



**Universidad Central de
Venezuela
Facultad de Ciencias
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**Estudio de la respuesta de anticuerpos específicos de tipo IgE contra
Ascaris lumbricoides en comunidades rurales del Estado Miranda.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad
Central de Venezuela, por la bachiller Sonia
Pestana De Ascensao como requisito parcial
para optar al título de Licenciado en Biología

Caracas, Venezuela

FEBRERO - 2011

ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS DE TIPO IgE CONTRA *Ascaris lumbricoides* EN COMUNIDADES RURALES DEL ESTADO MIRANDA.

RESUMEN.

La ascaridiasis es una infección cuyo agente etiológico es el parásito llamado *Ascaris lumbricoides*, el cual es el más grande de los nemátodos que parasita el intestino humano. En Venezuela la infección por *A. lumbricoides* es la geohelmintiasis de mayor importancia en salud pública, por su alta frecuencia, morbilidad, la determinación de complicaciones graves y la producción de altos niveles de la Inmunoglobulina E.

En este trabajo se estudió la respuesta específica de anticuerpos de tipo IgG e IgE contra extractos de vermes adultos de *A. lumbricoides* en el suero de 117 individuos, de los cuales el 95% fueron niños de comunidades rurales del Edo. Miranda y 2 hospitales de la ciudad de Caracas.

De los 117 individuos estudiados, 74 resultaron ser positivos para *Ascaris lumbricoides*, de los cuales 40 individuos poseían a la par otra (as) parasitosis, y según su porcentaje de incidencia se presentaron en las siguientes proporciones : 28 % presenta *Trichuris trichiura*, 23 % presentó *Blastocystis hominis*, 19 % presentó *Giardia duodenalis*, con un 13 % que presentan las parasitosis *Entamoeba histolitica/dispar* y *Entamoeba coli* y finalmente en un 2% se presentan individuos parasitados a la par con *Strongyloides stercoralis* y huevos de anquilostomidio.

Se reportó en el perfil proteico un total de 16 bandas proteicas con masas moleculares de 148,48; 101,24; 95,19; 75,95; 67,26; 60,60; 56,29; 53,24; 51,10; 44,77; 41,15; 39,68; 34,77; 32,53; 31,51 y 26,3 kDa.

Los resultados de los ensayos de ELISA a partir de los antígenos del extracto soluble de *Ascaris lumbricoides*, indican que diferentes proteínas como la de 41 kDa presentes en este extracto podrían estimular la producción de IgE en los niños estudiados.

Palabras Claves:

Parasitosis, Helmintos, Inmunoglobulinas, Perfil Proteico.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

ABA-1: Ascaris Body Allergen. Proteína unida a un ácido graso, presente en *Ascaris lumbricoides* entre otros nemátodos.

Ac: Anticuerpo.

Ag: Antígeno.

Asc. l: *Ascaris lumbricoides*

(BCIP/NBT): Bromocloroindolil fosfato / nitroblue tetrazolium.

BSA: Albúmina de suero de bovino.

CPA: Célula presentadora de antígeno.

D.O.: Densidad óptica.

D.S.: Desviación estándar.

DTT: Ditionitrosol.

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay).

FA: Fosfatasa alcalina.

GM-CSF: Factor estimulador de la formación de colonias de gametocitos y macrófagos

IFN γ : Interferón Gamma.

Ig: Inmunoglobulina.

IgS: Inmunoglobulina sérica,

IgE: Inmunoglobulina E

IgG: Inmunoglobulina G

IL: Interleuquinas

LPC : Líquido pseudocelómico.

LT : Linfocitos T.

NK: Células Natural Killers, Células asesinas.

NPA: Poliproteínas alergénicas de nemátodos.

NSOP: No se observaron parásitos.

OP: otras parasitosis

PBS : Buffer Fosfato Salino

PVDF : Polivinildenedifloride.

rABA-1A : Proteína recombinante ABA-1

RI: Respuesta inmunitaria.

SDS PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

SI: Sistema Inmunitario.

TBS: Buffer Tris Salino.

