

6. MATERIAL Y METODOS

El presente estudio se realizó a cabo de enero del 2004 a Mayo del 2006, en el Departamento de Biología Celular y Microbiología de la Unidad Académica de Biología Experimental de la Universidad Autónoma de Zacatecas, ubicado en Guadalupe Zacatecas con orientación de 22°, 45', 429" Latitud Norte y 102°, 30', 637" longitud Oeste a una altura de 2328 msnm. Apartado Postal 12, Guadalupe, Zac., 98600. Tel. y Fax (492) 92-1-13-26., y en el Laboratorio de Biología Celular, del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas, Subdirección de Estudios de Postgrado, Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.1 Diseño experimental

El modelo experimental que se utilizó fue 80 ratas hembras Long Evans de 30 días de edad pos-destete clínicamente sanas con modificación en la dieta, las cuales se dividieron en dos grupos: 40 ratas Nutridas (Dieta normal 24 % de Proteína), 40 ratas desnutridas (Dieta de 12% de proteína) de cada grupo se hicieron 4 subgrupos.

6.2 Metodología

- a) 10 ratas control nutrido y 10) ratas control desnutrido.
- b) 10 ratas nutridas y 10) ratas desnutridas infectadas con *T. spiralis*.
- c) 10 ratas nutridas y 10) ratas desnutridas inmunizadas con el antígeno soluble total (AST) utilizando el siguiente esquema de inmunización (una aplicación cada semana por 4 ocasiones), infectados con 200 LI de *T. spiralis* vía oral en la primera semana posterior a la culminación del esquema de inmunización, sacrificadas a las 6ta semana post -infección.

d) 10 ratas nutridas y 10 ratas desnutridas inmunizadas con el inmunógeno de 45 kDa, se utilizó el siguiente esquema de inmunización (una aplicación cada semana por 4 ocasiones), infectadas con 200 LI de *T. spiralis* vía oral, una semana posterior a la culminación del esquema de inmunización, se sacrificaron a la 6ta semana post-infección.

El esquema de vacunación utilizado fue a concentración de 10 µg de proteína por cada inmunización: a) intramuscular, b) intraperitoneal, c) subcutánea y d) intramuscular.

Parámetros evaluados:

- 1.- Peso corporal y talla (al inicio del experimento y al sacrificio de los animales en todos los grupos de estudio).
- 2.- Toma de muestra sanguínea del seno retroorbital en los siguientes tiempos: a) pre – infección de *T. spiralis*, b) pre-tratamiento AST e inmunógeno de 45 kDa, c) post-tratamiento AST e inmunógeno de 45 kDa, d) sacrificio de los grupos de estudio.
- 3.- Se caracterizó la respuesta inmune (IgG) a *T. spiralis* por WB en todos los grupos de estudio.
- 4.- Se caracterizó el sitio de unión Ag-Ab por IFI con microscopía confocal, en todos los grupos de estudio a los 45 días.
- 5.- Se evaluó el estado nutricional en relación a albúmina/globulina en todos los grupos de estudio.
- 6.- Se evaluó en todos los grupos de estudio la carga parasitaria mediante la D/A a los tratamientos de inmunización de AST y con el inmunógeno de 45 kDa.
- 7.- Se evaluó la célula nodriza (por observación de los cambios en su estructura morfológica) mediante la técnica de compresión de tejido y tinción de hematoxilina-eosina, en todos los grupos de estudio.

6.3 Técnicas

I.- Obtención del antígeno soluble total (AST) de *T. spiralis*

Para obtener el AST de *T. spiralis*, el cual se utiliza en las técnicas indirectas, se inició con la obtención señalada en D/A, posteriormente de la obtención de la LI, se sometió a varios lavados de solución buffer de fosfatos (PBS), se desengrasaron con acetona absoluta a evaporación manteniéndose en PBS, a continuación se procedió a sonicar usando 50% de eficiencia y dos minutos de pulso, con la finalidad de romper la cutícula y vaciar el contenido antigénico de las LI, se centrifugó a 3000 rpm 4°C por 1.50 h. El sobrenadante contiene el AST, al cual se le realizó la determinación de proteína (método de azul de Coomassie, G-250 a 610 nm), El extracto total fue utilizado como AST para inmunizar ratas Long Evans.

II.- Determinación de proteína (Método de Bradford)

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, 1976).

III.- Elusión del inmunógeno de 45 kDa

Del músculo infectado con larvas de *Trichinella spiralis* se obtuvo el AST al cual se le realizó electroforesis (SDS-PÁGE), en geles del 10% de poliacrilamida. La porción

del gel que contenía el triplete característico de 42, 43 y 45 kDa se separó mediante elusión, con solución de Tris 10mM, a un pH de 8.13, adicionándole inhibidores de proteasas, posteriormente se centrifugó a 12,100 x gravedades a 4° C durante 30 min. La proteína que se obtuvo del sobrenadante y 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).

IV.- Corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida (EGPA)

Para separar el 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) de acuerdo a la metodología descrita por Laemmli *et al.*, 1970, 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 Volts. 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; H₂O, ditiotreititol 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 (24 kDa), lisosima (14 kDa); se usó una cámara PROTEAN II xi Cell (Bio-Rad), posterior al corrimiento se tiñó uno de los geles con azul de Coomassie, para posteriormente desteñirse con solución destiñidora, después con solución aclaradora, fue secado el gel en membranas de papel celofán, en el aparato de GELDRYER MODEL 583 of BIO-RAD, los geles no teñidos se transfirieron a papel de nitrocelulosa (Laemmli *et al.*, 1970).

V. - Western Blot (WB)

El producto obtenido del corrimiento en gel de poliacrilamida se transfirió al papel de nitrocelulosa (NC), El papel con las proteínas transferidas de acuerdo con el método descrito por Towbin 1979, utilizando una cámara de Trans blot-cell Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) con el buffer de transferencia (25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM glicina, 20% de MEOH y .025 – 0.1 % de SDS) a 35 volts a 4°C durante toda la noche, una vez transferidas las proteínas al papel de NC, se procedió al revelado con tinción verde rápido (fast green al 0.1%) por 5 min. Con agitación constante, se retiró el colorante, decolorándose en agua destilada verificando la presencia de proteínas.

El papel de NC se cortó en tiras, se procedió a cubrirlos con solución bloqueadora PBS-leche descremada en polvo al 3% y azida de sodio al 0.15% manteniéndose a 4°C, con agitación continua durante 12 hrs. Se lavó 3 veces con PBS el papel (cada una por 10 min.). Posterior a esto se continuó con la incubación del (primer Ab) suero de rata diluido 1:100 con PBS- leche en polvo al 3% incubado 90 min a temperatura ambiente con agitación constante. Se lavó por dos ocasiones durante 10 min. Con PBS-Tween 20, al 0.3% y tres veces con PBS por un lapso de 10 min. Se incubó un (segundo Ab) anti-IgG de rata marcada con peroxidasa dilución 1:1000 así como PBS-leche en polvo al 3% durante 90 min a temperatura ambiente con agitación constante. Después fueron lavados 2 veces durante 10 min. Con PBS Tween 20 al 0.3% y tres veces con PBS durante 10 min. Las bandas de proteínas se revelaron con 3,3'diamino-benzidina (DAB), 50 mg. en 100 ml de PBS, agregándole 10 µl de peróxido de hidrógeno al 30% manteniendo a 4°C, posteriormente se lavó cada tira por tres ocasiones en agua destilada, dejándose secar al ambiente (Tobwin *et al.*, 1979).

VI.- Inmunofluoresencia Indirecta (IFI)

Las LI se obtuvieron del músculo infectado de rata con *T. spiralis*, se tomaron 20 µL de LI y se lavaron por tres periodos con PBS durante 5 min en agitación magnética, se incubaron con 20 µL del primer Ab durante 45 min con PBS se lavaron con PBS en 3 ocasiones por 5 min en agitación magnética, se extrajo el líquido con precaución para evitar absorber las LI, se le agregó 200 µL del conjugado monovalente anti-gamafluoresceinada (IgG dilución 1: 1000), se incubó por 45 min a 37°C, se extrajo la fase líquida, se realizó 3 lavados con PBS en agitación magnética por 5 min cada uno, se montaron laminillas con las LI cubriéndolas con cubre objetos y se selló con resina, se observaron al microscopio confocal (Labzoffsky *et al.*, 1964; García *et al.* , 1997, 2001).

VII.- Albúmina/Globulina

Esta técnica se realizó siguiendo el Manual de química sanguínea veterinaria (con el aparato QUIK LAB. REACTIVOS). Para poder determinar la relación albúmina /globulina se necesitó la determinación de proteínas totales. Determinando la cantidad de cada grupo se obtiene la relación antígeno-anticuerpo (Ag-Ab).

