el grupo tratado con PPYPO.

Conclusiones

En el trabajo realizado en murinos infectados con *T. spiralis* y tratados, obtuvimos como resultado que el ABZ tuvo mejores efectos terapéuticos con las dosis de 7.5 mg/kg en machos al presentar menos cantidad de larvas infectantes presentando algunos efectos tóxicos aparentes, la IVM, el SOABZ y el PP Y PO presentaron menores efectos terapéuticos y sin efectos tóxicos aparentes, sería interesante administrar en 2 o 3 ocasiones los fármaco de una sola dosis para saber si presentaran mejor efecto.

Literatura citada

Berumen de la T. V., Muñoz J.J. y Moreno M. A. Trichinellosis en perros callejeros en la ciudad de Zacatecas, México. Parasitología Latinoamericana. 57 (1-2):72-74. 2002.

Cabral S. J., Villicaña F. H., Fragoso U. R. y Contreras A. 1989. Triquinosis en Zacatecas: Perfil epidemiológico 1978 – 1988, Infecto logia. 9: 627.

Cabral J., Viilicaña H., Fragoso R., Contreras A. Perfil epidemiológico de la triquinosis en el estado de Zacatecas. Salud Publica Mex; 32: 005 pp.575-582. 1990

Caracostantogolo, J., Martínez M., Ruiz M., Morici G., Schapiro J., Castaño R., Cutullé Ch., Balbiani G., Castro M. Epidemiología de la trichinellosis: situación en la Argentina. Area Enf. Parasitarias del Inst. de Patobiología, CICVyA - INTA República Argentina. 2009. www.inta.gov.ar/.../Triquinelosis%20transmision%20experimental%20en%20ratas, *consultado noviembre 2009.*

Chávez R. M. I. Evaluación y comparación de 3 desparasitantes en la infección por *Trichinella spiralis* en fase intestinal y muscular en modelo murino y suino. Tesis de Doctorado. UANL. 2007.

Contreras A. J. y Herrera E. R. Triquinosis porcina en el estado de Zacatecas. Revista Mexicana de Parasitología. 3: 25 – 27. 1992.

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

Fragoso R., Tavizón P. y Villacaña H. Un brote de triquinosis (triquinelosis) en laguna de carretero, Zacatecas. Salud Pública. Méx. XXIII: 24-41. 1981.

Fragoso R., Tavizón P., Villicaña H. Un brote de triquinosis en Laguna del Carretero, Zacatecas. Revista dialogo abierto, UAZ, México 1: 1 – 37. 1983.

Villicaña H., Escobar M., Díaz A. y Díaz G... Nuevos Brotes de Triquinosis en el estado de Zacatecas. Salud Pública de México. 26 (3): 260 – 262. 1984

NOTAS BIBLIOGRAFICAS

Dra. María Isabel Chávez Ruvalcaba es docente-investigador en la Universidad Autónoma de Zacatecas, obtuvo el grado de Doctora en Ciencias en la Facultad Autónoma de Nuevo León con mención honorifica, ha publicado artículos en revistas y capítulos de libro. iasruv9si@yahoo.com.mx

Dra. Mará Alejandra Moreno García, es catedrática en la Universidad Autónoma de Zacatecas, experta en inmunología y parasitología, líder de cuerpo académico y responsable del laboratorio de biología celular y microbiología de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la misma Universidad. amoreno _29@hotmail.com

M C. Francisca Chávez Ruvalcaba, actualmente es docente de la Universidad Autónoma de Zacatecas, ha concluido sus estudios de maestría. ,charuva@hotmail.com

M C. José Jesús Muñoz Escobedo. Docente investigador de la Unidad Académica de Odontología de la Universidad Autónoma de Zacatecas, especialista en técnicas de microbiología. amoreno _29@hotmail.com

Copyright 2013 Academia Journals

AVFT

ARCHIVOS VENEZOLANOS DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

www.revistaavft.com

Editor en Jefe
Dr. Manuel Velasco

Editores Ejecutivos
Dr. César Contreras O.
Dr. Freddy Contreras

Editores Asociados
María A. de la Parte
Anita Stern de Israel
Luigi Cubeddu
Amparo Sosa
Luis Magaldi
Holger Ortiz
Climaco Cano
Marcelo Alfonzo
Yaira Mathison
Marselis Salazar

APARTADO POSTAL
76333, El Marqués
Caracas 1070
Venezuela

ISSN: 0798-0264
RIF: J00183706

Caracas, 22 de octubre de 2012

Estimados doctores:

Elsa Chávez Guajardo, Francisca Chávez Ruvalacaba, José Jesús Muñoz Escobedo, María Isabel Chávez Ruvalcaba, Mario Morales Vallarta, María Porfiria Barrón González, María Alejandra Moreno García

Por medio de la presente nos dirigimos a ustedes con el fin de informarle que su trabajo titulado:

Comparación de tratamiento farmacéutico e inmunógenos en Trichinellosis en modelo murino

Fue aceptado para ser publicado en el Volumen 32, Número 3, 2013.

De usted atentamente,

Dr. Manuel Velasco
Editor en Jefe

Artículo de Original

Caracterización de la respuesta inmune e histológica de ratas Long Evans infectadas con *Trichinella spiralis* y tratadas con albendazol e ivermectina

CHÁVEZ R. F.[1,3], CHAVEZ R. M. I.[1], MUÑOZ E. J. J.[2], REVELES H.R.R.[1], MORALES V. M.[3], y MORENO G. M. A.[1].

[1] Unidad Académica de Ciencias Biológicas, UAZ, México.
[2] Unidad Académica de Odontología, UAZ, México.
[3] Facultad de Ciencias Biológicas UANL, México.

ABSTRACT

The trichinellosis is endemic and zoonotic parasitic disease acquired by consumption of inadequately cooked infected meat. The benzimidazoles are greater antiparasitic drugs that have been presented, the objective is to characterize the immune response and pathological features of mice infected with *Trichinella spiralis* and treated with albendazole and ivermectin, the experimental model consisted of: 120 Long Evans rat strain, healthy control (CS), infected control (IC) and treated with albendazole at doses of 7.5 mg / kg and 15 mg/kg and Ivermectin with one and two doses of 200 µg/kg, muscular digestive phase. We performed tissue compression technique, Artificial Digestion, Microinmunodifusión, Inmunoelectrotransferencia, Intradermorreacción, plus biopsies were obtained were analyzed by hematoxylin-eosin and observed by light microscopy. Significant difference was observed in the treatment with ABZ, showing an effective immune response that continues to recognize the parasite, showing greater efficacy than murine treated with Ivermectin (IVM), stating that the different diagnostic techniques are paramount, appearing in each one, differences between treatments. The statistical analysis in Centurion Stargraphics program yielded highly significant results with a $p < 0.01$ and 95.0% level of confidence.

Key words: Inmune, histology, *Trichinella spiralis*, Albendazole, Ivermectin.

RESUMEN

La trichinellosis es una enfermedad parasitaria endémica y zoonotica, adquirida por consumo de carne infectada deficientemente cocida. Los bencimidazoles son fármacos que mayor acción antiparasitaria han presentado, el objetivo es caracterizar la respuesta inmune e histológica de ratas infectadas con *Trichinella spiralis* y tratadas con Albendazol e Ivermectina, el modelo experimental consistió en: 120 de ratas cepa

Recibido: 14 de Julio de 2013. Aceptado: 26 de Agosto de 2013.
Correspondencia: Francisca Chávez Ruvalcaba. Genaro Codina #265 Fracc: Ramón López Velarde, Guadalupe, Zacatecas, CP. 98600.
E-mail: charuva@hotmail.com

Long Evans, control sano (CS), control infectado (CI) y tratadas con Albendazol a dosis de 7.5 mg/Kg y 15 mg/Kg e Ivermectina con una y dos dosis de 200 µg/kg, en fase digestiva y muscular. Se realizó técnica de Compresión de Tejido, Digestión Artificial, Microinmunodifusión, Inmunoelectrotransferencia, Intradermorreacción, además de que se obtuvieron biopsias que fueron analizadas por medio tinción con hematoxilina-eosina y observadas por medio Microscopia óptica. Se observó diferencia significativa en el tratamiento con ABZ, mostrándose una respuesta inmunitaria eficaz que sigue reconociendo el parásito, mostrándose mayor eficacia que los murinos tratados con Ivermectina (IVM), manifestando que las diferentes técnicas de diagnóstico, son de suma importancia, presentándose en cada una de ellas, diferencias entre los tratamientos. El análisis estadístico realizado en el programa Stargraphics Centurion arrojó resultados altamente significativos con un $p < 0,01$ y nivel del 95,0% de confianza.

Palabras clave: Inmune, histológica, *Trichinella spiralis*, Albendazol, Ivermectina.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias han producido a través de los tiempos más muertes y daño económico a la humanidad que todas las guerras juntas, los países con poco desarrollo socioeconómico son en los que las parasitosis se presentan con mayor frecuencia. Las enfermedades parasitarias son muy importantes ya que actúan como zoonosis y en consecuencia de éstas, el mismo hombre se infesta, por lo cual representa un problema de salud pública. La trichinellosis es una enfermedad parasitaria cosmopolita de distribución mundial causada principalmente por *Trichinella spiralis (T. spiralis)*, afecta a la mayoría de los mamíferos (Moreno *et al,* 2008). Se ha estudiado ampliamente con el fin de conocer la biología del parásito y la reacción inmunitaria del huésped. La infección humana se adquiere por la ingestión de carne de cerdo infectada mal cocida (Medina *et al,* 2007). Ocasiona altas pérdidas económicas de importancia en la porcicultura (Moreno *et al,* 1997).