Tc: Linfocitos T citotóxicos.

Th: Linfocitos T colaboradores.

TcR: Receptor de Linfocitos.

TMB: Tetrametilbenzidina.

TNF: Factor de Necrosis Tumoral.

Treg: Linfocitos T reguladores

WB: Western Blot

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
ÍNDICE GENERAL	ii
ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS	v
I.-INTRODUCCIÓN	0
I.- 1. <i>Ascaris lumbricoides</i> Generalidades	11
II.-MARCO TEÓRICO	14
II.- 1. Taxonomía.	14
II.- 2. Morfología.	14
II.- 3. Ciclo de vida de <i>A. lumbricoides</i>	19
II.- 4. Patología, signos y síntomas.....	22
II.- 5. Tratamiento de las parasitosis helmínticas	24
II.- 6. Respuesta inmunitaria contra <i>A. lumbricoides</i>	25
II.-7. Relación entre <i>Ascaris lumbricoides</i> y la Alergia	39
II.- 8. Antígenos de <i>Ascaris lumbricoides</i>	43
II.- 9. Justificación	46
III.- OBJETIVOS	48
III.- 1. GENERAL	48
III.- 2. ESPECÍFICOS	48

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS.	49
IV.- 1. Población de estudio.	49
IV.- 2. Diagnóstico Parasitológico.	49
IV.- 3. Parásito.	50
IV.- 4. Preparación del extracto.	50
IV.- 5. Determinación de concentración de proteínas.	50
IV.- 6. Separación de las proteínas del extracto soluble por electroforesis en geles de poliacrilamida.	50
IV.- 7. Transferencia de proteínas a membranas de Polivinildenedifloruro (PVDF).	52
IV.- 8. Identificación de las proteínas inmunogénica mediante Western Blot	53
IV.- 9. Cuantificación de la respuesta específica de anticuerpo IgG e IgE mediante la técnica ELISA.	54
IV.- 10. Análisis estadístico.	56
V.- RESULTADOS.	58
V.- 1. Población estudiada.	58
V.- 2. Distribución de los individuos seleccionados.	59
V.- 3. Perfil Electroforético del extracto soluble de <i>Ascaris lumbricoides</i> .	62
V.- 4. Estudio de la Reactividad Serológica.	63
V.- 5. Evaluación del extracto soluble de <i>Ascaris lumbricoides</i> .	64
VI.- DISCUSIÓN	86

VII.- CONCLUSIONES.....	95
VIII.- APÉNDICES.	97
IX.- BIBLIOGRAFÍA	100
IX.- 1. Referencias bibliográficas.....	100
IX.- 2. Consultas en línea:	119
X.- ANEXOS	122

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1: Vermes adultos de <i>Ascaris lumbricoides</i>	16
Figura 2: Huevo fecundado de <i>Ascaris lumbricoides</i>	17
Figura 3: Huevo no fecundado de <i>Ascaris lumbricoides</i>	18
Figura 4: Ciclo de vida de <i>Ascaris lumbricoides</i>	21
Figura 5: Respuesta Innata y Adaptativa.	27
Figura 6: Respuesta inmune humoral y celular.....	29
Figura 7: Estructura de la Inmunoglobulina E.	33
Figura 8: Influencia de diferentes citoquinas y factores de transcripción que permiten la diferenciación de subpoblaciones T como: Th1, Th2, Treg.....	37
Figura 9: Distribución de la población estudiada por grupos.	58
Figura 10: Distribución de los individuos seleccionados por poblacion.....	59
Figura 11: Proporción del porcentaje de individuos seleccionados en relacion al sexo.	61
Figura 12: Distribución de las parasitosis asociadas a la presencia de <i>Ascaris lumbricoides</i>	62
Figura 13: Perfil Electroforético de las proteínas del extracto soluble de <i>Ascaris lumbricoides</i>	63
Figura 14: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgG (Exp. 0210).....	66