Método de Biuret. El principio es en solución alcalina, las proteínas forman con los iones de cobre un complejo coloreado, siendo positiva al presentar un color azul. Se utilizó suero como muestra. Se utilizó reactivo de Biuret, un agente tensioactivo, se utilizó un patrón de albúmina bovina, fracción V, 6 g/dl., fotómetro a una temperatura de 20 a 25°C, como se describe a continuación:

Paso 1.- Preparar las siguientes soluciones:

Muestras / Soluciones	Blanco	Estándar	Muestra
Solución 1	1000 μ l	1000 μ L	1000 μ L
Solución estándar	----	20 μ L	----
Suero problema	---	---	20 μ L

Paso 2.- Incubar a temperatura ambiente por 20 min.

Paso 3.- Leer entre 20 y 60 min. (los resultados se expresan en g/dl)

ALBUMINA

Método BCG: Se basa en el principio de la albúmina que es una solución tamponada la cual reacciona en presencia del reactivo Verde de Bromocresol (BCG), a través de una reacción de enlace con el colorante. Se utilizó una muestra de suero al cual se le añadió el reactivo BCG. (Patrón albúmina bovina V,5 g/dl), se incubó a temperatura ambiente por 1 min., enseguida se leyó en un fotómetro a una temperatura de 25°C (Nota: el tiempo de lectura no debe de exceder 10 min). Las soluciones de lectura se prepararon como se describe a continuación y los resultados se expresan en g/dl.

Muestras / Soluciones	Blanco	Estándar	Muestra
Reactivo BCG	1500 μ L	1500 μ L	1500 μ L
Solución estándar	----	10 μ L	----
Suero problema	---	---	10 μ L

VIII.- Técnica de digestión artificial (D/A)

El proceso se realizó a 37°C por 24 h según el método descrito por Del Río *et al.*, 1986, donde se colocó 30 g de tejido infectado triturado en un tamiz de tul en forma de saco; suspendido en una solución de 0.03% de pepsina (10,000 U), HCl al 37 % (0.2M) en 1.0 L de agua destilada, se colocó en un embudo de separación., trascurridas 24 h se procedió a separar las LI que se depositaron en el fondo del embudo de separación, se realizó tres lavados de PBS, para evitar su desnaturalización de LI, por último se midió la cantidad de LI presentes y se observaron al microscopio.

IX.- Técnica de compresión

Una vez cumplido el tiempo de la reproducción del ciclo vital de *T. spiralis* en las ratas, se procedió como se describe a continuación para obtener las muestras de tejido y aplicar la técnica de compresión:

Paso 1.- Se sacrificó la rata.

Paso 2.- Se tomó 0.5g de tejido de diafragma, masetero, lengua e intercostales

Paso 3.- Cada muestra se compactó a presión en dos portaobjetos de vidrio.

Paso 4.- Se observó al microscopio óptico y se buscó la presencia de la LI en los tratamientos correspondientes, con el objetivo de 10X.

X.- Tinción con hematoxilina–eosina

Esta técnica se realizó siguiendo el Manual del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de Norteamérica 57, de acuerdo a los siguientes pasos:

Paso 1.- Fase de fijación del tejido en formol al 10% para cortes histológicos, con el fin de determinar las características morfológicas mediante la tinción de H/E.

Paso 2.- Los tejidos se deshidrataron con:

- 1.- Formol al 10% por 12 h.
- 2.- Alcohol etílico al 80 % por 1h.
- 3.- Alcohol etílico al 96 % por 1h.
- 4.- Realizar tres cambios cada uno de 30 min. en alcohol etílico absoluto
- 5.- Realizar tres cambios alcohol etílico absoluto por 1.5 h cada uno.
- 6.- Realizar dos cambios con xileno por 1.5 h.

Paso 3.- Procesar en parafina empleando el aparato de procesador (Lipshaw Automatic Tissue Processor) de acuerdo a las siguientes etapas, las cuales se describen a continuación:

- 1.- Colocar en parafina a 60°C y realizar dos cambios de 1.5 h.
- 2.- Colocar los tejidos en moldes cúbicos hasta que se enfriaron.
- 3.- Dejar reposar 24 h.
- 4.- Colocar los cubos de parafina en una cama de hielo para efectuar los cortes.
- 5.- Realizar cortes con un grosor de 4 μ en el Micrótopo modelo 820 Rotary, American Optical.
- 6.- Posteriormente se colocaron en un portaobjetos, cubierto con un gel a base de clara de huevo y glicerol con diluciones de 1:1 con 0.01g de tibal como conservador.
- 7.- Los cortes así tratados se colocaron en placa caliente para fundir la parafina y continuar con la tinción de H/E.
- 8.- El procedimiento de tinción se llevó a cabo en un tren de tinción, los portaobjetos se colocaron en una canastilla que se introdujo en las siguientes soluciones:
 - a) xileno 5 min.
 - b) alcohol etílico absoluto 3 min.
 - c) alcohol etílico al 96% 3 min.
 - d) alcohol etílico al 96% 3 min.
 - e) enjuagar con agua destilada (de manera rápida).
 - f) teñir con hematoxilina de Harris por 10 seg.
 - g) enjuagar con agua potable.
 - h) alcohol ácido al 1% (de manera rápida).
 - g) enjuagar con agua potable.
 - i) pasar por solución saturada de carbonato de litio 2 min.
 - j) enjuagar con agua potable;
 - k) teñir con eosina (por 10 segundos).
 - l) enjuagar con agua potable (dos cambios).
 - m) pasar por alcohol etílico del 96% 3 cambios.
 - n) en alcohol etílico absoluto 3 cambios.
 - ñ) pasar por xileno (todos los cambios anteriores fueron de 1 min).
 - o) se montaron con resina sintética Sigma y se cubrieron con un cubreobjetos para la observación al microscopio óptico al 10, 20 y 40X (Armed Forces Institute, 1957).

6.4 Diseño de Tratamientos

Completamente al azar.

6.5 Diseño Experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, el cual es representado por el siguiente modelo general:

$$Y_{ij} = \mu + A_i + B_j + e_{ijk}$$

Donde Y_{ijk} = porcentaje de reactores. μ = es la medida común en todas las unidades experimentales antes de aplicar las inmunizaciones. α_i = es el i-ésimo nivel de inmunógenos (con y sin inmunizar). β_j = es el j-ésimo diagnóstico. $\alpha\beta$ = es la interacción del i-ésimo nivel de α y j-ésimo nivel de β . e_{ijk} = es el error experimental (Steel y Torrie, 1998).

6.6 Análisis estadísticos

El procesamiento estadístico de los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza ($p < 0.01$) empleando el sistema de análisis estadístico (SAS, 1998), y analizando los resultados obtenidos en el programa Excel para Windows 2006.

7. RESULTADOS

En las Tablas III y IV se muestran los resultados del análisis de varianza (ANOVA) para efecto de la relación de peso y talla, significativa ($F=158.64$, $P < 0.01$) en el grupo de animales nutridos y desnutridos. En el mismo se observa que fue altamente significativo de ($P < 0.01$) a través del período de estudio. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 2, donde la comparación relativa de la talla en rata desnutridas con relación a la nutrida se observa diferencia, así en la figura 3 se muestra la comparación entre los pesos final obtenidos en ratas nutridas, desnutridas, infectadas e inmunizadas, siendo menor el peso de las ratas DN que en las Nut, de forma similar eso ocurre en la figura 4 donde la talla de las ratas DN es menor comparadas con las Nut.

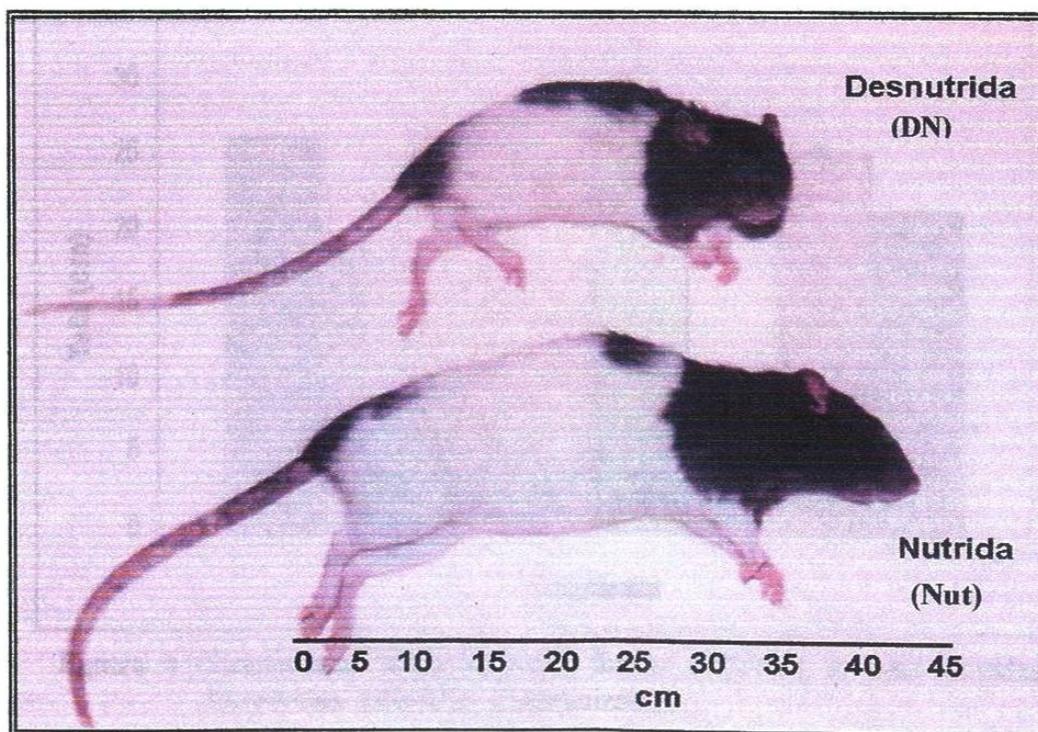


Figura 2 Comparación de talla entre rata desnutridas y nutrida, las cuales estuvieron en tratamiento durante 57 días, la diferencia en talla es notoria, en donde la rata desnutrida alcanzó una talla máxima de 33 cm, y la rata nutrida alcanzó una talla máxima de 45 cm

