

Evaluación por medio de intradermorreacción de la aplicación del inmunógeno de 45kDa de *Trichinella spiralis* para el diagnóstico de Trichinellosis.

CHÁVEZ RUVALCABA F. ¹, CHÁVEZ RUVALCABA MI. ²; HERNÁNDEZ LUNA CE. ¹
MUÑOZ ESCOBEDO JJ. ³, MORENO GARCÍA MA. ²

- ¹ Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, México
² Unidad Académica de Ciencias Biológicas, UAZ, México
³ Unidad Académica de Odontología, UAZ, México

Summary

Diagnostic methods for different zoonotic diseases in the food industry have helped to control, treat and eradicate several food-transmitted diseases such as Trichinellosis, a parasitic disease mainly transmitted through consumption of poorly cooked meat, that is not commonly detected in any type of meat processing facility. The main objective of this work is to evaluate the delayed hypersensitivity immunological mechanism by administration of the 45 kDa *Trichinella spiralis* immunogen in order to develop an easy access and cost-effective diagnostic method for the detection of the disease both in humans and animals. In this study, Long Evans murines were distributed in six different groups: healthy and infected control groups, murine-treated sublingually and conventionally with the 45 kDa immunogene after infection with *T. spiralis*, and murines challenged with 500 infective larvae after sublingual and conventional immunization. The intradermal reaction was performed using the 45 kDa immunogen in order to evaluate the delayed hypersensitivity by the triple response of Lewis after 2, 6, 24 and 48 h. The statistical analysis performed, consisting in a multifactorial analysis of variance, allowed us to detect significant differences between the groups considered ($p < 0.05$, CI: 95%), which led us to conclude that the 45 kDa antigen is a protein potentially usable for the diagnosis of Trichinellosis.

Key words: Diagnosis, intradermal reaction, *Trichinella spiralis*.

Introducción

La trichinellosis es una enfermedad parasitaria zoonótica que afecta a mamíferos silvestres y domésticos, se transmite 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 & Dupouy-Camet 2014, Chu et al. 2014, Cui et al. 2014, Wang et al. 2014, Wei et al. 2015), *Trichinella* puede infectar a más de 150 tipos de animales, incluyendo seres humanos, cerdos, roedores y caninos (Yang et al., 2014), 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 OMS la clasifica como una de las principales parasitosis transmitidas por alimentos con mayor impacto a nivel mundial (OMS, 2014; Wei et al., 2011).

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 en ninguno de estos procesos son para el diagnóstico de *T. spiralis*, el consumo de cerdo por persona en México es de 14kg, ocupando el tercer lugar del consumo de carne después de la de pollo y bovino (Díaz et al., 2007) y debido a que la pobreza en México se estima que un 53% de la población se 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).

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 el canal del cerdo contaminado y la práctica frecuente de matanza clandestina en animales de traspatio.

Los principales fármacos utilizados para tratar la parasitosis son los benzimidazoles, y actualmente se están buscando alternativas como los inmunógenos, principalmente el de 45kDa de *T. spiralis* para inducir una respuesta inmune protectora, así como para el

diagnóstico precoz de Trichinellosis, al igual que el antígeno soluble total (AST) ya que es difícil porque sus manifestaciones clínicas son comunes con otras enfermedades en su mayoría gastroentericas.

La prueba intradérmica (IDR) que mide la reacción de hipersensibilidad cutánea de tipo retardada (RHC) es una prueba útil para muchos microorganismos, por lo cual se pretende estandarizar para el diagnóstico de Trichinellosis.

El objetivo del estudio fue evaluar la respuesta de hipersensibilidad retardada del inmunógeno de 45kDa de *Trichinella spiralis* para el diagnóstico de Trichinellosis por medio de intradermorreacción evaluando la Triple Respuesta de Lewis.