Figura 15: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgG (Exp. 0907).....	67
Figura 16: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgG (Exp. 1407).....	67
Figura 17: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgG (Exp. 1507).....	68
Figura 18: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgG (Exp. 1607).....	68
Figura 19: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgG (Exp. 2709).....	69
Figura 20: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgG (Exp. 2909).....	69
Figura 21: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgG (Exp. 3009).....	70
Figura 22: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgE (Exp. 2804).....	71
Figura 23: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgE (Exp. 1805).....	72
Figura 24: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgE (Exp. 0807).....	72
Figura 25: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgE (Exp. 1407).....	73

Figura 26: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgE (Exp. 1507).....	73
Figura 27: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgE (Exp. 1607).....	74
Figura 28: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgE (Exp. 2709).....	74
Figura 29: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgE (Exp. 2909).....	75
Figura 30: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgE (Exp. 3009).....	75
Tabla I: Valores de D. O. y puntos de corte para la cuantificación de IgG e IgE.....	76
Figura 31: Dispersión de los sueros positivos y negativos para la IgG contra <i>Ascaris lumbricoides</i> en individuos positivos para <i>Ascaris lumbricoides</i>	78
Figura 32: Dispersión de los sueros positivos y negativos para la IgG contra <i>Ascaris lumbricoides</i> en individuos positivos para <i>Ascaris lumbricoides</i> más otras parasitosis.	78
Figura 33: Dispersión de los sueros positivos y negativos para la IgG contra <i>Ascaris lumbricoides</i> en individuos positivos para otras parasitosis sin <i>Ascaris lumbricoides</i>	79
Figura 34: Dispersión de los sueros positivos y negativos para la IgG contra <i>Ascaris lumbricoides</i> en individuos no parasitados.	79

Figura 35: Promedio de los valores de Densidades Ópticas obtenidas para los diferentes grupos evaluados, contra el conjugado del anticuerpo IgG y sus respectivas desviaciones estándar.	80
Figura 36: Dispersión de los sueros positivos y negativos para la IgE contra <i>Ascaris lumbricoides</i> en individuos positivos para <i>Ascaris lumbricoides</i>	81
Figura 37: Dispersión de los sueros positivos y negativos para la IgE contra <i>Ascaris lumbricoides</i> en individuos positivos para <i>Ascaris lumbricoides</i> más otras parasitosis.	81
Figura 38: Dispersión de los sueros positivos y negativos para la IgE contra <i>Ascaris lumbricoides</i> en individuos positivos para otras parasitosis sin <i>Ascaris lumbricoides</i>	82
Figura 39: Dispersión de los sueros positivos y negativos para la IgE contra <i>Ascaris lumbricoides</i> en individuos no parasitados.	82
Figura 40: Promedio de los valores de Densidades Ópticas obtenidas para los diferentes grupos evaluados, contra el conjugado del anticuerpo IgE y sus respectivas desviaciones estándar.	83
Figura 41: Número de reconocimiento de las proteínas presentes con mayor incidencia para IgG dentro del grupo de pacientes estudiados.	84
Figura 42: Número de reconocimiento de las proteínas presentes con mayor incidencia para IgE dentro del grupo de pacientes estudiados.	85

I.-INTRODUCCIÓN

I.- 1. *Ascaris lumbricoides* Generalidades

La ascaridiasis es una infección cuyo agente etiológico es el parásito llamado *Ascaris lumbricoides* (del griego Askarís, que significa gusano), el más grande de los nemátodos que parasita el intestino humano. Un parásito es un organismo que se beneficia de otro al obtener los nutrientes de los tejidos vivos del hospedador, sin daño tisular o muerte del hospedador. En la mayoría de los casos, los parásitos dañan o causan enfermedades al organismo hospedante (Markell y col., 1994; Solomon y col., 1996; Quintero-Victoria y col., 2008)

Se estima que en el mundo hay más de 1 billón de individuos infectados con parásitos helmintos, que habitan principalmente las áreas tropicales del globo terráqueo y los países menos desarrollados, en donde las condiciones socio-económicas limitantes, particularmente la falta de una infraestructura sanitaria apropiada, constituye uno de los factores más relevantes en la alta prevalencia que aun se observa, particularmente en comunidades rurales, en cuyas áreas generalmente las medidas higiénicas no son practicadas de manera adecuada (O'Lorcain y Holland, 2000; Nelson y Darby, 2001; Di Prisco y col., 2006).