Los estudios en México sugieren que la parasitosis se distribuye en la zona centro del país, sin embargo la situación actual de la trichinellosis humana no refleja la verdadera situación epidemiológica de la enfermedad parasitaria en México. Permite mantener al parásito muy cerca de la población humana, en forma de infección de los cerdos de traspatio y otros animales como el caballo, que eventualmente y sin control sanitario, puede usarse como carne de consumo. En Zacatecas se reportó el primer brote en 1976, en la década de 2000-2010, se ha detectado en cerdo, rata, perro y humano lo cual nos indica su permanencia como zoonosis endémica en este estado (Berumen *et al,* 2002). Chávez *et al,* (2006) encontró disminución de la carga parasitaria en murinos en fase intestinal y muscular tratados con albendazol. El objetivo del presenta trabajo fue: caracterizar la respuesta inmune e histológica en ratas Long Evans infectadas con *T. spiralis* y tratadas con Albendazol e Ivermectina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 120 murinos (ratas) hembras y machos de la cepa Long Evans de peso de 250 ± 20 g, divididos en cuatro grupos de trabajo:

1. Control sano (con subgrupos de hembras y machos, para fase digestiva y fase muscular).
2. Control infectado (con subgrupos de hembras y machos, para fase digestiva y fase muscular).
3. Infectados y tratados con ivermectina (tratados con una y dos dosis de 200 µg/kg, tanto para fase digestiva como muscular, hembras y machos).
4. E infectados y tratados con albendazol (con dosis de 7,5 y 15 mg/kg para fase digestiva y muscular).

Los murinos fueron pesados y se tomó su talla cada dos semanas, se tomaron muestras sanguíneas, se administro carne infectada con 500 LI, para la fase digestiva pasaron seis días desde el día de la infección, para comenzar los tratamientos de 7,5 mg y 15 mg por kilogramo de peso al día de ABZ y 1 y dos dosis de IVM de 200 µg/kg, se sacrificaron a los seis días de haber terminado tratamientos. Para las fases digestivas se comenzó a dar el tratamiento de ABZ e IVM a los 30 días después de la

infección y se sacrificó a los 28 días de haber terminado el tratamiento. Antes de sacrificar se toma muestra sanguínea y al sacrificar se obtiene porciones de tejido muscular (lengua, masetero, pierna, diafragma e intercostal), para realizar las técnicas de compresión de tejido y digestión artificial, para observar la presencia, cantidad y características del parásito. En fase digestiva se obtiene el intestino delgado de cada rata para recolectar hembras y machos adultos.

Se obtuvo el antígeno soluble total de *T. spiralis* a partir de LI de *T. spiralis,* se determino la cantidad de proteínas para realizar las diferentes pruebas inmunológicas.

Se evaluó la triple respuesta de Lewis, por medio de intradermorreacción, aplicado antígeno de *T. spiralis* en el lomo del animal. Con los sueros problema se realizó la técnica de microinmunodifusión para observar la reacción del complejo Ag-Ac, también se realizó el corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida (EGPA), para después transferirlo en papel de nitrocelulosa y evaluar el patrón de bandeo de cada tira. Se realizó la técnica de hematoxilina-eosina para ver los cambios morfológicos de tejido muscular y ver la afección en las LI por los diferentes tratamientos.

RESULTADOS

En los grupos tratados con Ivermectina en fase digestiva con una y dos dosis, encontramos diferencia entre los grupos de hembras y machos, siendo los machos los que presentaron un mayor aumento de peso, principalmente en el que se le administraron dos dosis de IVM, contrario a las hembras que presentaron un mayor aumento en el grupo al cual se le administró una dosis de IVM. En los grupos tratados con ABZ en fase digestiva se pudo observar que solo el grupo de hembras tratadas con 7,5 mg de ABZ no presentaron diferencia en el aumento de peso (Figura 1). En la técnica de Bolas Fernández se obtuvieron adultos hembras y machos, por medio de la digestión artificial se obtuvieron en promedio 5.600 LI *T. spiralis* de (Figura 2) y compresión de tejido en los grupos tratados con ivermectina y albendazol se observó alteración en la morfología del parásito (Figura 3), mientras que en las Intradermorreacciones hubo una mayor respuesta al antígeno a las 24 h en control infectado y los infectados y tratados con las diferentes dosis y fármacos, presentando sólo negativos en controles sanos y el resto de los grupos positivos, en la inmunoelectrotransferencia se presentó el triplete característico de 42, 45 y 48 kDa en las bandas de los grupos infectados y los tratados (Figura 4).

DISCUSIÓN

Los murinos de control sano, presentan un aumento de tamaño y peso proporcional al que muestran los controles sanos, tanto en hembras como machos, mientras que en las hembras tratadas con

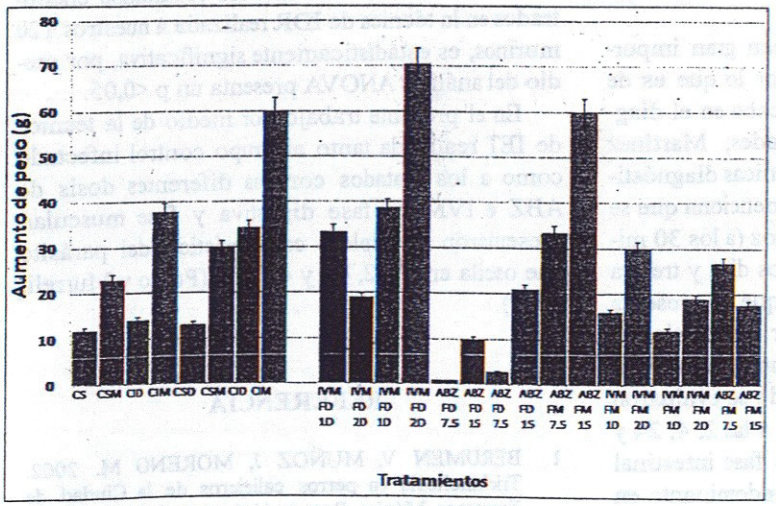


Figura 1. Gráfica de aumento de peso, a lo largo del experimento, de cada uno de los grupos. Las hembras tratadas en fase muscular con una y dos dosis de IVM fueron las que presentaron un mayor aumento de peso, hasta 30 gr más que en los diferentes grupos tratados.

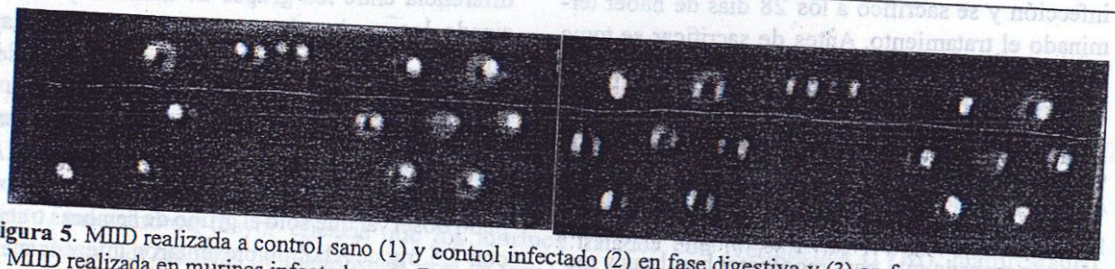


Figura 5. MIID realizada a control sano (1) y control infectado (2) en fase digestiva y (3) en fase muscular y **Figura 6**. MIID realizada en murinos infectados con *T. spiralis* y tratadas Con 1(1) y 2 (2) dosis de IVM en fase digestiva. Por medio de esta técnica inmunológica pudimos observar la interacción antígeno-anticuerpo tanto en controles infectados, como en los infectados y tratados a diferentes dosis.

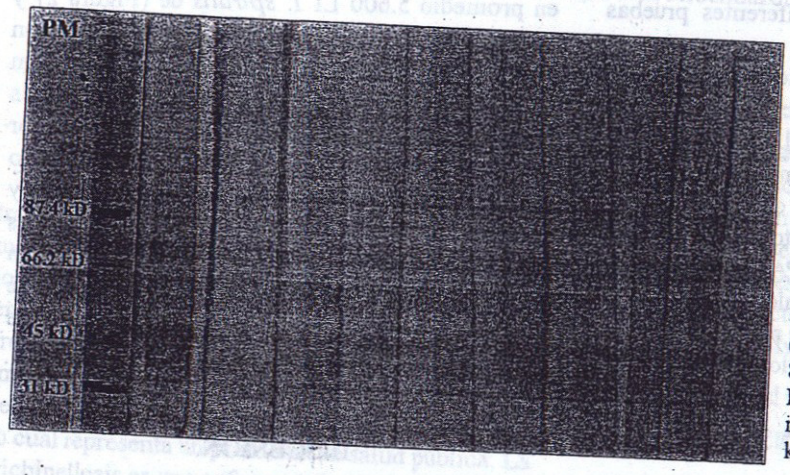


Figura 7. Resultados obtenidos por la técnica de inmunoelectrotransferencia: CI (control infectado), CS (control sano), 1 (tratados con 7,5 mg de ABZ en fase digestiva (FD)), 2 (tratados con 25 mg de ABZ en FD), 3 (tratados con 1 dosis de IVM en FD), 4 (tratados con 2 dosis de IVM en FD), 5 (tratados con 7,5 mg de ABZ en fase muscular (FM)), 6 (tratados con 15 mg de ABZ en FM), 7 (tratados con 1 dosis de IVM en FM), 8 (tratados con 2 dosis de IVM en FM). Se pude observar el triplete característico de *T. spiralis* 42, 45 y 48 kDa en los diferentes grupos.

fases la serología fue positiva en cada una de ellas, así como por el método de compresión de tejido todas mostraron el parásito, pero con aspecto negruzco tanto en la célula nodriza como en la larva, por la técnica de digestión artificial se observó la LI fragmentada y algunas con el contenido interno de la LI desintegrada.