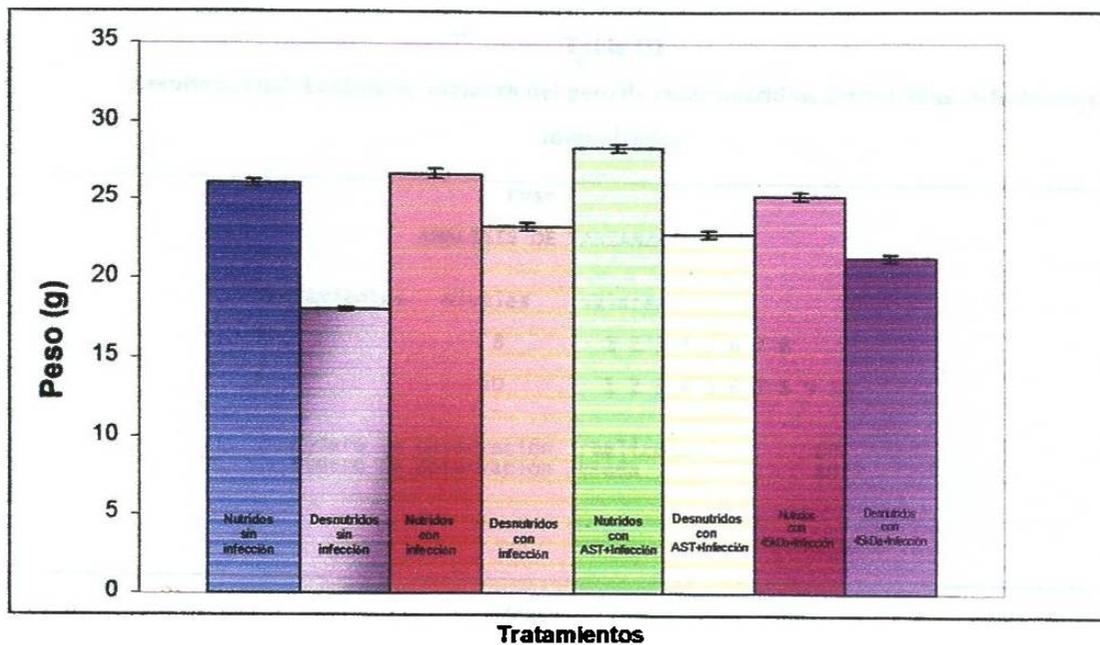


Figura 3 Comparación entre los pesos finales obtenidos en ratas nutridas, desnutridas, infectadas e inmunizadas.

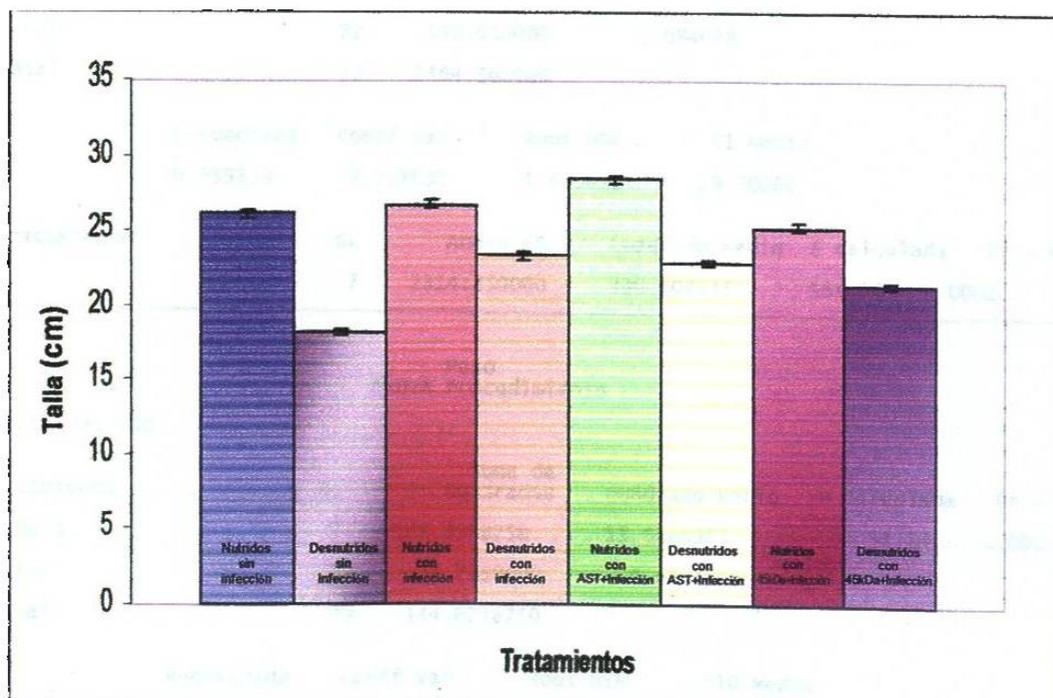


Figura 4 Comparación entre las tallas finales obtenidas en ratas nutridas, desnutridas, infectadas e inmunizadas.

Tabla III
Resultados del Análisis de varianza del peso de ratas nutridas, desnutridas, infectadas e inmunizadas

Peso						
ANALISIS DE VARIANZA						
Tratamientos	Niveles	Valores				
T	8	1	2	3	4	5 6 7 8
R	10	1	2	3	4	5 6 7 8 9 10
Número de observación realizada					80	
Número de observación usada					80	

Peso					
ANOVA Procedimiento					
Variable: Y1					
Tratamiento	GL	Suma de cuadrados	cuadrado Medio	F calculada	Pr > F
Modelo	7	2314.250000	330.607143	158.64	<.0001
Error	72	150.050000	2.084028		
Total	79	2464.300000			
R-cuadrada Coeff Var Root MSE Y1 Media					
0.939110 7.328001 1.443616 19.70000					
Tratamiento	GL	Anova SS	Cuadrado medio	F calculada	Pr > F
T	7	2314.250000	330.607143	158.64	<.0001

Peso					
ANOVA Procedimiento					
Variable: Y10					
Tratamiento	GL	Suma de cuadrados	cuadrado Medio	F calculada	Pr > F
Modelo	7	108.8968750	15.5566964	31.35	<.0001
Error	72	35.7250000	0.4961806		
Total	79	144.6218750			
R-cuadrada Coeff Var Root MSE Y10 Media					
0.752977 1.844887 0.704401 38.18125					
Tratamiento	GL	Anova SS	Cuadrado Medio	F Value	Pr > F
T	7	108.8968750	15.5566964	31.35	<.0001

Tabla IV
Resultados del Análisis de varianza de la talla en ratas nutridas, desnutridas, infectadas e inmunizadas

Talla						
ANALISIS DE VARIANZA						
Tratamientos	Niveles	Valores				
T	8	1	2	3	4	5 6 7 8
R	10	1	2	3	4	5 6 7 8 9 10
Número de observación realizadas					80	
Número de observación usadas					80	

Talla					
ANOVA Procedimiento					
Variable: Y1					
Tratamiento	GL	Suma de Cuadrados	cuadrado Medio	F calculada	Pr > F
Modelo	7	32925.35000	4703.62143	75.21	<.0001
Error	72	4502.60000	62.53611		
Total	79	37427.95000			
R-cuadrada Coeff Var Root MSE Y1 Media					
0.879700 12.45841 7.907978 63.47500					
Tratamiento	GL	Anova SS	cuadrado medio	F Calculada	Pr > F
T	7	32925.35000	4703.62143	75.21	<.0001

Talla					
ANOVA Procedimiento					
Variable: Y10					
Tratamiento	GL	Cuadrados	cuadrado Medio	F calculada	Pr > F
Modelo	7	76185.88750	10883.69821	44.34	<.0001
Error	72	17675.10000	245.48750		
Total	79	93860.98750			
R-cuadrada Coeff Var Root MSE Y10 Media					
0.811689 6.528010 15.66804 240.0125					
Tratamiento	GL	Anova SS	cuadrado medio	F Calculada	Pr > F
T	7	76185.88750	10883.69821	44.34	<.0001