La ascariasis es considerada una de las diez infecciones parasitarias más comunes a nivel mundial, calculándose que existen entre 800 y 1000 millones de individuos infectados, y aunque la mortalidad es relativamente baja las

complicaciones frecuentemente requieren de atención hospitalaria (Escalante y col., 2005; Stranieri y col., 2009).

La mayor prevalencia e intensidad de dicha parasitosis se alcanza durante la infancia, específicamente en la vulnerable edad escolar. La morbilidad es proporcional a la infección y ésta se caracteriza comúnmente por el poli parasitismo. Las infecciones crónicas pueden conducir a un largo retardo en el desarrollo físico y mental, y solo en casos severos, a la muerte (Lynch y col., 1998; Gibiaqui, 2007).

Desde el punto de vista epidemiológico, la intensidad parasitaria se encuentra relacionada a la morbilidad y al desarrollo de la sintomatología, aun más que a la prevalencia, siendo el ambiente el mayor modulador de esta última (Crompton, 1994; O'Lorcain y Holland, 2000).

En Venezuela, la infección por *Ascaris lumbricoides* es la geohelmintiasis de mayor importancia en salud pública, por su alta frecuencia, morbilidad y la determinación de complicaciones graves (Lynch y col., 1998; Ortiz y col., 2000; Hagel y col., 2006; Díaz, y col., 2009).

En 1960, se estimaba que en el mundo habían 644 millones de personas infectadas con *Ascaris lumbricoides* (30%), 355 millones con *Trichuris trichiura* (16%) y 457 millones con ancilostomídeos (21%), todos nemátodos. Para el año 1997 se consideró que habían 1273 millones de personas infectadas con *A. lumbricoides* (24%), 902 millones (17%) con *T. trichiura* y 1277 millones (24%) con ancilostomídeos (Devera y col., 2005). Podemos observar así que ésta parasitosis no

es reciente y desde hace años el porcentaje de individuos infectados por nemátodos es un número representativo.

Según el Ministerio de Salud y Desarrollo Social, entre 1990 y 2002, en nuestro país prevaleció una tasa aproximada del 49,25% de helmintiasis, aproximadamente identificando las especies como: *Trichuris trichiura* 25,82%, *Ascaris lumbricoides* 5,75% y *Necator americanus* en menor proporción (Rodríguez y col., 2005).

La mayor prevalencia y frecuencia de reinfecciones se observa en el ambiente rural, donde estas infestaciones son endémicas a pesar de los esfuerzos terapéuticos de mantener dicha enfermedad controlada, ya que la recuperación no llega a ser total, retardando el crecimiento en el caso de los infantes. Se ha determinado que factores ambientales podrían contribuir al deterioro en la estructura social y económica que afecta la salud alimentaria del venezolano y a su vez esta influye negativamente en el crecimiento y desarrollo de los niños, y posiblemente de los pueblos que habitan en comunidades rurales (Lynch y col., 1998; MSDS, 1999; Hagel y col., 2001).

Es importante mencionar que la incidencia de las parasitosis intestinales dependen de varios factores, tales como: la edad, el nivel socio-económico y las condiciones higiénicas sanitarias generales. Varios investigadores reportan que la alta incidencia de las parasitosis intestinales se presentan a muy temprana edad, comunidades con altos niveles de pobreza y las condiciones higiénicas sanitarias inapropiadas. (Lynch y col., 1993; Lynch y col., 1998; Hagel, 2001; Díaz y col., 2009).

II.-MARCO TEÓRICO

II.- 1. Taxonomía.

A continuación se describe la taxonomía según Linnaeus, 1758

Reino: Animalia,

Phylum: Nematoda,

Clase: Secernentea,

Orden: Ascaridida,

Familia: Ascarididae,

Género: *Ascaris*,

Especie: *Ascaris lumbricoides*.