Las intradermorreacciones tienen gran importancia diagnóstica y pronostica, por lo que es de suma importancia que se lleven a cabo en el diagnóstico diferencial de enfermedades; Martínez (1998) menciona que una de las técnicas diagnósticas de la trichinellosis es la IDR y menciona que se distinguen dos reacciones: una precoz (a los 30 minutos), esta se hace positiva entre los diez y treinta días de la infección y una tardía (que se presenta a las 24 h), reconociendo de mayor diagnostico la reacción precoz positiva; en contraste con los analizados en el presente estudio, donde se evaluaron cuatro diferentes momentos, siendo a las 2, 4, 24 y 48 hrs, observamos que tanto en la fase intestinal como en la muscular la reacción predominante en los sueros positivos al parásito, fue a las 24 hrs, sin importar el estado clínico, ni la fase en la que se encontraba el hospedero. Mientras que Rodríguez *et al*, (2008), mencionan que la lectura debe realizarse a las 48 hrs, cuando la reacción inmunitaria es menos marcada que a las 24 h. Nuestro diseño estadístico nos muestra que los resultados encontrados en la técnica de IDR realizada a nuestros 120 murinos, es estadísticamente significativa, por medio del análisis ANOVA presenta un $p < 0,05$.

En el presente trabajo por medio de la técnica de IET realizada tanto al grupo control infectado como a los tratados con las diferentes dosis de ABZ e IVM en fase digestiva y fase muscular, presentaron el triplete característico del parásito que oscila entre 42, 45 y 48 kDa (Pozio y Murrell, 2006).

REFERENCIA

1. BERUMEN V, MUÑOZ J, MORENO M. 2002. Trichinellosis en perros callejeros de la Ciudad de Zacatecas, México. Parasitol latinoamerica (57): 72-74.

2. CHÁVEZ I, REVELES G, SALDIVAR S, MUÑOZ J, MORALES M, MORENO M. 2006. Evaluation of 3 antiparasites on Intestinal and Muscular phase infection of *Trichinella spiralis* in the ping model. Red Vet. (VII). No. 06. México. http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060606.htm
3. CONTRERAS CM, SANDOVAL L, SALINAS P, SAAVEDRA TIRZA, SCHENONE H. 2001. Inmunodiagnóstico de la Triquinosis humana. Bol Chile Parasitol. (57): 3-4.
4. DUPOUY CJ, MURRELL K. D. 2007. Guidelines for the surveillance, management, prevention and control of Trichinellosis. FAO/WHO/OIE
5. MARTÍNEZ R. 1998. Revisión Bibliográfica: Situación de la Triquinosis en Chile. Departamento de Epidemiología. Ministerio de Salud. http://www.chilemedcl/xxi/articulos/feb99/
6. MEDINA L, RAMÍREZ A., PÉREZ T., PACHECO G., RUVALCABA G., GONZÁLEZ A., DE LA ROSA A. Y KUHNE M. 2007. Viabilidad de *Trichinella spiralis* con carne de cerdo expuesta a diferentes condiciones experimentales de conservación. IX Congreso de Ciencia de los Alimentos y V foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos.
7. MORENO A, ÁVALOS E, MUÑOZ J, HERRERA R, 1997. Detección de Antígenos Inmnunodominantes de *Trichinella spiralis* en conejo como modelo experimental, Investigación Científica 9 (1): 5-8.
8. MORENO A, MALDONADO C, REVELES G, GUTIÉRREZ J, MUÑOZ J, 2008, Detección y Permanencia de Anticuerpos anti-*trichinella* en ratas Long Evans productos de madres infectadas con *Trichinella spiralis*, RECVET, (III): 10.
9. POZIO E, MURRELL K. 2006. Systematics and Epidemiology of *Trichinella*. Adv Parasitol. (63): 367-439.
10. RODRÍGUEZ M, LIZÁRRAGA C, JURADO F. 2008. Intradermorreacciones en dermatología. Dermatol Rev. Mex. pp: 160-174.

FÁRMACOS UTILIZADOS EN LA QUIMIOTERAPIA DE LAS HELMINTIASIS

Chávez-Ruvalcaba M.I.[1], Benavides-Haro D.E.[2], Aguilera-Soto J. I.[3] Chávez-Ruvalcaba F.[2], Medina-Flores CA.[3]

[1] Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas (UAZ)
[2] Doctorado en Farmacología de la Unidad Académica de Medicina Humana de la UAZ,
[3] Unidad Académica de Veterinaria y Zootecnia de UAZ.

RESUMEN

Las enfermedades parasitarias representan uno de los principales problemas sanitarios que afectan a los animales y al hombre. Los helmintos forman un numeroso grupo de metazoarios parásitos y de vida libre. El uso de productos químicos es una de las estrategias de control más eficientes que actualmente existen. En el presente trabajo se hace una revisión sobre la farmacodinamia, farmacocinética y efectos adversos sobre los principales fármacos antihelmínticos, particularmente los utilizados contra *Trichinella spiralis*, ya que estudios previos han revelado que este parásito es endémico en Zacatecas, así como también es una enfermedad importante en otras áreas del país y del mundo.

Palabras clave: Helmintiasis, quimioterapia, *Trichinella spiralis*

Vet Zac 2015; 4 (Suppl1): 7-18

INTRODUCCIÓN

Dentro de los problemas sanitarios que afectan al hombre y los animales, las enfermedades parasitarias representan un serio problema ya que aun cuando algunas parasitosis no tienen manifestaciones agudas, pueden repercutir en la salud, afectando la condición corporal, aspecto, desempeño físico, esperanza de vida y la productividad de millones de personas y animales en el mundo. Las parasitosis adquieren especial importancia en animales de compañía al representar éstos una potencial fuente de infecciones al hombre, así como en regiones tropicales y subtropicales con poco desarrollo socioeconómico donde se han observado con una mayor frecuencia.

Existe gran diversidad de parásitos que afectan a los animales y el hombre, los cuales se pueden agrupar en: endoparásitos como los protozoarios, helmintos los que se dividen en trematodos, nematodos y cestodos y los artrópodos que incluyen a los insectos y a los ácaros. Dentro de las parasitosis internas de mayor frecuencia e importancia se encuentran las helmintiasis como la triquinelosis, tocoxariosis, ancilostomiosis, dirofilariosis, entre otras.

Los mecanismos de transmisión de los parásitos son diversos: La ingestión de alimentos y agua así como el suelo y los fómites contaminados con heces son las principales vías de transmisión de parásitos al hombre y los animales.[14]

Una vez que una infección parasitaria se ha producido, lo consecuente es realizar un diagnóstico que permita la identificación del parásito, el diagnóstico correcto es la base para sustentar la toma de decisiones médicas. Derivado de los resultados en el diagnóstico se podrá elegir un tratamiento que controle de forma oportuna y eficiente los parásitos de sus hospedadores.

Los fármacos más utilizados para el control de las helmintiasis son: el mebendazol, albendazol, febendazol, ivermectina, nitazoxanida, bitionol, piperazina, citrato de dietilcarbamazina, niclosamida, prazicuantel, triclorfon y el pamoato de pirantel. El presente trabajo contribuye al conocimiento de dichos fármacos. Se abordan temas como su farmacodinamia, farmacocinética y efectos adversos y su eficacia en el control de diversas helmintiasis principalmente de la triquinelosis (*Trichinella spiralis*).

EFICACIA DE ALGUNOS FÁRMACOS CONTRA HELMINTIASIS

Se han reportado que el albendazol (ABZ) tiene una efectividad contra *T spiralis* en ratones del 71%, mientras que el mebendazol (MBZ) del 67% administrados 72 horas después de la infección.[15] La eficacia antihelmíntica del ABZ y ABZ en conjunto con cyclodextrin (ABZSO2) se incrementa de un 74% (ABZ) a 99% con el ABZSO2 en las formas adultas de *T. spiralis* en ratones infectados.[16]

Se ha reportado que el ABZ y el MBZ actúan contra las formas intestinales de *T. spiralis* que surgen en etapa temprana de la infección.[17] y que que el tratamiento a base de flubendazol (FBZ), es 100% efectivo contra adultos con dosis de 8 mg/kg y 16 mg/kg por 6 y 14 días después de la infección por *T. spiralis*.[18] El FBZ es más efectivo

que el ABZ en la fase adulta de *T. spiralis* en ratones a dosis de 20 mg/kg /día/5 días con una efectividad de ABZ 46% y FBZ 99%.[19] En estudios realizados en Europa, Este de África y Asia el ABZ a dosis única de 400 mg muestran un alto espectro antihelmíntico, apropiado en el control de infecciones causadas por nematodos.[20]

Debido a que el ABZ tiene un mayor grado de absorción intestinal, tiene una mayor acción sobre las larvas enquistadas y se considera el medicamento de elección en la Trichinelosis humana, pero su acción larvicida se ve mejorada al utilizarse con corticosteroides a dosis elevadas, esto para evitar reacciones provocadas por la liberación masiva de antígenos provenientes de las larvas destruidas.[21] La actividad del mebendazol (MBZ) contra la fase de desarrollo de la larva *T. spiralis,* que es efectivo contra larvas (L1 a L4) situadas en el intestino delgado a los 0 a 4 días pos-infección (PI), pero en adultos en intestino delgado (5 a 28 días PI) no es efectivo.[22]

Diversos estudios han mostrado efectividad de la ivermectina (IVM) contra numerosos parásitos que afectan a los animales. Actualmente este fármaco es ampliamente utilizado en humanos sobre todo en el Brasil para el control de la oncosercosis, filariasis, estrongiloidosis, escabiosis, pediculosis y *larva migrans* obteniendo buenos resultados.[23] De igual forma se ha usado la IVM en combinación con el ABZ, en el tratamiento de filariasis linfática en Gana, con una eficacia del 87%.[24] Así como también en terapia profiláctica contra la hidatidosis se ha reportado una eficacia del 96%.[25]