Con la utilización de la técnica de albúmina/globulina se obtuvieron los siguientes resultados los que se muestran en la figura 5. Las ratas con el tratamiento de nutridos control sano (NCS) obtuvieron la menor concentración de PT, Alb y GL., que fue de 7.3g/dl, 2.86 g/dl y 4.19 g/dl respectivamente, en todos los grupos de estudio. Mientras que para las ratas nutridas infectadas (NI) fueron las que obtuvieron la mayor cantidad de PT y de GL que fue de 9.54 g/dl y 6.18 g/dl respectivamente, en la Alb fue de 3.35 g/dl. En las ratas nutridas tratadas con AST e infectadas (NASTI) obtuvieron 8.43 g/dl de PT, 3.33 g/dl de Alb y 5.1 g/dl de GL. En las ratas nutridas tratadas con el inmunógeno de 45 kDa e infectadas (N45I), obtuvieron 8.12 g/dl de PT, de Alb 3.49 g/dl y 4.66 g/dl de GL. Por lo que se observa que los CNS obtuvieron menor cantidad de PT, Alb y GL

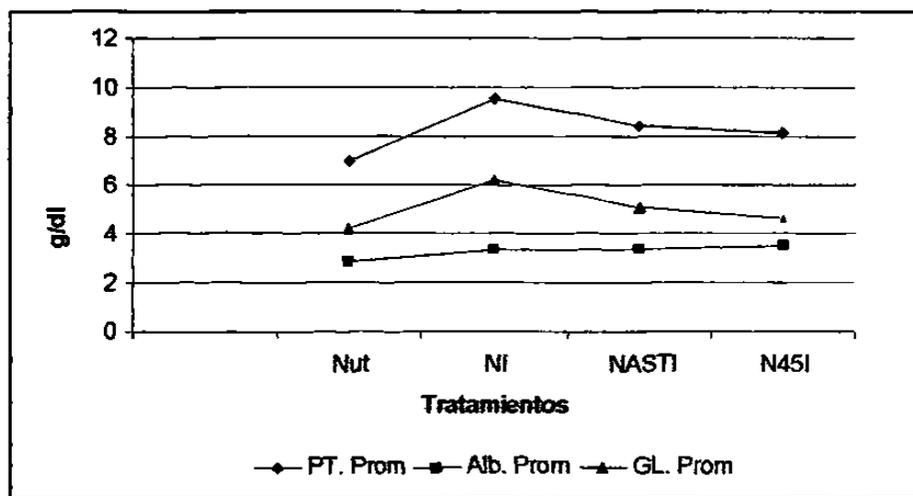


Figura 5 Promedio de proteínas totales (PT), albúmina (Alb) y globulina (GL) en ratas nutridas, inmunizadas e infectadas.

Tabla V

Resultados de la albúmina/globulina en ratas nutridas

Tratamiento	Proteína total Promedio	Albumina promedio	Globulina promedio
Nut	7.03	2.86	4.19
NI	9.54	3.35	6.18
NASTI	8.43	3.33	5.1
N45I	8.12	3.49	4.66

La figura 6 arroja los siguientes resultados. Las ratas desnutrida control sano (DNCS) obtuvieron la menor concentración de PT, y de GL., que fue de 5.39 g/dl, y 2.37 g/dl respectivamente y en la Alb fue de 3.04 g/dl, mientras que para las DNI obtuvieron PT de 6.46 g/dl, la Alb de 2.91 y de GL fue 4.5 g/dl concentración más alta. En las DNASTI obtuvieron 6.39 g/dl de PT, 3.23 g/dl de Alb y 3.15 g/dl de GL. En las ratas DN45I, obtuvieron 4.67 g/dl de PT, de Alb 3.26 g/dl y 3.89 g/dl de GL.

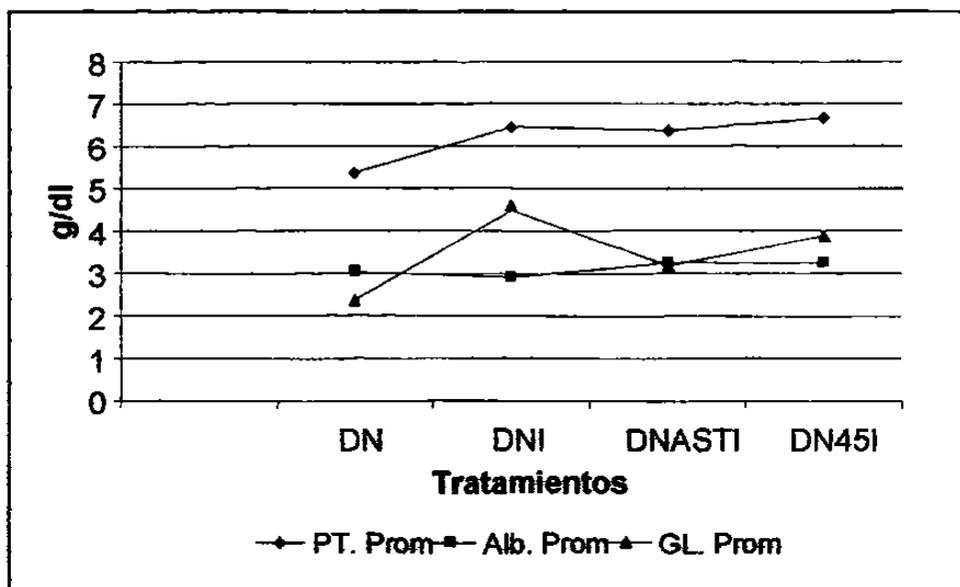


Figura 6 Promedio de las proteínas (PT), albúmina (Alb), globulina (GL) en ratas desnutridas, inmunizadas e infectadas.

Tabla VI

Resultados de la albúmina/globulina en ratas desnutridas

Tratamiento	Proteína total Promedio	Albúmina promedio	Globulina promedio
DN	5.39	3.04	2.37
DNI	6.46	2.91	4.5
DNASTI	6.39	3.23	3.15
DN45I	6.67	3.26	3.89

Al utilizar la técnica de compresión de tejidos, se observó los siguientes resultados:
no se observa la LI de *T. spiralis* en los grupos controles Nut y DN sin infección.

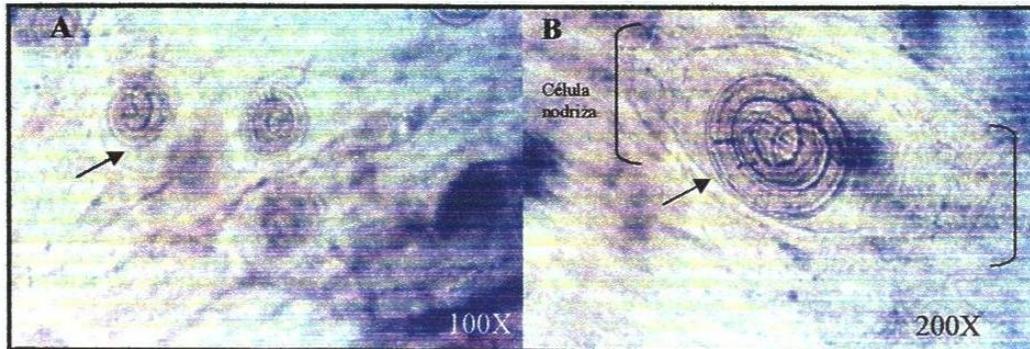


Figura 7 Muestra de tejido infectado de rata nutrida, en la cual se aplicó la técnica de compresión, en la figura A se observa la presencia de la larva infectante en masetero (flecha), la imagen B muestra a mayor aumento las características morfológicas propias de la larva infectante (flecha) y de la célula nodriza (entre corchetes).

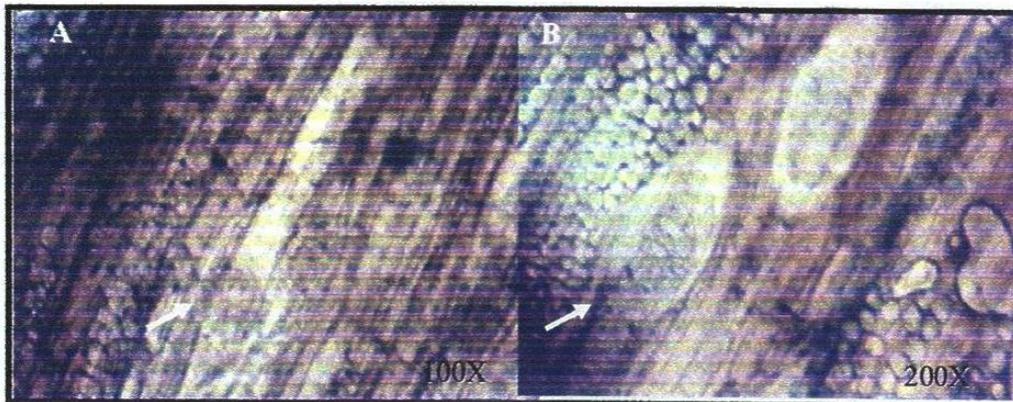


Figura 8 Muestra de tejido infectado de rata desnutrida, en la cual se aplicó la técnica de compresión, en la figura A se observa la presencia de la larva infectante en masetero (flecha), la imagen B muestra a mayor aumento las características morfológicas propias de la larva infectante.