II.- 2. Morfología.

Ascaris lumbricoides es un nemátodo intestinal, un gusano redondo, de color blanco o rosado nacarado, de cuerpo largo, cilíndrico, no segmentado y con simetría bilateral, sus extremidades son afiladas, sobretudo en la región anterior. Como todo nemátodo es pseudocelomado (presenta un falso celoma) y posee una pared del cuerpo con epidermis sincitial sin separación del protoplasma (Bodini y Rada, 1980; Rey, 1991; Rojas y col., 2006).

La cubierta externa del gusano adulto, la cual es muy resistente, está formada por la cutícula, que tiene una composición escleroproteica lisa. Bajo la cutícula, se encuentran varias capas musculares conformadas por la actina y la miosina que rodean el pseudocelo, el cual es un espacio compuesto de líquido que funciona como un esqueleto hidrostático, favoreciendo la distribución de nutrientes y la recolección de productos de excreción y donde también se encuentran las gónadas. Todos los órganos son de tipo tubular y “flotan” dentro de este líquido (Rey, 1991; Rojas y col., 2006).

Los sistemas de órganos internos consisten en un cordón nervioso complejo compuesto por ganglios conectados alrededor del esófago, y un sistema digestivo bien desarrollado con cápsula bucal de 3 labios dispuestos entre ellos, esófago, intestino y ano o cloaca (donde no hay separación de orina y heces). No poseen sistema circulatorio, de manera que, para mover el líquido interno deben mover el cuerpo para hacer presión hidrostática (Bodini y Rada, 1980; Rey, 1991).

Son dioicos, es decir presentan los sexos en organismos separados y con dimorfismo sexual (Figura 1). Las hembras son más grandes y gruesas que los machos, midiendo entre 20-35 cm y 15-30 cm, respectivamente, con un ancho de aproximadamente 4 mm, presentando la parte posterior ligeramente encorvada. Los machos son reconocidos fácilmente por su curvatura ventral, o la disposición espiralada de su extremidad caudal, donde se ubica la espícula copulatoria (Rey, 1991).

La ascariasis es considerada una verdadera zooantroponosis, casi una antroponosis estricta, cuyo reservorio es por tanto el ser humano. El parásito puede alojarse libremente en el intestino delgado, principalmente en el yeyuno e íleon, donde se mueve constantemente en sentido contrario a la corriente generada por los movimientos peristálticos, evitando ser arrastrados gracias a su potente musculatura. La hembra fecundada es capaz de producir hasta 200.000 huevos por día, los cuales son eliminados junto con las heces, los huevos fértiles, maduraran en el suelo, volviéndose infecciosos (Solomon y col., 1996; Acuña y col., 2001; Gutiérrez y Orlich, 2004).

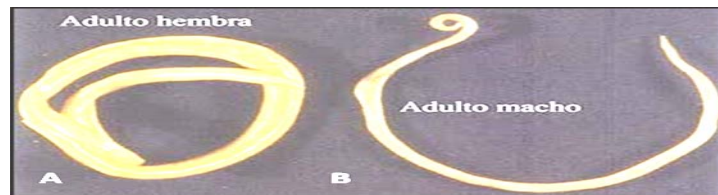


Figura 1: Vermes adultos de *Ascaris lumbricoides*.

Morfología de los vermes adultos hembra (A) y macho (B); Se observa la hembra más gruesa que el macho, el cual presenta menor tamaño y grosor (Rey, 1991) http://1.bp.blogspot.com/_G8kpFmtoA9w/TAQAYUWZ8hI/AAAAAAAAAAM/DXFPn1Jiyh4/s1600/Adultos_ascaris.jpg

Huevos de *Ascaris lumbricoides*

Según varios investigadores, Chandler y Read, (1965), Bardón (1992), y Tay, (1993), se pueden observar dos tipos de huevos, los fecundados y los no fecundados. Los huevos fecundados (Figura 2) son de sección elíptica (anchos y ovoides), poseen una cápsula gruesa y transparente que los protege, formada a su vez por tres capas:

- La **interna** o membrana vitelina, la cual es inerte, de naturaleza lipídica y debido a su impermeabilidad impide el paso de sustancias tóxicas del medio ambiente que puedan afectar al embrión.
- La **media**, derivada del glucógeno, es gruesa y transparente.
- La **externa** albuminoidea, con múltiples mamelones (pequeñas prominencias carnosas), que suelen teñirse de color café cuando entra en contacto con pigmentos biliares.