Además, se ha reportado que la lanitazoxanida (NZX) representa un tratamiento alternativo seguro en parasitosis asociadas con protozoarios como amibiasis y helmintos.[26,27] Incluso no se ha reportado toxicidad atribuible a NZX en más de nueve millones de prescripciones en México a partir de 1996.[28] Adicionalmente, la NZX cuenta con una efectividad que oscila entre 85 y 97%, es de amplio espectro, no tóxico de fácil manejo y bajo costo.[29] En contraste, los efectos adversos de la NZX oscilan entre el 6 y 14.5%. Aún no hay ningún estudio que haya evaluado la dosis ideal para cada helminto y para cada protozoario con este fármaco.[30]

Se presentaron los resultados de un estudio donde evaluaron la eficacia y la seguridad de la NZX en el tratamiento de diarrea causada por *Giardia intestinalis* y *Entamoeba histolytica* y *E. Dispar*, los resultados muestra la eficacia de NZX con 3 días de tratamiento, recomendando para giardiasis y amebiasis un tratamiento más largo.[31]

También se ha evaluado y comparado la eficacia de albendazol, ivermectina y nitazoxanida en la infección por *Trichinella spiralis* en fase intestinal y muscular en modelo murino y suino, concluyendo que el ABZ en cerdos en FM fue 100% efectivo, y resultó el fármaco con mayor actividad antiparasitaria en ambos modelos aunque, continuando la NZX y con menor efecto la IVM para el modelo suino, mientras que para el modelo murino se comportó con mayor efecto la IVM que la NXZ.[32]

ALBENDAZOL

El Albendazol es un antihelmíntico de amplio espectro, es un carbamato de benzimidazol (Figura 1) el más nuevo que se ha utilizado a nivel mundial para erradicar diversos helmintos, este es congénere del mebendazol.[17]

Fue descubierto mediante métodos de detección tradicionales; solo recientemente se ha esclarecido su mecanismo,[33] producido por modificación de cadenas laterales del núcleo básico bencimidazol, que caracteriza a los fármacos, cuyo prototipo es el tiabendazol, se describe como polvo blanco amarillento insoluble en agua y soluble en solventes orgánicos (dimetilsulfóxido y ácido acético). La adición del alcohol incrementa su solubilidad.[34]

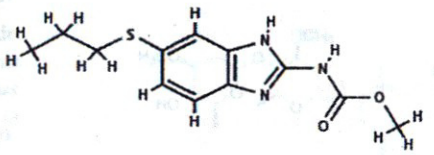


Figura 1. Estructura química del Albendazol.

Farmacodinamia Los benzimidazoles ocasionan muchos cambios bioquímicos en nemátodos sensibles, por ejemplo, inhibición de la fumaratoreductasa en las mitocondrias, disminución del trasporte de glucosa y desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, hay pruebas de peso que demuestran que la acción primaria entraña la inhibición de la polimerización de microtúbulos al unirse a la β-tubulina.[17,35]

El ABZ bloquea la captación de glucosa de los parásitos susceptibles en la etapa larvaria y adulta, abatiendo sus reservas de glucógeno y disminuyendo la formación de trifosfato de adenosina (ATP). Como resultado el parásito se inmoviliza y muere.[33]

Farmacocinética. Su administración es por vía oral a dosis aproximada de 400 mg en dosis única en personas desde los 2 años de edad hasta edad adulta, dependiendo del parásito será la repetición de la dosis. En cerdos se administra por vía oral

pero de forma líquida, es decir, en suspensión.[36] La absorción del ABZ es variable e irregular después de haber sido ingerido, se administra con mejores resultados en el estómago vacío cuando se usa contra parásitos intraluminales; su absorción es mejor si se administra en compañía de alimentos grasosos y posiblemente también por acción de las sales biliares ocasionando que se ejerza efecto contra parásitos tisulares. Es metabolizado rápidamente en el hígado, hasta la forma de sulfóxido de albendazol (es el que mantiene la actividad antihelmíntica) se liga aproximadamente en un 70% a proteínas plasmáticas, su vida media en el plasma es de 8 a 9 horas.[17]

La formación de sulfóxido de albendazol es catalizada por la flavinamono oxigenasa microsómica y en menor magnitud por algunas formas del citocromo P450. Parte del sufóxido es todavía oxidado más hasta generar el metabolito sulfona que es farmacológicamente inactivo. Los metabolitos se excretan principalmente por la orina.[35]

Aunque se absorbe como el mebendazol por tracto gastrointestinal y su actividad antihelmíntica es ejercida principalmente en dicho tracto, llega a alcanzar concentraciones plasmáticas 15-50 veces superiores, y por consiguiente, en el líquido quístico de una hidátide; por esta razón puede ejercer mayor acción letal en hidatidosis[37]. Como fármaco de elección el ABZ está indicado en: *Larva migrans cutanea, Capilaria pilippinensis, Cysticercosis , Echinococcus granulosus* (también como profilaxia antes de la extirpación quirúrgica de quiste hidatídico)[38]. También tiene actividad contra triquinosis (400 mg dos veces al día por una o dos semanas).[35]

No se ha demostrado actividad escoliocida *in vitro* del fármaco ABZ y de su metabolito, el sulfóxido de albendazol utilizado en pacientes con hidatidosis. Se ha mostrado la eficacia de ABZ es de un 75% a dosis de 10 mg/kg/día v.o. durante tres meses, considerando la probabilidad de un 12% de mostrar hepatitis tóxica.[38]

Como fármaco alternativo en: *Ascarislumbricoides, Trichuristrichuria, Necatoramericanus,* combinada*Ascaris y Uncinarias, Oxiurus, Trichinellaspiralis* (añadiendo corticosteroides en infecciones graves), *Angiostrongyluscantonensis y Duela hepática.*

Efectos adversos A diferencia de los otros benzimidazoles, el ABZ tiene pocos efectos adversos si se utiliza por poco tiempo (1 a 3 días), en tratamiento a largo plazo en ocasiones hay malestar abdominal, diarrea, náusea, mareos y cefalea transitorios e incremento en las enzimas hepáticas.[35]

Cuando los efectos son graves se puede presentar: dolor gastrointestinal, cefaleas intensas, fiebre, fatiga, alopecia, leucopenia, trombocitopenia, salpullido, llagas en la garganta.

Contraindicaciones Debido a que el fármaco es teratógeno y embriotóxico en algunas especies animales no se recomienda a mujeres embarazadas, ni a niños menores de 2 años. Es importante efectuar en forma seriada estudios de función hepática durante su administración por largo tiempo, no se recomienda administrarse en pacientes con cirrosis hepática.[39]

IVERMECTINA

Es una lactona macrocíclica semisintética (Figura 2), compuesta de una mezcla de Avermectina B_{1a} y B_{1b} (abamectín, un insecticida obtenido para la fumigación de cosechas) y se deriva del actinomiceto del suelo *Streptomycesavermitilis.*[35] Se caracteriza por ser un polvo blanco, poco soluble en agua y en ciclohexano, altamente soluble en metiletil cetona, propienglicol y polietenglicol.[34]

A mediados del decenio de los años 70, el estudio de productos naturales indicó que el caldo fermentado del actinomiceto *Streptomyces avermitilis* de la tierra aminoraba la infección por *Nematospiroides dubius* en ratones.[40]

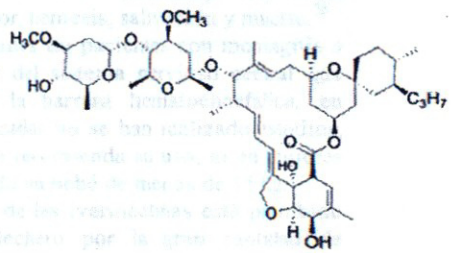


Figura 2. Estructura química de Ivermectina.

Farmacodinamia El fármaco inmoviliza a los organismos afectados al inducir parálisis tónica de sus músculos.[17] En trabajos realizados con nemátodos de vida libre *Caenorhabbditiselegans*, llegaron a la conclusión de que la parálisis era mediada por la potenciación y activación directa de los canales de Cl^- sensibles a IVM, controlados por el glutamato.[41] Esos canales están solamente presentes en nervios y células musculares de los invertebrados y una vez potencializados ocasionan un aumento de permeabilidad en la membrana a los iones de cloro, con hiperpolarización de los nervios y las células musculares, resultando la parálisis y muerte del parásito, como lo demostraban.[42,43] Los canales de cloro (Cl^-) controlados por el glutamato probablemente sirven como dos lugares de acción

de la IVM también en insectos y crustáceos. A falta de receptores con alta afinidad para ivermectina en céstodos y tremátodos se puede explicar porque estos helmintos son sensibles a la IVM.[37] Las avermectinas actúan con los receptores de GABA en el cerebro de vertebrados (mamíferos), pero su afinidad por receptores de invertebrados es 100 veces mayor.[36]

Farmacocinética La preparación parenteral en humanos es para pacientes que presenten parálisis espástica a dosis de 0.2- 1.6 mg/kg por vía subcutánea. Se administra solo por vía oral en el humano,[35]se absorbe bien en un tiempo máximo de 4 horas y es metabolizada ampliamente, su vida media es de 27 horas, se une el 93% a proteínas plasmáticas, la depuración plasmática es lenta (cerca de 1.2 litros/por hora) en un volumen aparente de distribución de aproximadamente 47 litros.