Material y metodos

Se utilizaron 42 murinos (ratas) hembras de la cepa Long Evans de aproximadamente 2 meses y medio de edad, para formar los grupos: 1) control sano, 2) control infectado, 3) inmunizado vía parenteral e infectado, 4) infectado e inmunizado vía parenteral, 5)inmunizado vía sublingua e infectado y 6) infectado e inmunizado vía sublingual. A los grupos experimentales con inmunizaciones se les aplicaron 4 dosis: al día 1, 7, 14 y 21 y al día 28, para la vía parenteral (intramuscular, subcutánea, intramuscular y peritoneal), se infectó con carne con 500 LI de *T. spiralis*, Para la evaluación de hipersensibilidad retardada se practicó la prueba de intradermorreacción la cual se llevó a cabo en el dorso del animal, previamente eliminado el pelo, la aplicación fue con jeringa de insulina del 100 unidades, 10 µg de proteína y se analizó la zona de observación a las 2, 6, 24 y 48 horas y se evaluó la triple respuesta de Lewis (eritema, calor e induración) la induración fue medida con micrómetro manual de la marca Vervier y la temperatura con la ayuda de termómetro digital infrarrojo de la marca Médica home care. (Moreno 1996).

El antígeno de 45kDa fue obtenido por medio de elución de bandas de geles de poliacrilamida reduciendo en condiciones del 10%, por medio de electroforesis (SDS-PAGE), por medio de la separación proteica del Antígeno Soluble Total (AST) de *T. spiralis*, el AST 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 antígenicos, el homogenizado se verificó y se ecentrifugo a 3500 rpm por 1.5h y se utilizó inhibidor de proteasas AEBDF Sigma (4-(2-Aminoethyl) benzenosulfonyl fluoride hydrochloride) (Chávez et al. 2012, Muñoz 2013).

Para la determinación proteínas se obtuvo una curva estándar utilizando albúmina sérica bovina, según la metodología de Bradford, ajustando 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% (Bradford & Lancetti 1976), se procedió a la separación cromatográfica con el sistema nanoUPLC marca Waters modelo nanoAccquity con una columna de fase reversa C18 300micras x 150 mm, 2 micras y elución con un gradiente agua+0.1% Ac fórmico/ Acetonitrilo durante 125 minutos, la detección se realizó con un sistema de espectrometría de masas híbrido Cuadrupolo-tiempo de vuelo con resolución experimental aprox 10,000 y con interface electro Spray y con inyección de Glucofibrinopeptido como calibrador continuo a 100fmol/ml, del cual se tomó la masa 785.8426 como referencia para el ajuste de exactitud de masas, cabe señalar que el control y adquisición de datos crudos se hizo con el software MassLynx vers 4.1, se procedió entonces al procesamiento de datos. El cromatograma obtenido fue exportado al servidor para ser procesado con el software PLGS vers 2.4. Se obtuvo secuenciación de la proteína por medio del software ProteinLinx Global Server (PLGS), para después hacerlo con un método de proceso donde se usó la base de datos específica 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, se realizó el procesamiento de datos del cromatograma obtenido este fue exportado al servidor para ser procesado con el software PLGS vers 2.4 obteniéndose dos proteínas: una de 45940 Daltons (Multicystatinlikedomainprotein OS T.S GN mcd PE 2 SV 1) y 46607 Daltons (excretory secretory antigen OS *Trichinella spiralis* GN Gp 53 PE 2 SV) (Chávez 2013).

La carne con LI de *T. spiralis* fue obtenida de ratas de conserva del bioterio de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas, las cuales son una cepa mestiza del primer

brote de Trichinellosis en humanos en Zacatecas y encontrados en cerdos, perros y ratas de libre muestreo (Fragoso et al. 1983, Franco et al. 2012).

El trabajo experimental en animales se llevó a cabo bajo la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 de las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorios, donde se siguieron las especificaciones de cuidado, administración de sustancias, obtención de muestras sanguíneas así como el sacrificio humanitario.

Resultados

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 específica de *Trichinella spiralis*, esta a su vez fue obtenida de la Universal Uniprot-SwissProt. A través de este análisis afirmaron que los péptidos identificados, tienen más del 95% de confiabilidad y masas exactas menores a 10ppm. Se realizó el procesamiento de datos del cromatograma obtenido este fue exportado al servidor para ser procesado con el software PLGS vers 2.4 (Chávez 2013). 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.

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.