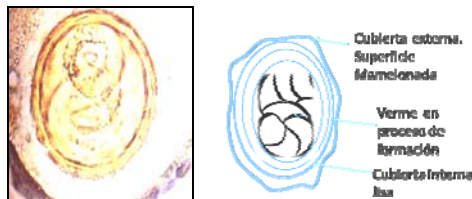


Figura 2: Huevo fecundado de *Ascaris lumbricoides*.

A la izquierda se observa un huevo de *Ascaris lumbricoides* fecundado, distinguiéndose sus diferentes partes, a través de un microscopio óptico (x 400). A la derecha señalización y descripción de las diferentes partes del huevo observado a la izquierda. Tomado y modificado de: <http://parasitologiaclinique.blogspot.com/2010/05/ascaris-lumbricoides.html>

Los huevos no fecundados poseen una cápsula delgada, con una capa albuminoidea muy reducida, irregular o ausente (Figura 3).

Para ambos huevos, el interior presenta una masa amorfa de citoplasma. Los huevos fecundados miden de 40 a 80 micras de largo por 25 a 50 micras de ancho (Rey, 1991). Los huevos no fecundados son depositados por las hembras que no se

aparearon con los machos; son más largos y estrechos. Como se mencionó anteriormente no tienen membranas vitelinas o es muy escasa, la cubierta es muy delgada y generalmente carecen de mamelones. Su estructura interna consiste en una masa de gránulos desorganizados, altamente refringentes y de varios tamaños. Miden de 85 a 90 micras de longitud por 30 a 40 micras de ancho (Chandler y col., 1965; Beaver y col., 1986; Bardón, 1992; Tay, 1993).

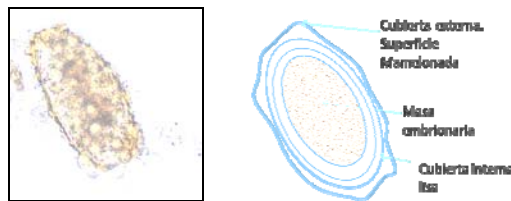


Figura 3: Huevo no fecundado de *Ascaris lumbricoides*.

A la izquierda se observa un huevo de *Ascaris lumbricoides* no fecundado, distinguiéndose sus diferentes partes, a través de un microscopio óptico (x 400). A la derecha señalización y descripción de las diferentes partes del huevo observado a la izquierda. Tomado y modificado de: <http://paralosparasitosdelavida.blogspot.com/2010/10/ascaris-lumbricoides-clasificacion-y.html>

Los huevos de *Ascaris lumbricoides* son más resistentes al ambiente que los huevos de *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale* o de *Trichuris trichiura*. Se ha descrito que si las condiciones ambientales son favorables (temperatura entre 15 °C a 35 °C, presencia de oxígeno, humedad (85% a 95%), sombra y suelos arcillosos) sobreviven durante períodos de hasta 15 años. Aún en condiciones extremas, se ha reportado que estos sobreviven largos períodos de tiempo favoreciendo así la

permanencia del parásito, como es el caso de los huevos encontrados en una urna funeraria precolombina en Maracay Edo. Aragua, en 1958 y en coprolitos (heces fosilizadas) en Bélgica, en el 2001 (Romero y col., 1998; Loreille y col., 2001). Los huevos son también muy adherentes y se fijan fácilmente a frutas, verduras, partículas de tierra y polvo, moco nasal, juguetes de niños, billetes de banco, moscas, cucarachas, entre otros sustratos (Solomon y col., 1996; Acuña y col., 2001; Scott, 2008).