Se excreta poco por el riñón, pasa a la leche materna y su mayor excreción es por heces (en animales).[37] En los animales se puede administrar por todas las vías, con excepciones en algunas especies, por ejemplo por vía oral, (líquido, solo recomendable en caballos y borregas, pasta en caballos y vacas, tabletas en perros y gatos, en bolos intrarruminales o como premezcla para bovinos y cerdos como líquido en la piel para bovinos e inyección subcutánea en bovinos y cerdos).[36]

Indicaciones En humanos es el medicamento preferido en el control colectivo y terapéutica de la Oncocercosis, Filariasis y Estrongiloidosis. En Brasil actualmente se emplea en enfermedades de la piel como sarnas, pediculosis, larva migrans, miasis etc. En bovinos y ovinos: Parásitos gastrointestinales: *Haemonchu ssp., Ostertagiaostertagi, Ostertagialy rata, Trichostrongylus sp., Cooperiaoncophora, Cooperiapunctata, Cooperiapectinata, Oesophagosto munradiatum, Strongyloides papillosus, Nematodirus helvetianus, Nematodirus spathiger, Toxocara vitulorum y Trichuris spp.* Parásitos pulmonares*: Dictiocaulus viviparus, Dictiocaulus filaria.* Ectoparásitos:*Sarcoptes sp., Haematopinus sp., Dermatobia hominis, Boophilus microplus, Cochliomyia hominivorax, Linognatus vituli, Psoroptes* spp. También está indicado como auxiliar en el control de la población de la mosca de los cuernos (*Haematobia irritans*) y como preventivo de miasis en el ombligo de terneros recién nacidos y en las heridas de castración. En porcinos está indicado para parásitos gastrointestinales: *Ascaris suum, Hyostrongylus rubidus, Oesophagostomum* spp., *Strongyloides ramsoni.*, parásitos pulmonares: *Metastrongylus* spp., parásitos renales: *Stephanurus dentatus.*[34]

En equinos está indicado para parásitos gastrointestinales: *Parascarisequorum, Strongylus* spp., *Oxiurusequi.* Y parásitos pulmonares: *Dictycaulus arnfieldi,* En felinos contra parásitos gastrointestinales: *Ascaris* spp, *Ancylostoma* spp., *Uncinaria* spp. Y ectoparásitos: *Sarcoptes* spp, *Notoedres* spp, *Otodectes* spp. En caninos contra, *Dirophilaria immitis* y en otras especies como Camélidos sudamericanos efectivo contra, *Sarcoptes scabieivar. Aucheniae, Lamanema chaveziy* algunos parásitos internos.[34]

IVM es una droga bastante segura para los mamíferos, básicamente por dos factores: Primero, los canales iónicos mediados por el ácido gama amino butírico (GABA) solo están presentes en cerebro de mamíferos y la IVM no atraviesa la barrera hematoencefálica en situaciones normales., Segundo, los nervios y células musculares de los mamíferos no presentan canales de Clō controlados por glutamato.

En una investigación realizada en el control de la nematodiasis encontraron que la IVM a una concentración al 3.15% (630 μg/kg) resultaba más eficiente en un 99.3% en comparación con la IVM a concentración del 1% (200 μg/kg) presentaba una eficiencia del 88.7% con respecto a los grupos controles.[23]

Efectos adversos Algunos de los síntomas son principalmente: ataxia, midriasis, depresión, temblores, estupor, hemesis, salivación y muerte.[36]

Contraindicaciones En pacientes con meningitis u otras afecciones del sistema nervioso central que puedan afectar la barrera hematoencefálica, en mujeres embarazadas no se han realizado estudios, por lo cual no se recomienda su uso, ni en mujeres que estén lactando un bebé de menos de 15 kg.

El uso de las ivermectinas está prohibido en el ganado lechero por la gran cantidad de residuos que se vehiculizan en la grasa de leche y que presentan actividad insecticida, los residuos podrían ser concentrados en alimentos lácteos con un alto contenido graso (cremas, quesos, mantequilla).[44] Debe ser administrada con cautela a pacientes en uso de drogas que deprimen el sistema nervioso central.[23]

Toxicidad Esta sustancia carece de efectos adversos y tóxicos conocidos en el ser humano; ello se debe en parte al hecho de que la IVM no cruza la barrerahematoencefálica.[35] Se han observado signos de toxicidad pero por toxinas liberadas por la muerte de las microfilarias en tratamiento con este fármaco.

En animales la IVM es teratogénica en dosis extremadamente elevadas, la American Board of Veterinary Toxicology (ABVT) menciona, que este desparasitante está contraindicado en perros de raza Collie y cruzas con esta raza, en el Pastor de Maremar, en el Sabueso y que la toxicidad es

causada principalmente por utilizar dosis excesivas (10 veces la dosis en caballos, 20-40 en bovinos, 30 veces en cerdos, etc.) por utilizar preparados formulados para otra especie.

NITAZOXANIDA

Esta sal fue descubierta en el decenio de los setenta pero recientemente ha salido al mercado mundial, Rossignol en 1975, realizó una modificación en el anillo de los metronidazoles, y básicamente ello originó la molécula de la nitazoxanida, el cambio se realizó en la estructura básica al sustituir el nitrógeno por el azufre (Figura 3). Presenta mayor eficacia contra muchos parásitos tratados con otro tipo de productos.[28] Nitazoxanida es el primer compuesto de una nueva clase de antiparasitarios conocida como nitrotiazol, autorizado para su salida al mercado nacional por la Dirección General de Insumos para la Salud, dependiente de la Secretaria de Salud en 1996.[45]

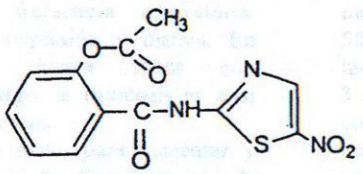


Figura 3. Estructura química de la Nitazoxanida.

Farmacocinética Como características importantes presenta un solo metabolito, lo que significa menor cantidad de efectos adversos con motivo de ingesta del producto. Permite la liberación gradual de los medicamentos hacia los tejidos y consecuentemente, aunque su vida corta es de una hora, se puede administrar cada 12 horas. La eliminación es por heces[28]. Presenta 2 mecanismos de acción: Uno, bloquea el ciclo aerobio de la glucosa, de tal manera que los productos del metabolismo de la glucosa no terminan en agua y CO2, sino que termina por medios anaerobios, por lo que el resultado es ácido láctico crea un ambiente hostil para los microorganismos, que prácticamente los destruye.

Dos, en protozoarios la reducción que se hace al sustituir el nitrógeno por el azufre permite que la nitazoxanida, básicamente su metabolito, penetre en el DNA del parásito, lo que hace que se rompa, que se fragmente la estructura del material nucléico y con ello se inhiba la síntesis del ácido nucléico.

Indicaciones Tiene utilidad contra gusanos redondos, *Enterobius vermiculares, Truchuris trichura, Ascaris lumbricoides,* o bien sobre céstodos o *Taenia saginata* o *solium, Hymenolepis* e inclusive contra *Fashiola hepática.*

Efectos adversos Náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea.

Dosis 7.5mg/kg/dosis, es decir, la dosis diaria es de 15 mg/kg, dividida dos veces al día. La administración habitual es de tres días, la FDA la aprobó en noviembre en 2002 para su uso pediátrico (suspensión oral) en infecciones por *C. parvum* y *G. lambia* en 2005, para uso en adulto (comprimido). En la actualidad la utilizan alrededor de 100 países.[46]

BITIONOL

Es un fármaco derivado de clorosulforados, su nombre químico es 2,2'tiobis (4,6-diclorofenol). Es un polvo cristalino, blanco grisáceo, fotosensible, casi insoluble en agua, soluble en alcohol y en soluciones alcalinas. Su estructura química se muestra a continuación, figura 4.

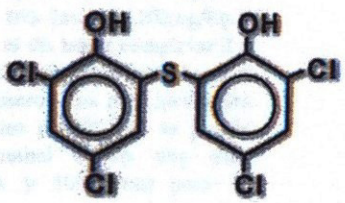


Figura 4. Estructura química de Biotionol.

Farmacodinamia Inhibe la fosforilizacion oxidativa, lo que disminuye el metabolismo glucolítico del parásito. Así mismo altera su equilibrio digestivo y excretor. Interfiere en la embriogénesis del parasito, lo que permite usarlo como profiláctico.

Farmacocinética Después de la administración, alcanza valores sanguíneos máximos en 4 a 8 h.[35] Cuando se administra por vía oral en ovinos y caprinos se absorbe lentamente; alcanza su Cp_{max}en24 h; tiene ciclo entero hepático y en bilis se detecta una concentración proporcionalmente mayor que en plasma.[47] Se menciona que la excreción se realiza aparentemente a través del riñón.[35]

Indicaciones y dosis: Inicialmente se utilizó en agricultura como antimicrobiano y fungicida. Se emplea también en jabones y soluciones jabonosas (0.5%-5%). Se le considera además antiparasitario de amplio espectro.[47]

Humanos: Es la droga más efectiva de todas las disponibles para el tratamiento de la Trematodosis hepática, tanto en fase aguda como en

fase crónica. La dosis oscila de 30-50 mg/kg de peso al día en días alternos durante 10-15 días en adultos y 5 en niños.[48]

Bovinos: contra *Fasciola hepática* madura con 7mg/kg/10dias, contra *Fasciola gigantica*, 40mg/kg y contra *Paragonimus westerni* de 40-50mg/kg, todas por vía oral.

Ovinos y caprinos: contra *Fasciola hepática* a dosis es de 175-220mg/kg y contra *Dicrocoelium dentriticum* es de 100-180mg/kg por vía oral.

Efectos adversos En humanos se presentan hasta en 40% de los pacientes, generalmente son leves a transitorios, aunque a veces su severidad requiere suspensión del tratamiento, se presenta diarrea, calambres abdominales, anorexia, nauseas, vomito, mareo y cefalea. Puede haber erupción cutánea después de una o dos semanas, lo que sugiere que es una reacción alérgica a la destrucción de los gusanos que mueren. No recomendable el uso en niños menores de 8 años de edad[35]. Los efectos adversos en ovinos la administración de 90-270 mg/kg/ por 5 días induce un incremento de frecuencia cardiaca y frecuencia respiratoria, además de leucocitosis, depresión y diarrea. En bovinos se presenta diarrea fétida con deshidratación. Sin embargo, la toxicosis es casi nula en la mayoría de los casos.