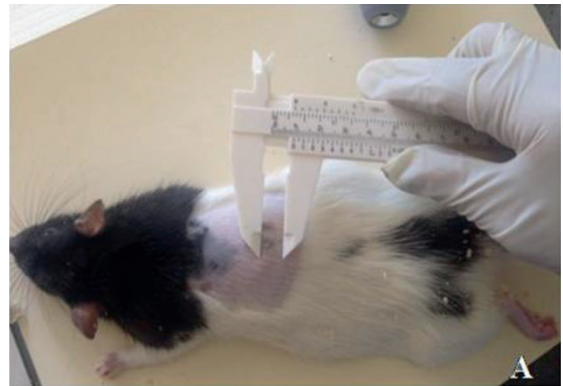


Figura 1. Evaluación de la triple respuesta le Lewis
A) medición de la induración,
B) medición de la temperatura

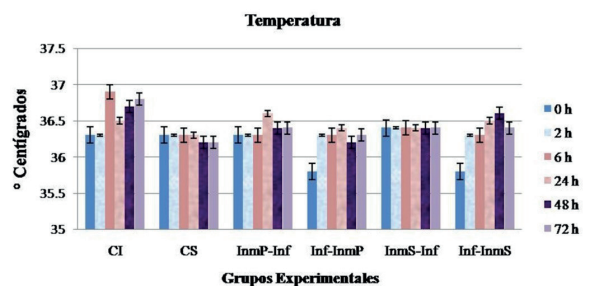


Figura 2. Gráfica de la temperatura presentada por intradermorreacción a diferentes tiempos

(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)

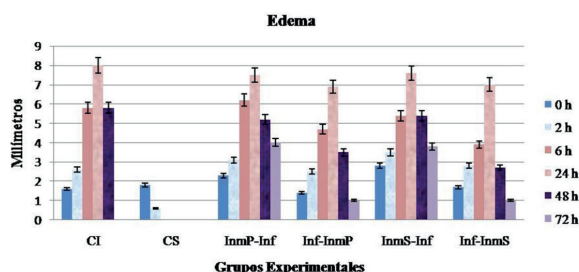


Figura 3. Gráfica del edema presentado en cada uno de los murinos

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

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, donde presentó un $P < 0.05$ mostrando que es estadísticamente significativo, con un nivel de confianza del 95%.

Discusión

La Trichinellosis como enfermedad parasitaria zoonótica, 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 transmitidas por alimentos con mayor impacto mundial (OMS 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).

La elección de hembras para el estudio experimental se debe a que estudios realizados por Flisser et al. (2002) encontró 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.

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 potencial 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 citocinas (TNF – factor de necrosis tumoral e interferón gamma) y por linfocitos (Madero & 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

1), pudimos clasificar nuestros resultados como positivos a las 24h y los mayores a 6mm.

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 equinocociasis
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 bartonellosis
Ito-Reenstierna	48h	Induración de 7mm	Infección por <i>H. ducreyi</i>
Frenkel	48h	Induración de 5mm	Toxoplasmosis

Tabla 1. Interpretación de Intradermorreacciones

Conclusion

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.

Agradecimientos

Allaboratorio de Biología Celular y Microbiología de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