II.- 3. Ciclo de vida de *A. lumbricoides*

El ciclo de vida de *Ascaris lumbricoides* comienza cuando ocurre la ingestión accidental, por el hospedador (ser humano), de huevos larvados de segundo estadio por geofagia directa, o por el consumo de alimentos y bebidas contaminadas con los huevos infectantes. Una vez ingeridos, los huevos infectantes, pasados algunos días, llegan al duodeno. Por acción mecánica de la larva, la producción de enzimas capaces de destruir la membrana y el contacto con los jugos digestivos, dichos huevos eclosionan y dejan en libertad las larvas en el intestino, estas se desarrollan en cuatro estadios o mudas que consisten en el cambio del revestimiento cuticular, el cual va a definir el estadio del ciclo evolutivo (Figuera, 1997). Debido a su gran movilidad las larvas L1 y L2 o larvas infectantes, penetran y rompen la pared del intestino, invaden la mucosa duodenal, llegando a la circulación portal y se dirigen hacia el hígado. Una vez allí, regularmente permanecen entre 72 a 96 horas, luego migran a través del torrente sanguíneo y continúan su recorrido hacia el corazón y de allí parten hacia los pulmones, donde las larvas quedan atrapadas en los capilares pulmonares,

produciendo perforación alveolar y neumonitis eosinofílica mediada por las larvas que ya sufrieron nuevas mudas, dando origen a las larvas de tercer (L3) y cuarto (L4) estadio. Esta fase migratoria es responsable de las reacciones inflamatorias y de hipersensibilidad. Luego las larvas ascienden a través del árbol traqueo-bronquial, son expulsadas al toser y deglutidas, alcanzando nuevamente el intestino delgado, sitio en el cual maduran hasta gusanos adultos, alcanzando su madurez sexual y completando su ciclo de vida (Figura 4), (Acuña y col., 2001; Escalante y col., 2005; Scott, 2008; Díaz y col., 2009).

La maduración de los parásitos se completa cuando se diferencian en machos y hembras adultos. Luego se produce el acoplamiento, y cada hembra deposita desde 10.000 hasta 220.000 huevos por gramo de heces por día, después de la ingestión del elemento infectante. El período que transcurre desde la ingestión de los huevos hasta su detección en las deposiciones, fluctúa entre 10 y 11 semanas y los gusanos adultos poseen una vida media de 1 año a 6 años (Figuera, 1997; Scott, 2008).

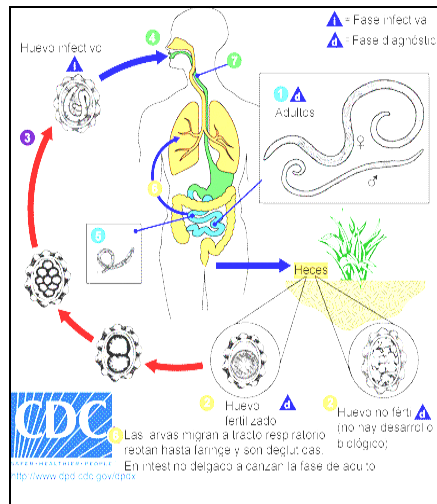


Figura 4: Ciclo de vida de *Ascaris lumbricoides*.

El ser humano como reservorio del parásito (1) al defecar en sitios inadecuados, deposita los huevos sin estadios larvales (estadio no infeccioso(d)) en el suelo (2) que si el mismo cumple con las condiciones de humedad, temperatura, pH, radiación solar, entre otros, y si el mismo ya ha sido fecundado previamente, (3), pasa a formar la larva L1 o “filarioide”, que al ser consumida vía oral (4), ya sea por el mal uso del agua, limpieza inadecuada de los alimentos y manejo de suelos sin protección, permita la infección al hombre por parte de estos huevos ya fecundados y en estado infeccioso (i), que luego de pasar por los jugos gástricos del organismo y encontrarse en altos niveles de pH, logran eclosionar (5) liberando la larva L1 “filarioide” y transformándose en L2 “rapidizoide”, la cual hace su tránsito por el hígado donde regularmente permanecen entre 72 a 96 horas. Posteriormente continúan su migración hacia el corazón, pasando a los pulmones a través de la circulación pulmonar, hasta llegar a los capilares pulmonares, donde quedan atrapadas. Allí, las larvas rompen el endotelio capilar y penetran en los alvéolos, ascendiendo por bronquiolos y bronquios a la faringe, para finalmente penetrar el intestino (6) para así fecundarse en caso de encontrarse ambos sexos o liberar los huevos vía heces al ambiente.