Interacciona con éxito, para aumentar y mejorar su eficacia contra las *Fasciolas* con la niclosamida, haxaclorofeno, tiabendazol, morantel, levamisol y tetramisol.

NOTA: La biotransformación es muy lenta, por ello debe evitarse su empleo 15 días antes del sacrificio de los animales.[47]

CITRATO DE DIETILCARBAMAZINA

Es un derivado sintético de la piperazina, Figura 5, esta se comercializa como la sal citrato. Este es el medicamento de elección en el tratamiento de filariasis, loiasis y eosinofilia tropical. Ha sido remplazado por ivermectina para el tratamiento de la oncocercosis.

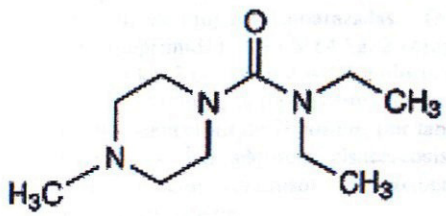


Figura 5. Estructura química de Citrato de Dietilcarbamazina.

Farmacodinamia: Produce la inmovilización de las microfilarias y altera su estructura de superficie, desplazándolas de los tejidos y haciéndolas más susceptibles a la destrucción por los mecanismos de defensa del huésped. El mecanismo de acción contra los gusanos adultos se desconoce.

Farmacocinética Se absorbe rápido por el tracto gastrointestinal; después de la administración de una dosis de 0.5mg/kg se alcanzan concentraciones plasmáticas máximas de 1 a 2 horas (h), la vida media plasmática es de 2 a 3 h en presencia de orina ácida, pero es cercana a 10 horas si la orina es alcalinizada. El medicamento rápido se equilibra en todos los tejidos, excepto en tejido graso. Se excreta principalmente por orina en forma del medicamento inalterado y en la forma del metabolito N-oxido.

Indicaciones: Importante es mencionar que se debe administrar después de haber consumido alimentos. Es el medicamento de elección para el tratamiento de infecciones causadas por *Wuchereria bancrofti, Brugia malayi, Brugiati mori y Loa loa.* Se considera eficaz y con carencia de efectos adversos. Recomendable es la dosis de 50mg (1mg/kg en niños) el primer día, el segundo día, tres dosis de 50mg/kg; en el tercer día, tres dosis de 100mg/kg y luego 2 mg/kg/ tres veces al día hasta completar 2 a 3 semanas. Se puede administrar antihistamínico o corticoide, durante los primeros días para limitar las reacciones alérgicas. Como profiláctico se puede administrar, 300mg semanal o en tres días consecutivos para loasis y 50mg/mes para la filariasis.[35]

Efectos adversos Ocasionalmente provoca vómito, diarrea y disminución del recuento espermático, hipersensibilidad anafilaxia y muerte. Se asocia enfermedad hepática, por lo que no se debe emplear en caso de que esta se manifieste o cuando el paciente tenga antecedentes.[47]

Contraindicaciones: Se recomienda no utilizar quimioterapia poblacional en zonas endémicas de oncocercosis y loiasis a pesar de que el fármaco pude utilizarse de dichas infecciones a viajeros y turistas. Se requiere disminuir la dosis en individuos con decremento en la función renal u orina persistente alcalina.[40]

NICLOSAMIDA

La niclosamida es un derivado de la salicilanilida halogenado introducido como tenicida después de estudios de laboratorio en ratas infectadas con *Hymenolepis diminuta.* Este posee notable actividad contra casi todos los cestodos que infectan al humano como *H. nana*, el nematodo *E. vermicularis* también es sensible.

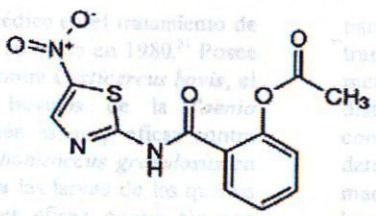


Figura 6. Estructura química de la Niclosamida

Farmacodinamia A concentraciones bajas, la niclosamida estimula la captación de oxigeno por parte de *Hymenolepis diminuta*, pero a concentraciones mayores inhibe la respiración celular y bloquea la captación de glucosa. La acción principal del medicamento tal vez bloquea la fosforilacion anaeróbica del difosfato de adenosina (ADP) por la mitocondria del parasito. Un proceso productor de energía que depende de la fijación de CO_2.[40]

Farmacocinética El fármaco se absorbe muy poco desde el tubo gastrointestinal, por tanto se ingiere en una sola dosis por lo común después de una comida frugal; Los sujetos con estreñimiento crónico debe de tomar antes un laxante. Se convierte en un metabolito inactivo llamado aminoniclosamida, que se elimina por las heces.[47]

Indicaciones Como ya se mencionó posee notable actividad contra casi todos los cestodos, que infectan a seres humanos aunque es un medicamento de segunda elección después del prazicuantel; se observa el deterioro de los vermes afectados en el intestino o *in vitro* de manera que puede haber digestión parcial del escólex y diversos segmentos, dando lugar a elementos amorfos. Durante el 2001 recomiendan como de primera elección en Teniosis ya que con el tratamiento aplicado en 8 personas se logró la eliminación del escólex, de *T. saginata*. Dosis recomendada en los adultos 2 gr y en niños de 0.5 a 1 gr dependiendo del peso.[49] Niclosamida no se usa en menores de 2 años ni en mujeres embarazadas. (Niclosan 500 mg/comprimido) de 11 a 14 kg. 2 comprimidos 1 g o de 34 kg. 3 comprimidos 1,5 g. dosis única.[50]

Es importante advertir que no es efectiva contra huevecillos de *T. solium*, por tanto expone al paciente a que adquiera cisticercosis. Se puede combinar con levamisol u oxibendazol para ampliar su espectro.

Efectos adversos: Carece prácticamente de efectos adversos, salvo molestias gastrointestinales muy ocasionales.

PRAZICUANTEL

Es un derivado de la pirazinaisoquinolina y se encuentra en forma de polvo de color blanco; es higroscópico, de sabor amargo con olor suave, soluble en agua y más soluble en alcohol. Su nombre químicos es 2-(ciclohexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11b-haxanidro-4H-pirazino(2,1-a)isoquinolin-4-1-ona.

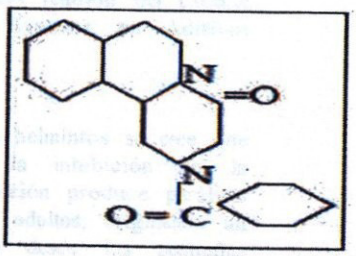


Figura 7. Estructura química del Prazicuantel

Farmacodinamia No se ha determinado el mecanismo de acción exacto. A bajas concentraciones in vitro, parece alterar y estimular el movimiento de los parásitos ocasionando contracciones tetánicas en su musculatura, debidas quizá a que aumenta la permeabilidad de su membrana celular al calcio. Además bloquea la síntesis de ATP.

Farmacocinética Se absorbe rápida y completamente en el intestino después de la administración por vía oral. Se distribuye en todos los tejidos y atraviesa la barrera hemato-encefalica y la pared intestinal, se metaboliza en hígado, se elimina por la orina y su vida media es de 3 horas aproximadamente

Indicaciones Una sola dosis resulta eficaz sin embargo, está indicada para infecciones causadas por *Dipylidium caninum, Taenia taeniaformis, Echinococus granulosus, Taenia Saginata Anaplocephala sp.* La dosis empleada con mayor frecuencia ha sido de 50mg/kg/día divididos en tres tomas durante un periodo de dos semanas[51], Se recomiendan como de segunda elección en Teniosis ya que al tratamiento aplicado 3 personas infectadas con *Taenia saginata,* se logró la eliminación del escólex.[49] Se evaluó en esquistosomiasis al cabo de 2 años en un solo tratamiento en niños en edad escolar en Burkina Faso, había reducido considerablemente la prevalencia había reducido considerablemente de 59% a 7.7% un 87% un 92.8% y la intensidad de 94.2 a 6.8 huevos/ 10ml de orina, de la infección por *S. haematobium,* la proporción de niños en edad escolar con infección disminuyo en un 2 al 3%.

El tratamiento médico en el tratamiento de la neurocisticercosis tuvo su inicio en 1980.[51] Posee una excelente actividad contra *Cysticercus bovis*, el estadio intermedio en bovinos de la *Taenia saginata* humana. También es muy eficaz contra adultos y juveniles de *Echonicoccus granulosus* en carnívoros, pero no contra las larvas de los quistes hidatídicos. [52] También es eficaz contra algunos trematodos, p.ej. *Eurytrema pancreaticum,* la duela del páncreas.

Efectos adversos En el tratamiento de la neurocisticercosis humana, se emplean 3 dosis de 75mg/kg de peso en un solo día, en algunos casos pueden presentarse reacciones adversas de diversa gravedad como convulsiones, náusea o vómito y otros trastornos neurológicos secundarios a la intensa reacción inflamatoria desencadenada por la lisis del parásito. [51] Se mencionan como efectos más comunes retortijones, dolores de abdomen o estómago, diarrea con sangre, mareos, sueño, fiebre, dolor de cabeza, aumento de la sudoración, pérdida de apetito y como menos comunes salpullido, ronchas o comezón de la piel. Posee un buen margen de seguridad cuando se administra por vía oral, no se recomienda su uso en cachorros, no produce efectos embriotóxicos o teratogénicos. Se encuentra en combinación con otros fármacos antihelmínticos como el febendazol, e ivermectina.[47]

METRIFONATO (TRICLORFON)

Es un medicamento seguro, de bajo costo y alterno para el tratamiento de las infecciones por *Shistosoma haematobium y Larva migrans cutanea.* No tiene actividad contra *S. mansoni* o *S. japonicum.* No está disponible en Estados Unidos de América.