160683

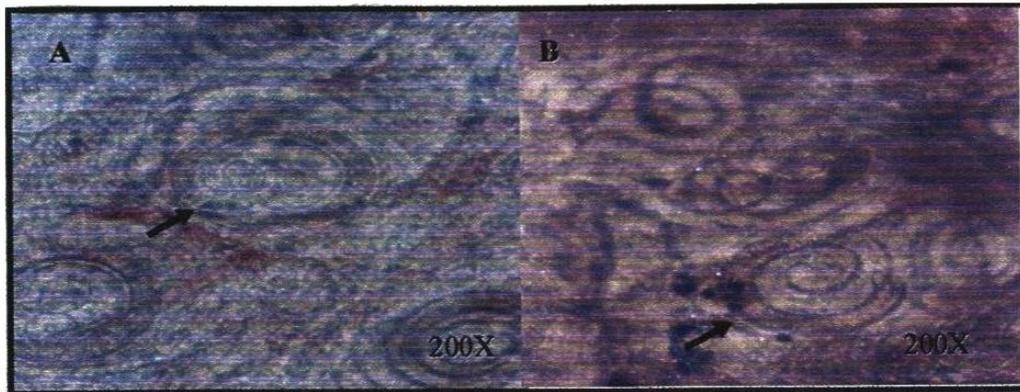


Figura 9 Tejido de rata nutrida inmunizada con AST e infectadas; en A se observa la presencia de larvas infectantes modificadas en su morfología de la célula nodriza, mientras que en B se observa a *T. spiralis* sin célula nodriza pierde su morfología característica en espiral.

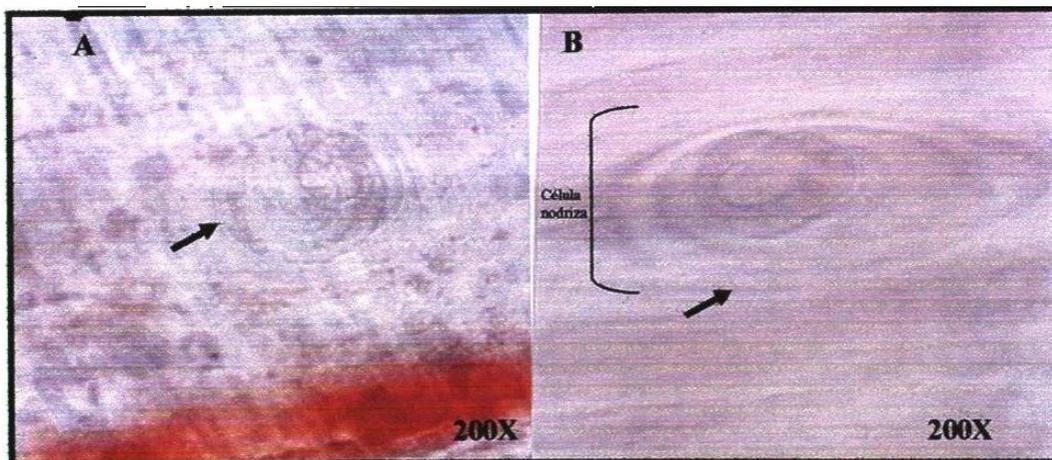


Figura 10 Tejido de rata desnutrida inmunizada con AST e infectadas; en A y B se observa la presencia de larvas de *T. spiralis* infectantes modificadas en su morfología de la célula nodriza.

Los resultados obtenidos con la técnica de D/A, en los diferentes tratamientos, de las ratas Nut, y ratas DN, inmunizadas e infectadas, mostró la cantidad de LI que estuvieron presentes en 30 g de músculo estriado.

En la figura 13 se observan los resultados obtenidos de D/A de 30 g de tejido muscular de ratas Nut y DN, ambas infectadas e inmunizadas; los grupos controles de ratas Nut y DN sin infección no presentaron LI, y en los grupos de ratas Nut infectadas, se recolectaron 200 μ L de LI, de igual forma del grupo de ratas DN infectadas se recolectaron 400 μ L de LI. Al ser utilizado el tratamiento de Nut inmunizadas con AST e infectadas, se recolectaron 10 μ L de LI, mientras que en las ratas DN se recuperaron 100 μ L de LI. Así también para el tratamiento de ratas Nut inmunizadas con inmunógeno de 45 kDa más infección de *T. spiralis*, no presentó paquete de LI, mientras que en las ratas DN se recuperaron 10 μ l de LI. Estos resultados muestran claramente el efecto protector del inmunógeno de 45 kDa sobre ratas tanto Nut como DN infectadas con *T. spiralis*.

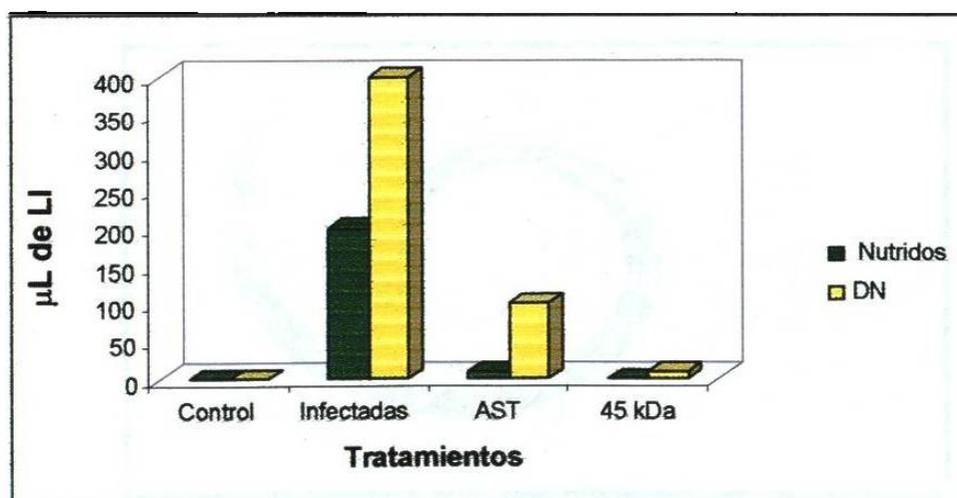


Figura 13 Comparación del efecto protector del AST y del inmunógeno de 45 kDa en ratas Nut y DN ambas infectadas e inmunizadas.

Con la realización de la técnica de D/A se demostró diferencia en la morfología que presentaron las LI, dependiendo del tratamiento utilizado.

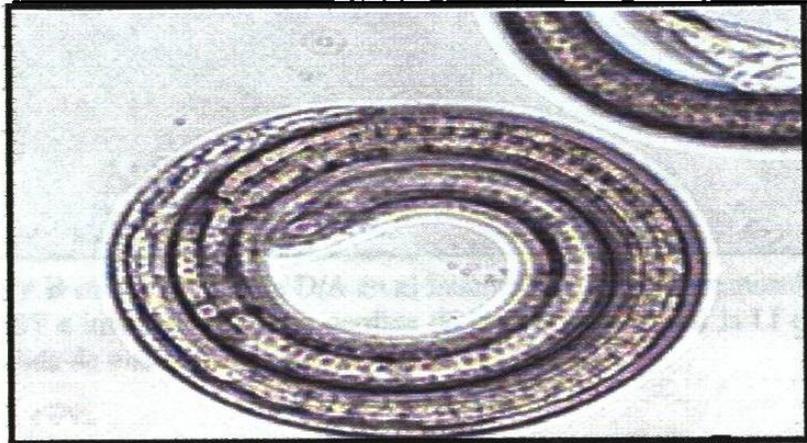


Figura 14 Se observa mediante la técnica de D/A en tejido de ratas tratadas con Nut e infectadas, a las LI con su estructura morfológica propia de la *T. spiralis*, observados a 400X.

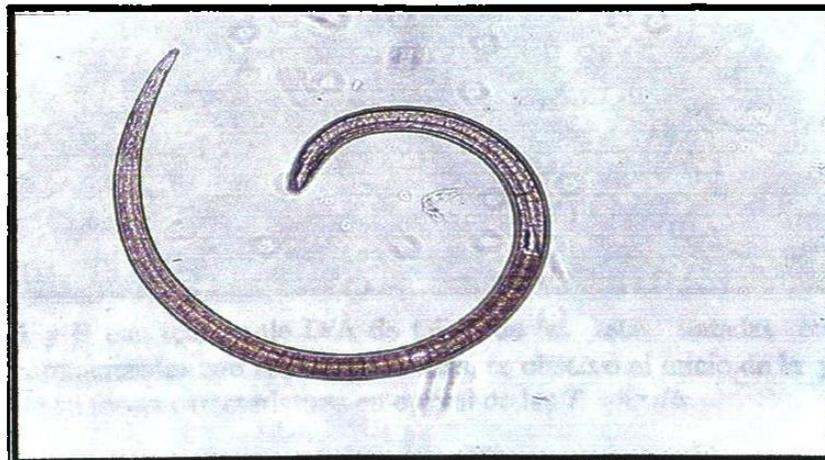


Figura 15 Con la técnica de D/A se observó en tejido de ratas tratadas con DN infectados, el inicio de la pérdida en espiral propia de la LI. observados a 400X.