Referencias

- Bradford H, Lancetti A. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle dye binding. *Anal. Biochemistry*. 1976; 72:248-254.
- Bruschi, F. Y Dupouy-Camet, J. Helminth Infections and their impact in global public health. Springer. 2014.
- Cabarcos A, Lado F, Pestoni C, Lorenzo V. Utilidad de los tests cutáneos (mantoux y prueba de hipersensibilidad retardada) en la infección por VIH. *An Med Int*. 2001. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992001001200008
- Cabarcos A, Lado F, Gómez A, Regueiro M. Pruebas cutáneas y tuberculosis: aplicación e indicaciones en la profilaxis, con especial incidencia en la coinfección con el VIH. *Medicina Integral*. Elsevier. 2002. <http://www.elsevier.es/ese-13029947>
- Chávez EG. 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. 2013.
- Chávez F. 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 maestría. 2012.
- Chávez F, Chávez I, Muñoz J, Reveles R, Morales M, Moreno A. Caracterización de la respuesta inmune e histológica de ratas Long Evans infectadas con *Trichinella spiralis* y tratadas con albendazol e ivermectina. *Rev Ibero-Latinoam Parasitol*. 2013; 1: 75-81.
- Chu KB, Kim S, Lee SH, Joo KH, Lee K, Lee Y, Zheng S, Quan F. Enhanced protection against *Clonorchis sinensis* induced by co-infection with *Trichinella spiralis* in rats. *Parasit Immunol*. 2014; 36: 522-530.
- Cui J, Wang L, Sun G, Liu LN, Zhang SB, Liu RD, Zhang X, Jiand P, Wang ZQ. Characterization of *Trichinella spiralis* 31 kDa protein and its potential application for the serodiagnosis of Trichinellosis. *Acta Tropica*. 2014; 142: 52-63.
- Díaz C, Mejía P, Moral L. El mercado de la carne de cerdo en canal en México. *Análisis Económico*. 2007; 51: 273-287.
- Flisser A, Velasco A, Martínez C, González F, Briseno B, García R, Caballero A, Hernández I, García H, Gutiérrez L. Infectious diseases in México. A survey from 1995-2000. *Arch Med Res*. 2002; 33: 334-350.
- Fragoso R, Tavizón P, Villacaña H. Un brote de triquinosis (triquinelosis) en laguna de carretero, Zacatecas. *Salud Pública*. 1983; 23: 24-41.
- Franco SL, Caballero GM, Reveles HG, Moreno GM, Jiménez C. Molecular similarities and differences between *Trichinella spp.*, isolated from canine skeletal muscle in Zacatecas, México. *Exp Parasitol*. 2012; 131: 148-152.
- Gajardhar AA, Pozio E, Gamble HR. *Trichinella diagnostics* and control: mandatory and best practices for ensuring food safety. *Vet Parasitol*. 2009; 23:197-205.
- Gao F, Wang R, Liu M. *Trichinella spiralis*, potential model nematode for epigenetics and its implication in metazoan parasitism. *Front Physiol*. 2014; 4:1-5.
- Gu Y, Wei J, Yang J, Huang J, Yang X, Zhu X. Protective Immunity against *Trichinella spiralis* infection induced by a Multi-epitope Vaccine in a Murine Model. *PLOS ONE*. 2013; www.plosone.org.
- Ilic N, Gruden-Movsesijan A, Sofronic-Milosavljevic L. *Trichinella spiralis*: shaping the immune response. *Immunology in Serbia*. 2012; 82:111-119.
- Lia C, Liu M, Bai X, Liu P, Wang X, Li T. Characterisation of a plancitoxi-1-like DNase II gene in *Trichinella spiralis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014; 8:8.
- Madero M, Madero J. El sistema immune cutáneo. *Dermatología Práctica*. http://www.medicosecuador.com/librodermatologia/capitulos/capitulo_3.htm. 2002.
- Molina V, Albarracín S, Krivokapich S, Chiosso C, Mancini S, Bigatti R, Arbusti P, Avila A, Larrieu E. Seroepidemiología y control de Trichinellosis en credos en Sierra Grande, Argentina. *In Vet*. 2012; 14(1): 33-40.

Moreno A, Ávalos E, Muñoz J, Herrera R. Detención de Antígenos Inmunodominantes de *Trichinella spiralis* en conejo como modelo experimental. *Inv Cient.* 1996; 9: 5-8.

Muñoz J. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de la resiniferatoxina en fase intestinal en la infección por *Trichinella spiralis* en modelo murino. Universidad Autónoma de Zacatecas. Tesis de maestría. 2013.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial Mexicano.*

Rivera J, Losada H, Cortés J, Grande D, Vieyra J, Castillo A, González R. Cerdos de traspatio como estrategia para aliviar pobreza en dos municipios conurbados al oriente de la Ciudad de México. *Liv Res Rur Dev.* 2007; 9:7.

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

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

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

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

Yang Y, Qin W, Qiu H, Liu Y. Characterization of TsDAF-21/HSP90 protein from the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Parasitol Res.* 2014; 113:2209-2217.