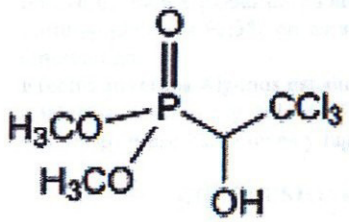


Figura 8. Estructura química del Metrifonato.

Farmacocinética Es un compuesto organofosfato, se absorbe rápido después de la administración por vía oral. Después de la administración de una dosis estándar, se logran concentraciones máximas de 1 a 2 h la vida media es cercana a 1.5 h. La depuración parece que se lleva a cabo a través de la transformación no enzimática en diclorvos, el metabolito activo. El metrifonato y diclorvos se distribuyen bien en los tejidos y se eliminan completamente en 24 a 48h.[53] La evaluación de los datos sobre este rubro sugieren que la sustancia madre tiene una semivida breve, de sólo una o dos horas, lo que significa que no valdría como residuo marcador esto se observa en la recomendación sobre los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios resultantes de la sesentava y sesentaidosava reunión del Comité mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios.[54,55]

Farmacodinamia Contra helmintos se cree que está relacionado con la inhibición de la colinesterasa. Esta inhibición produce parálisis temporal de los gusanos adultos, originando un cambio de localización desde las pequeñas arteriolas o plexos venosos de la vejiga hacia los pulmones, donde quedan adaptados por el sistema inmunitario y mueren. El medicamento no tiene actividad contra los huevecillos *S. haematobium*, estos continúan vivos a su paso a través de la orina durante varios meses después de que todos los adultos se han eliminado.

Indicaciones El tratamiento de *S. haematobium* es dosis de 7.5 a10mg/kg tres veces al día en intervalo de 14 días por vía oral, los índices de curación con este esquema de 44 a 93%, con marcadas reducciones en las cuentas de huevecillos en los pacientes que no se curaron. En caso de infecciones mixtas con *S. haematobium* y *S. mansoni,* el metrifonato, se ha combinado exitosamente con oxamniquina. Se ha considerado que es efectiva contra *Larva migrans cutánea* de manera tópica en ungüento con un 25%.[56]

Efectos adversos Algunos estudios revelan la aparición de síntomas leves y transitorios, incluyendo náuseas y vómitos, diarrea y dolor abdominal y bronco espasmo, cefalea, sudoración, fatiga, mareo y vértigo. Los síntomas pueden comenzar en 30 minutos y persistir hasta por 12 h.

No se debe usar metrifonato después de una exposición reciente a insecticida o medicamentos que pudieran potenciar la inhibición de la colinesterasas. El metrifonato está contraindicado en el embarazo.

PAMOATO DE PIRANTEL

Es un medicamento de amplio espectro contra helmintos como oxiuros, áscaris y *Trinchostrongylus orientalis.*

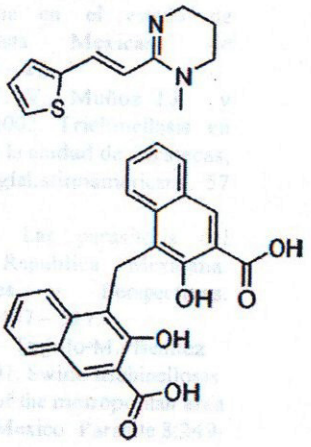


Figura 9. Estructura química del Pamoato de pirantel.

Farmacocinética Es un derivado de tetrahidropirimidina. Tienen poca absorción, en el aparato gastrointestinal.

Farmacodinamia Es considerado, dentro de tres antihelmínticos ensayados que producen una inhibición nula en el caso del Pamoato de Pirantel frente a la Dopamina como inhibidor de Monoaminas/oxidasas (MAO) en helmintos, bloquea la unión neuromuscular y produce parálisis del parásito.

Indicaciones Se recomienda su uso con 10mg/kg de peso en dosis única. Es moderadamente efectivo contra ambas especies de ancilostomas. No es útil en el tratamiento de trichuriasis, para el cual se ha usado exitosamente el pamoato de oxantel, un análogo de pirantel, no disponible en Estados Unidos de América; los dos medicamentos han sido combinados debido a su amplio espectro de actividad contra helmintos.[47]

En ensayo terapéutico con dosis única se obtuvo un índice global de curación parasitológica correspondiente a 92.3% en ascariasis y a 84% en enterobiasis.

Efectos adversos Algunos estudios han demostrado tolerancia excelente y solo el 5.7% de los casos estudiados presentaron leves y fugaces molestias.

CONCLUSIONES

Los Benzimidasoles son los fármacos más utilizados en el humano y especies pequeñas, en humanos principalmente el Albendazol por el sector salud y el Febendazol y Mebendazol por la industria farmacéutica, es bien sabido los efectos tóxicos que ocasionan y la resistencia que han creado debido a la mala posología que regularmente no es previa al diagnóstico de laboratorio. La Nitazoxanida que es un derivado del Metronidazol se está utilizando más y aunque menciona que tiene pocos efectos adversos, la realidad es que existen varias publicaciones donde mencionan lo contrario. La Ivermectina aunque resulta por su mecanismo de acción efectivo contra nematodos y tiene amplio margen terapéutico no se puede administrar a pacientes que tengan problemas como meningitis o menor número de capas en la barrera hemato-encefálica, además que no se han hecho en estudios en mujeres embarazadas y en animales preñados resulta altamente tóxico.

El fármaco Bionitol presenta en un 40% de pacientes efectos adversos así que debe tenerse mucha precaución al administrarlo y como la biotransformación es lenta debe evitarse administrar 15 días antes del sacrificio de los animales de consumo. El Citratode dietilcarbamazina es más utilizado para microfilarias y otros protozoarios uno de los principales problemas en la terapéutica es su alta toxicidad. La Niclosamida es un cesticida, cuyo problema es que no mata o inactiva a los huevos así que estos seguirán siendo patógenos y podría haber auto-contaminación. Sobre el Prazicuantel no se ha dilucidado aun su mecanismo de acción, lo importante de este es que atraviesa la barrera hemato-encefálica y pared intestinal así que es muy efectiva contra cisticercosis, aunque los efectos adversos son graves. El Metrofinato comenta la bibliografía es seguro de bajo costo, efectivo contra larva migranscútanea de manera tópica y el Pamoato de pirantel efectivo contra oxiurus.

REFERENCIAS

1. Fragoso R., Tavizón P. y Villacaña H. 1981. Un brote de triquinosis (triquinelosis) en laguna de carretero, Zacatecas. Salud Pública. Méx. XXIII: 24-41.
2. Del Río A. y Herrera D. R..1984. Primer hallazgo de *T. spiralis*en diafragma de cadáver en Zacatecas. Nota previa., Salud Pública de México 26: 596-598.
3. Villicaña H., Escobar M., Díaz A. y Díaz G. 1984. Nuevos Brotes de Triquinosis en el estado de Zacatecas. Salud Pública de México. 26 (3): 260 – 262.
4. Cabral S. J., Contreras A. A., Flores M. O., Villicaña F. M. y Fragoso U. R.. 1988. Primer Brote de Triquinosis en Valparaiso Zacatecas, Ciencia y Técnica, p: 43-45
5. Cabral S. J., Villicaña F. H., Fragoso U. R. y Contreras A. 1989. Triquinosis en Zacatecas: Perfil epidemiológico 1978 – 1988, Infectologia. 9: 627.