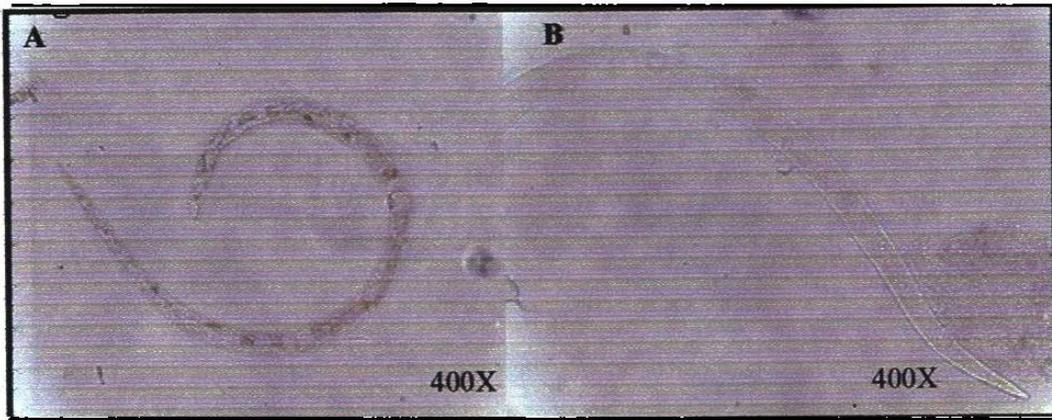


Figura 16 A y B con la técnica de D/A en el tratamiento de Nut inmunizados con AST e infección, muestra pérdida de la forma en espiral la LI e inicia salida de material de la LI.

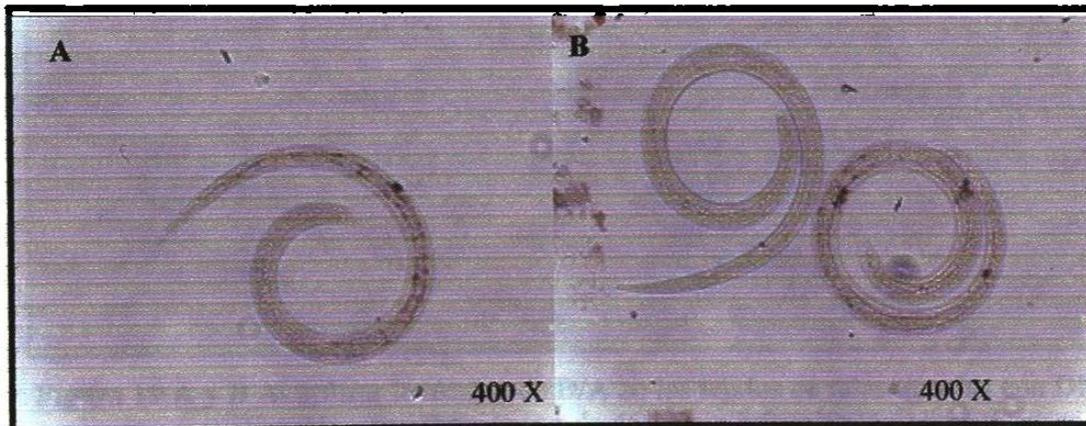


Figura 17A y B con técnica de D/A de tejido de las ratas tratadas con DN inmunizadas con AST e infectadas, se observó el inicio de la pérdida de su forma características en espiral de las *T. spiralis*

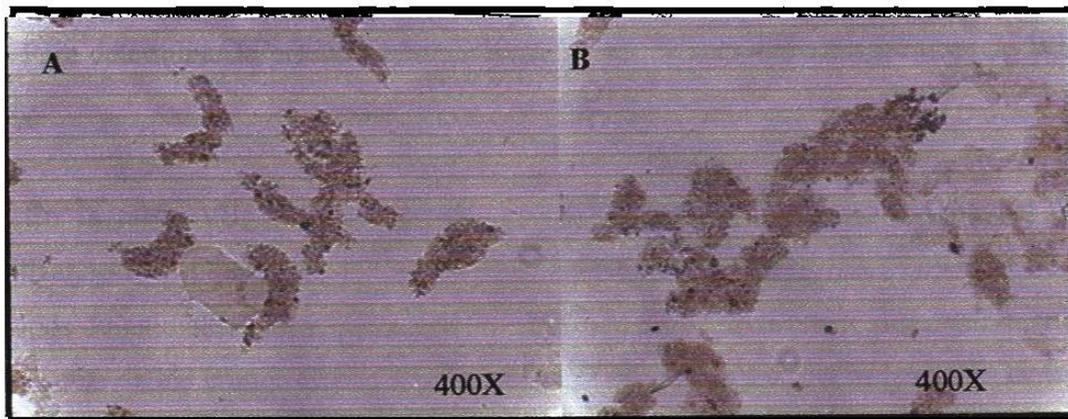


Figura 18 A y B En la D/A del tratamiento nutrido e inmunizado con inmunógeno de 45 kDa e infección, no se observó presencia de la LI de *T. spiralis*, solo se encontró fragmentos de ella.

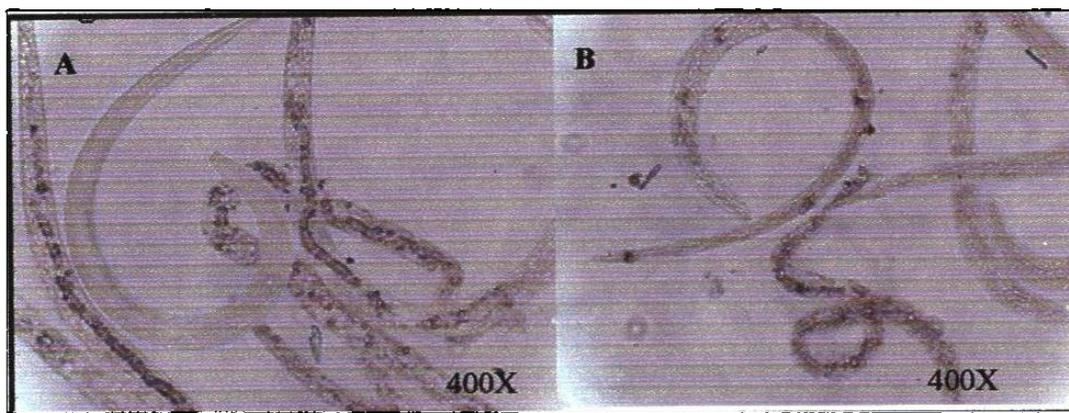


Figura 19 A y B Al utilizar la técnica de D/A en los tejidos de ratas tratadas con DN e inmunización con inmunógeno de 45 kDa e infección, se observó ausencia de la morfología característica de las LI, encontrando a las LI de *T. spiralis* deshidratadas

Para determinar la presencia de Ab anti- *T. spiralis* se realizó las técnicas de WB e IFI.

En la tabla VII, se presentan los resultados obtenidos con la técnica del WB utilizando una dilución de 1:1000. En los resultados se observa que los sueros de los grupos de animales Nut y DN sin infección presentan una respuesta negativa, mientras en sueros de los grupos de Nut y DN infectados los resultados fueron positivos tanto en los tratamientos post-inmunización como al sacrificio. Así mismo, en los grupos tratados con inmunización de AST, presentaron Ab tanto post- inmunización como al sacrificio. Para los grupos inmunizados con el inmunógeno de 45 kDa, solamente 4 animales presentaron el bandeo del triplete característico para *T. spiralis* post-inmunizados, mientras que al sacrificio en todo el grupo de ratas se detectó el bandeo característico Ab anti -*T. spiralis*.

Tabla VII
Resultados del WB

Tratamientos	Post-inmunización	Sacrificio
Nut Control negativo	-	-
DN Control negativo	-	-
Nut Infección positivo	+	+
DN Infección positivo	+	+
Nut + AST Infección	+	+
DN + AST Infección	+	+
Nut + 45kDa Infección	+ (n= 4)	+
	(43, 45, 48 kDa)	
DN + 45kDa Infección	-	+

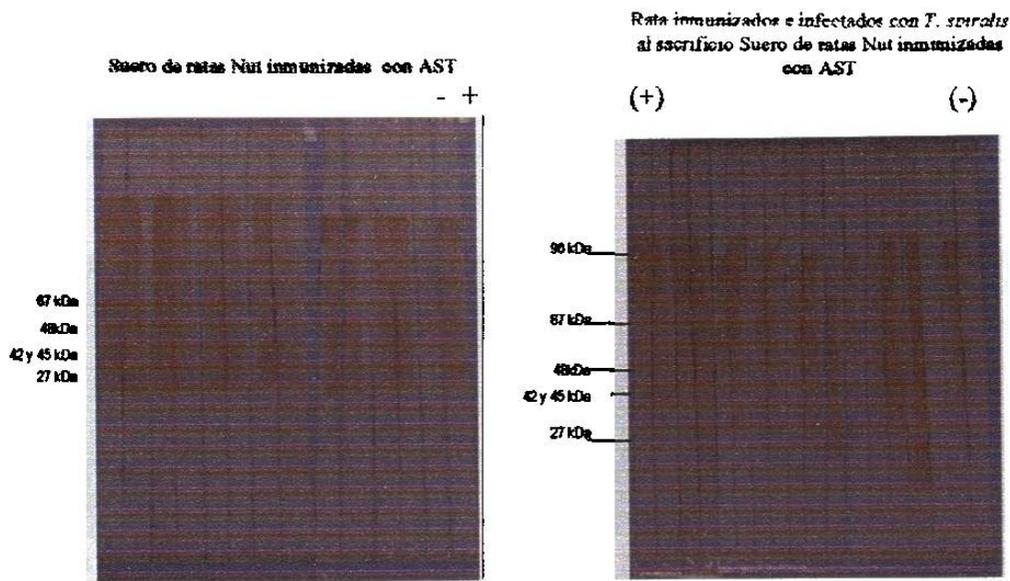


Figura 20 En el WB de muestra de suero de ratas Nut e inmunizadas con AST se observan las bandas características de *T. spiralis*, de igual forma en el WB con muestra de suero de rata inmunizados e infectados con *T. spiralis* al sacrificio se observa el bandeo característico para *T. spiralis*.

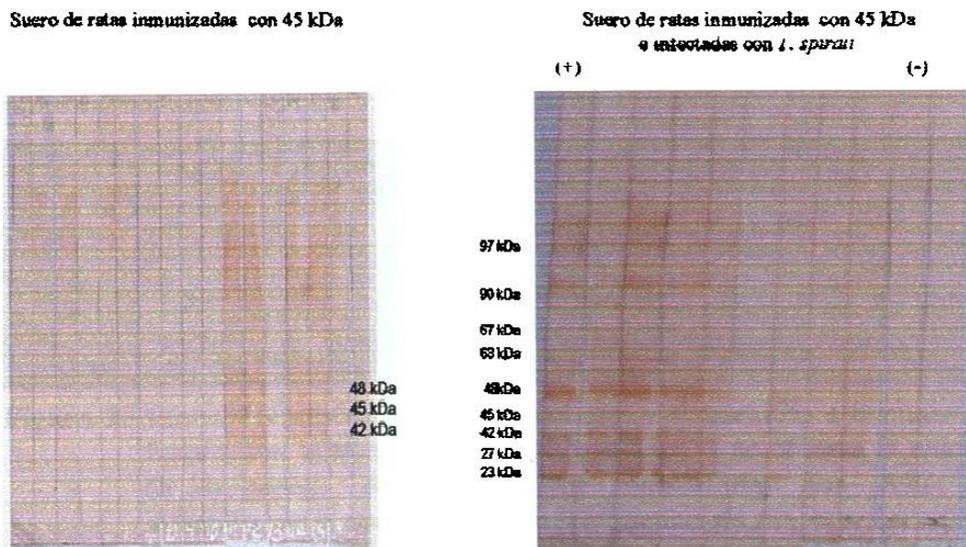


Figura 21 En el WB de muestra de suero de rata Nut e inmunizadas con 45kDa sólo se observan las bandas características del triplete 42, 45 y 48 kDa de *T. spiralis* en cuatro muestras, de igual forma en el WB con muestra de suero de rata inmunizados e infectados con *T. spiralis* al sacrificio se observa el bandeo característico para *T. spiralis*.

Con la técnica de IFI por microscopía confocal, con diluciones de 1:100 en sueros de ratas con diferentes tratamientos, Nut, DN, inmunizadas e infección, se obtuvieron los resultados mostrados en las figuras 22 y 23.



Figura 22 Inmunofluorescencia de ratas nutridas y desnutridas empleando la técnica IFI. En la técnica de IFI de los sueros de ratas Nut (A) y DN sin infección (B), se observó resultados negativos, no presentando fluorescencia (A y B), solamente presentaron inmunofluorescencia inespecífica propia del parásito. En la imagen correspondiente a los sueros de animales Nut infectados fueron positivos (C) haciéndose evidente el reconocimiento Ag-Ab (anti IgG), expresado mediante la intensa fluorescencia en la superficie (cutícula) de la larva de *T. spiralis*. En la muestra de sueros de animales DN infectados (D) mostraron una reacción positiva y de manera similar se observó reconocimiento Ag-Ab, expresado por la fluorescencia en la superficie (cutícula) de la larva de *T. spiralis* (10X)



Figura 23 Inmunofluorescencia de ratas nutridas y desnutridas e inmunizadas. Empleando la técnica de IFI, en la imagen A se observa la reacción de los sueros de ratas Nut inmunizados con AST más infección, en la cual es evidente la presencia de Ab, expresado por la fluorescencia en la superficie de LI y en interior de ella (cavidad celómica); en la imagen B correspondiente a los sueros de animales DN inmunizados con AST más infección se observaron los esticocitos de la LI y la presencia de Ab; en la imagen C correspondiente a sueros de ratas Nut inmunizadas con el inmunógeno de 45 kDa más infección se observó el reconocimiento Ag-Ab, haciéndose presente la fluorescencia en la superficie de la LI. En comparación con sueros de animales DN inmunizados con inmunógeno de 45 kDa más infección (D) se detectó unión Ab anti *T. spiralis* a través de la fluorescencia tenue (10X).

Con el propósito de observar y evaluar la implantación de las LI en tejido muscular de rata se empleó la técnica de hematoxilina-eosina, en las imágenes observadas al microscopio óptico es evidente la presencia de polimorfonucleares (pn) como se observa en las figuras 24, 25, 26, 27 y 29, excepto en la figura 28 la cual corresponde a muestra de tejido de ratas Nut inmunizadas con inmunógeno de 45 kDa e infección. Los resultados obtenidos se observan en la figura y 28. También es evidente en todas las imágenes la presencia de la LI dentro de su célula nodriza

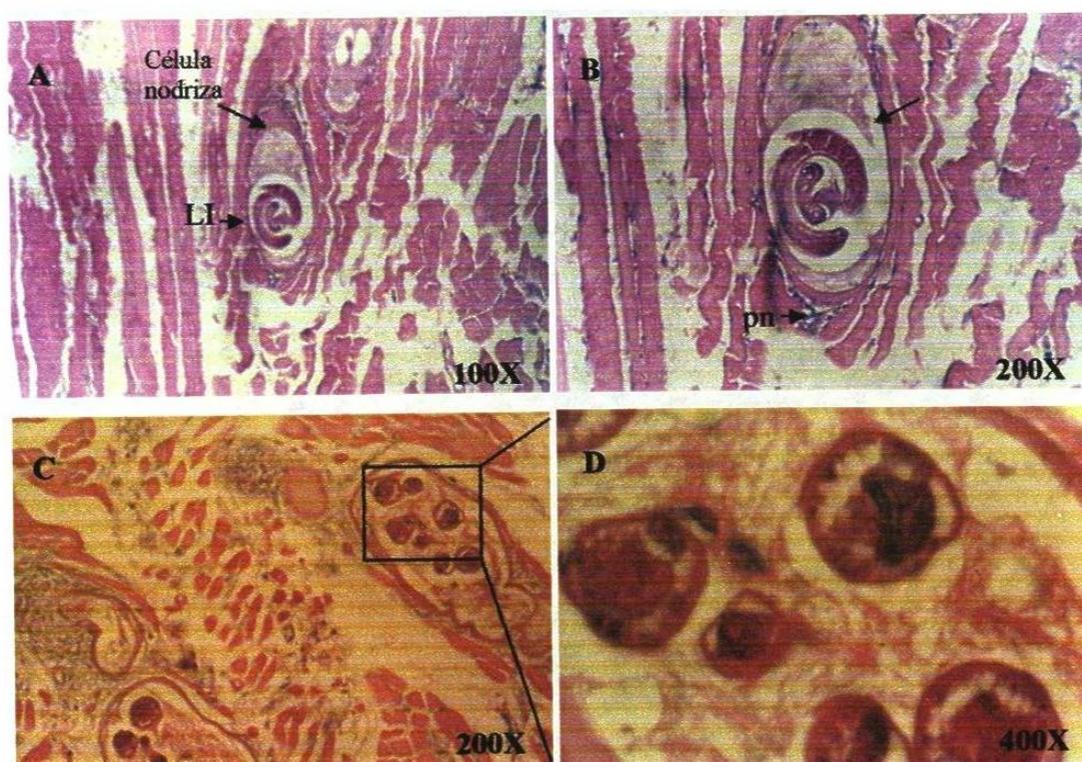


Figura 24 Corte transversal correspondiente a muestras de tejido muscular de ratas Nut e infectadas las cuales se tiñeron con la técnica de hematoxilina y eosina, en las cuales se observó la presencia de polimorfonucleares (pn) y al sitio de implantación de la LI y su célula nodriza como se observa tanto en la imagen A , B y C. La imagen D corresponde al recuadro marcado en C, en donde se observa un acercamiento de la característica de implantación de la *T. spiralis*.