6. Contreras A. J. y Herrera E. R. 1992. Triquinosis porcina en el estado de Zacatecas. Revista Mexicana de Parasitología. 3: 25 – 27.
7. Berumen de la T. V., Muñoz J.J. y Moreno M. A.. 2002. Trichinellosis en perros callejeros en la ciudad de Zacatecas, México. ParasitologíaLatinoamericana. 57 (1-2):72-74
8. Carrada T. 1992. Las parasitosis del hombre en la República Mexicana. Avances recientes y Perspectivas. Infectología. 12. 8: 497 – 517.
9. Monroy H., Flores – Trujillo M., Benítez E. y Arriaga C. 2001. Swine trichinellosis in slaughterhouses of the metropolitan area of Toluca, State of Mexico. Parasite 8:249-251
10. SSA, 2002. http//www.ssa.gob.mx/unidades/csg/cuads_bas_cat2002/medicamentos/descomp/Enf_Infecciosas_Gpo6._Mic...
11. Arnold L. K. 2001. Trichinosis from Emergency Medicine/ infectious Diseases, MD Boston University School of Medicine., Medicine Journal April 4, Volume 2, Number 4: 3, 5 y 9 de 11.
12. Noeckler K., Reiter – Owona I., Heidrich J., Prots D., Rehmet S., Sinn G. y Ammon A. 2001. Aspects of clinicals features, diagnosis, notification ans tracing back in connection with two *trichinella* outbreaks in noth Rhine – Westphalia, Germany. Parasite. 8:183 – 185
13. Kim C. W. 1983. Epidemiology. 11. geographic distribution and prevalence. In Campell W. C. Ed. *Trichinella* and trichinosis, plenum, New York pp. 445 – 500.
14. DeTay-Lara, Parasitología Clínica, Trabajo enviado por Alejandro de Jesús Ríos Sánchez. Villahermosa Tabasco, Mex. www.elsalvador.com/noticias/EDICIONESANTERIORES/junio9/NACIONAL/nacio 22.html-12k- Consultado el 23-julio-2007
15. McCracken R. O. 1978. Efficacy of Mebendazole and Albendazole against Trichinella spiralis in mice, American Society of Parasitologists J Parasitol 64 (2) : 214-219
16. García R. J., Torrado J. J. y Bolas F. 2000. Improving Bioavailability and anthelmintic activity of albendazole by preparing albendazole-cyclodextrincomplexes Xth ICT, Parasite, 2001, 8. S 188- S190
17. Goodman A., Hardman J., Limbird L., Molinoff P. y Ruddon R.. 2002. Las bases farmacológicas de la terapéutica, Volumen II. 10° edición, Editorial MC Graw_hillInteramericana. p: 1138 - 1149.
18. Marincülic A., Fajdiga M. y Durakovic E..2001. The efficacy of flubendazole against Trichinella spiralis in swine. Parasite 2001. 8: 191-194.
19. Chung M. S., Joo K. H., Quan F. S., Kwon H. S. y Cho S. W. 2001. Eficacy de flubendazole and albendazole against *Trichinella spiralis* in mice. Parasite, 8: 195-198
20. Rossignol J. F. y Coulaud J. P. 1983. Evaluation de albendazole in Europa, West the Africa and Asia as a single dose anthielmintic: report 1455 patients, Summary of Clinical Trials Worlwide, p:24- 25
21. Martínez R. 1998. Revisión Bibliográfica: Situación de la Triquinosis en Chile Departamento de Epidemiología, Ministerio de Salud. http://wwwepi.misal.cl/enftrans/archivos/triquinosis.htm
22. Pozio E., Sachchini D., Sacchi L., Tamburrini A., y Alberici F..February 2001. Faliure of mebendazole in the treatment of humans with *Trichinella spiralis* Infection at the stage of Encapsulating; Brief reports, CID : 32: 638-642.
23. Sebastião A. P. 2001. Sampaio Laboratorios SintofarmaMonografia IVERMECTINA,. San Paulo Brasil.
24. Dunyo S. K. y Simonsen P. E..2002. Ivermectin and albendazole alone and in combination for the treatment of lymphatic filariasis in Ghana: follow-up after re-treatment with the combination, Transactions of the Royal Society of Tropical medicine and hygiene 96, 189-192
25. Moreno M., Sánchez M., y Monteoliva H. 1981. Inhibidores de MAO en helmintos parásitos. Revista Iberica de Parasitológia. V.41 n.2:195-202
26. Romero-Cabello R., Guerrero L. R., Muñoz Garcia M. del R. M. del R., y Geine Cruz A. 1997. Nitaxzoxanide for the treatment of intestinal protozoan and helminthic infections in México. Transaccions of the Royal Society of Tropical, Medicine and Higiene : 91: 701-703
27. Dávila-Gutiérrez C. E., Vasquez C., Trujillo-Hernández B. y Huerta M. 2002.

Nitazoxanide compared whit quinfamide and mebendazole in the treatment of helminthic infections and intestinal protozoa in children. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 66(3): 251-254.
28. Eguiza S. L. 1998. Nitazoxanida, una nueva molécula con efecto antiparasitario multiple,Revista de Enfermedades Infecciosas de Pediatria, diciembre, Vol. 10 Issue46, p14, 1p,1bw
29. Eguiza S. L. 2000. La Nitazoxanida y los Niños, Carta al Editor, Revista Mexicana de Pediatría, Vol.67, Núm.2, Mar-Abr, pp 89-90
30. Rodríguez G. R. 2000. Más sobre la Nitazoxanida , Carta al Editor. Revista Mexicana de Pediatría, Vol.67, Núm.4, Jul-Agos, 2000 pp192-193
31. Rossignol J. F., Ayoub A. y Ayers M. S. 2001. Treatment of diarrea caused by *Giardia intestinalis* and *Entamoeba histolytica* or *E. dispar*: A randomized, Double-Blind, Placebo- Controlled Study of Nitazoxanide. Concise Communication The Journal of Infectious Diseases; 184:381-4
32. Chávez-Ruvalcaba M. I. 2007. Tesis de doctorado, Evaluación y comparación de 3 desparasitantes en la infección por *Trichinella spiralis* en fase intestinal y muscular en modelo experimental murino y suino. Monterrey. Nuevo León. P. 1
33. Katzung-Beltram G. 1988. Farmacología Básica y Clínica, 7° edición, Editorial Manual Moderno, pp. 989 y 995
34. The Merk Index of Chemicals Drugs and Biologicals, 12 edición, 1996, p 39 No. 211
35. Katzung-Beltram G. 2005. Farmacología Básica y Clínica, 9° edición, Editorial Manual Moderno, pp. 1011- 1016.
36. Colin Johstone. 1999. *Trichinella spiralis* homepage,__University of Pensilvania 22/09/99. http:/cal.vet.upenn.edu/dxendopar/parasite pages/trichocephalids/t_spiralis.html.
37. Flórez J. 2002. Farmacología humana, 4ª Edición, Editorial MASSON
38. Beguristáin A., Sesma B., Aráiz R., Cobo S., Aizcorbe M., Domínguez P., y Fraile P. 1997, Valoración de la actividad escolicida frente a Echinococcusgranulosus del albendazol y de los desinfectantes: ceramide, agua oxigenada y povidona yodada. Laboratorio Agrario, Instituto de Salud Publica y Hospital Virgen del Camino Suplemento 2.
39. Davis A., Dixon H., y Pawlowwsky Z. S.. 1989. Multicentre clinical trials of benzimidazole-carbamates in human cystis echinococcosis (phase 2). Bulletin of the World Health Organization , 67.503-508.
40. Goodman A., Hardman J., Limbird L., Molinoff P. y Ruddon R. 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica, Volumen II. 9° edición, Editorial MC Graw_hill Interamericana. p:1077 y 1081 .
41. Schaeffer J. M. y Haines H. W. 1989. Avermectin Binding in Caenorhabditis elegans: a two-state model for the avermectin binding site. BiochemicalPharmacology., 38: 2329-2338.
42. Arena J. P., Lui K.K., Paress P.S., Frazier E.G., Cully D.F., Mrozik H., y Scheeffer J.M. 1995. The mecanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans*: correlation between activation of glutamate sensitive chloride current, membrane binding, and biological activity. Journal of Parasitol; 1995, 81: 286- 294.
43. Cully D. F., Vassilatis D.K., Liu K. K., Pares P. S., Van der Ploeg L. H. T., Schaeffer J. M. y Arena J. P.. 1994. Cloning of an avermectin-sensitive glutamate- gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. Nature, 71: 707-711.
44. Fernández -Suárez. 1998. Resumen sobre residuos de ivermectina en leche y productos lácteos: estudio de la cinética con dosis normales y microdosis y determinación de influencia del procesamiento en derivados lácteos.
45. Murphy Jr. y Friedmann. J.C.H.1985. Pre-clinical Toxicology of Nitazoxanide. A New Antiparasitic Compound. Journal of Applied Toxicology 1985; 5: 49-52
46. Aslam S. and Muher D.2007. Estudios clínicos e indicaciones de la Nitazoxanida. Future Microbiology Dec 2:583-90. http:www.intramed.net/contenidover.asp/contenido ID=51298. Consultado el 22 mayo de 2010.
47. Sumano Lopez H. S. y Ocampo Camberos L. 2006.. Farmacología Veterinaria3ª Edición, Editorial MC Graw-Hill Interamericana ,. p 458-487.
48. Pereira Aurea y Pérez Mónica. 2004. Trematodosis Hepáticas. Vol. 23 Núm. 4 pág. 118. Ámbito Farmacéutico Parasitología

49. Torres M., Perez C., Galdamez E.,Gabor M., Miranda C., Cofre X., and Tellez P. 2001. Teniosis: Serie clínica en 35 pacientes. Parasitología al día v.25 n,1-2 http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=s0716-07202001000100001&script=sci_arttext Consultado 25/05/2010
50. Blanco López Sergio http://www.geocities.com/capecanaveral/launchpad/3445/ped/helmintos.html. consultado 14-01-09
51. Medina-Santillan R., Mateos-García E., Reyes-García G., Castañeda-Hernández., Sotelo Julio. 2002. Análisis farmacoeconómico del esquema corto de prazicuantel en el tratamiento de la neurocisticercosis. Gaceta Médica de México, Vol 138(2) 202-207
52. Junqueira P. 2007. Antihelminticos, cestodicidas veterinarios para el ganado. http//parasitosdelganado.net/index.php?option=com_content&task=226&Itemid=313. Consultado 4 junio de 2010.
53. Harrison, Kasper L., Braunwald E., Fauci, A., Hauser S., Longo Dan., and Jameson L.2005. Principios de Medicina Interna. 16ª edición,Editorial: McGraw-Hill / Interamericana de España, S.A. P 496
54. Food and Agriculture Organization of the United Nations., World Health Organization. 2004. Codex Alimentarius Commission. CX/RVDF 04/15/4A/Add.I
55. Bulletin of the World Health Organization. 2008. Two-year impact of single prazicuantel treatment on infection in the national control programme on schistosomiasis in Burkina Faso. Bull World Health Organ v.86 n.10 Genebra
56. Varela S., Varela C. y Pascual M. 2002. Larva migranscutánea: diagnóstico de sospecha y tratamiento en Atención Primaria. Medifarm. v.12 n. 10 (12):655-657

ABSTRACT

Parasitic diseases represent one of the major health problems affecting animals and man. Helminths form a large group of metazoan parasites and free-living. The use of chemicals is one of the more efficient control strategies that currently exist. In this paper a review of the pharmacodynamics, pharmacokinetics and adverse effects on major deworming drugs, particularly those used against *Trichinella spiralis*, because previous studies has shown that this parasite is endemic in Zacatecas and is also important disease in other areas of the country and the world. Vet Zac 2015; 4 (Suppl 1):

Keywords: Helminthiasis, chemotherapy, *Trichinella spiralis*