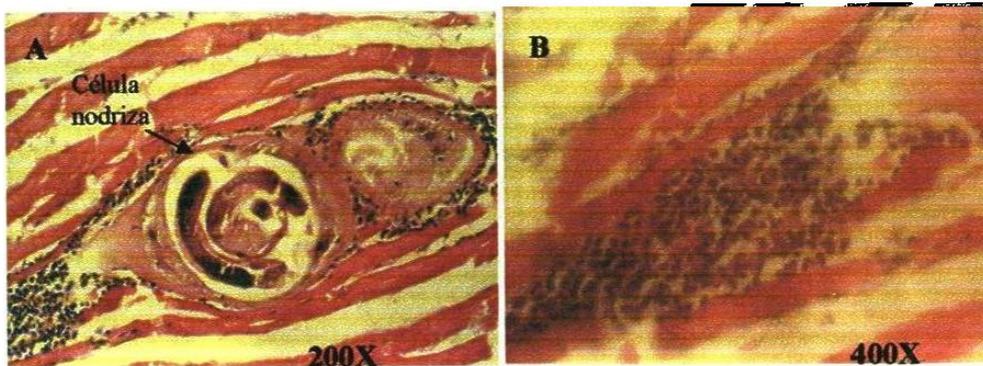


Figura 25 Corte transversal correspondiente a muestras de tejido muscular de ratas DN e infectadas las cuales se tiñeron con la técnica de hematoxilina y eosina, en las cuales se observó la presencia de polimorfonucleares (pn) rodeando a la célula nodriza en el sitio de implantación de la LI de *T. spiralis* (A), en las imágenes B y C se observa la presencia de abundantes polimorfonucleares (pn).

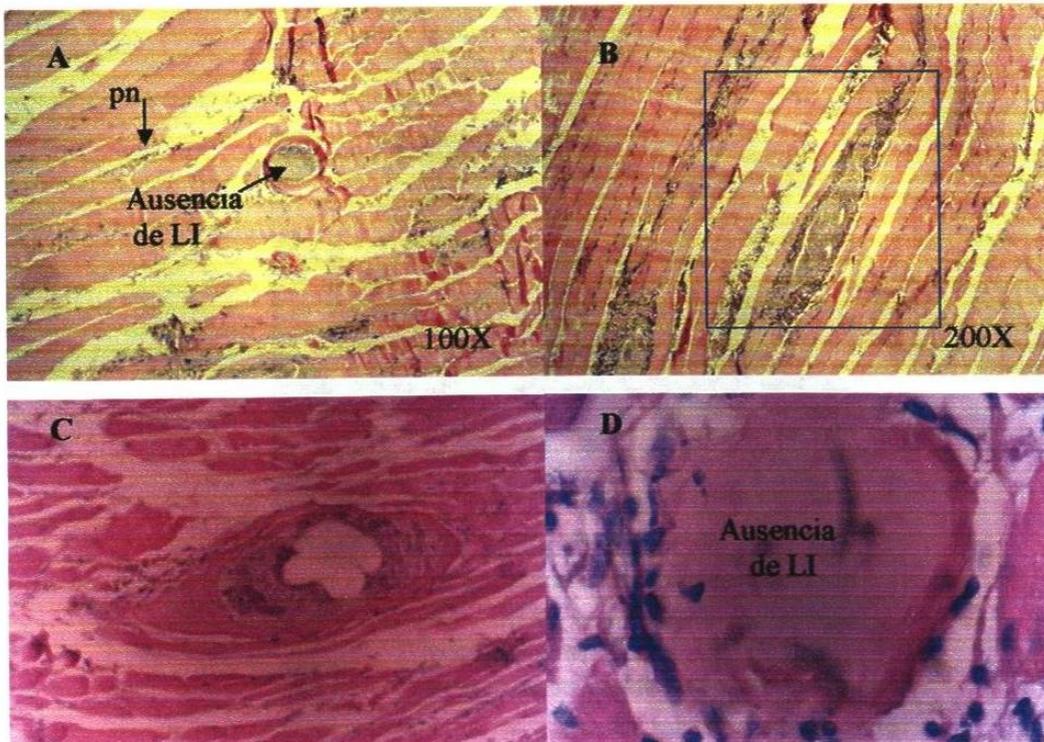


Figura 26 Corte transversal de músculo estriado de ratas Nut inmunizadas con AST e infección, en las cuales se observó la presencia de polimorfonucleares (pn) en el sitio de implantación de la LI, también se observó pérdida de la anatomía morfológica de la célula nodriza (recuadro en imagen B) por otra parte también se vio alterada la implantación de LI. En las imágenes B, C y D es muy evidente la pérdida de la LI de *T. spiralis*. En la imagen C es muy evidente la

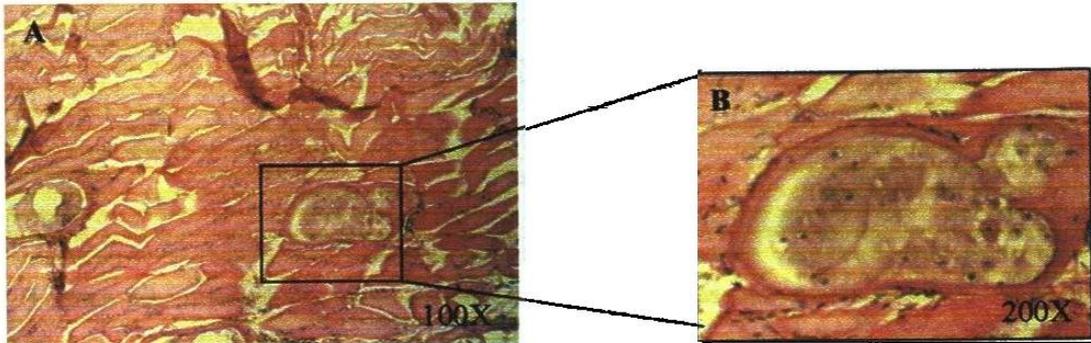


Figura 27 En tejido muscular de ratas DN inmunizadas con AST e infección, se observó la pérdida total de la anatomía morfológica e implantación de LI, la célula nodriza se observó con modificaciones y el tejido adyacente perdió su morfología, en **B** se muestra la imagen ampliada del recuadro en **A**.

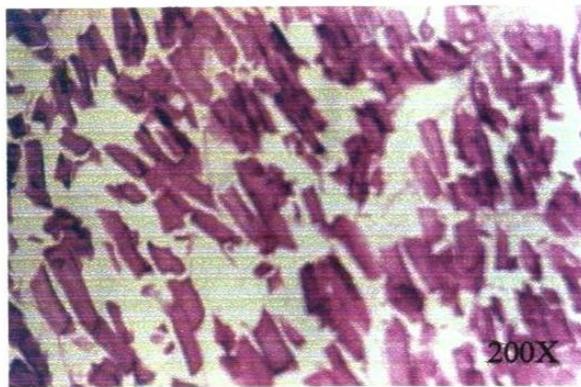


Figura 28 En tejido muscular de ratas Nut inmunizadas con inmunógeno de 45 kDa e infección, presenta pérdida total de la LI, el tejido muscular se ve afectado.

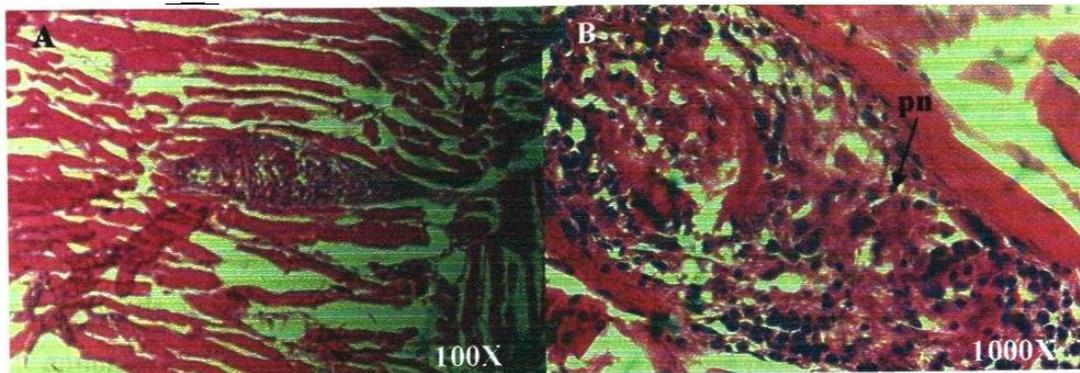


Figura 29 En tejido muscular de ratas DN inmunizadas con inmunógeno de 45 kDa e infección, se observó la pérdida de la morfología de la implantación de LI, así mismo se observó la célula nodriza con modificación importantes, en B es evidente la presencia de polimorfonucleares (pn) infiltrados en la región que correspondería a la célula nodriza.