(http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/nematodos/imagenes/Ascariasciclo_CDC.jpg).

II.- 4. Patología, signos y síntomas.

El principal daño causado por *A. lumbricoides* es la reducción de la eficiencia alimenticia (Cooper, 2000; Hurtado, 2003). Las lesiones causadas dependerán de su estado evolutivo, ya que este parásito realiza un ciclo migratorio extra intestinal causando lesiones a nivel de los órganos a través de los cuales migra. Así los trastornos producidos por este parásito durante su ciclo de vida, son:

A. **Larvas migratorias.** La migración de las larvas de los nemátodos por el organismo desencadenan habitualmente eosinofilias muy elevadas (Capron y col., 1992). Esta migración puede afectar, sobre todo, el pulmón, constituyendo el síndrome de Löffler (neumonitis transitoria aguda). A nivel pulmonar puede determinar procesos inflamatorios del árbol respiratorio produciendo tos, bronquitis, neumonía, asma bronquial, urticaria, simular algunos síntomas de meningitis (agitación, cefalgia, vómitos, convulsiones), y en ocasiones fiebre (Tamayo y col., 2007; Díaz y col., 2009). Por otra parte el paso de las larvas por el hígado pueden producir hepatomegalia. Estas manifestaciones van a estar relacionadas con el número de larvas, el grado de susceptibilidad del paciente y la existencia de infecciones anteriores que hayan sensibilizado a este (Figuera, 1997; Gutiérrez y col., 2004).

B. **Vermes adultos.** Los vermes adultos a nivel del intestino delgado causan anorexia, dolores estomacales, cólicos intermitentes, nauseas, vómitos y pérdida del apetito. Algunas veces el parásito puede sufrir la acción de los

movimientos anti-peristálticos y ser expulsado por la boca o nariz, lo que se conoce como migración errática (WHO, 1987; Gutiérrez y Orlich, 2004; Quintero-Victoria y col., 2008).

Según varios investigadores (Figuera, 1997; Noemí, 1999; González y col., 1999; Di Prisco y col., 2006; Gutiérrez y col., 2004), una vez que la larva L4 llega al intestino delgado y se transforma en un gusano adulto se mantiene en el lumen intestinal, oponiéndose al peristaltismo, lo que produce:

1. **Lesiones traumáticas:** Son debidas a la acción de los labios del nemátodo sobre la mucosa intestinal, produciendo desde erosiones leves hasta ulceraciones múltiples de grado variable, provocando como consecuencia la penetración de ciertos gérmenes ocasionando una infección secundaria. El movimiento del parásito ocasiona también traumas a la mucosa.
2. **Acción tóxica:** Se atribuye a las excreciones del parásito, produciendo diversos trastornos alérgicos y nerviosos: bruxismo, prurito nasal y/o anal, trastorno del sueño, crisis de urticaria, etc.
3. **Acción mecánica:** Producida cuando existe un intenso parasitismo, pudiendo ocurrir oclusión intestinal y en casos excepcionales causar perforación intestinal. No es rara la migración del parásito a nivel de las vías biliares, el canal de Wirsung, apéndice, etc.
4. **Acción sobre el metabolismo:** Ocurre por la perturbación de la asimilación de proteínas y carbohidratos (causando ocasionalmente

hipoglicemia), influyendo negativamente sobre el crecimiento de los niños afectados.

5. **Acción exfoliadora:** Esta acción es realizada por el verme adulto, al dejar al niño u otro hospedador, sin los alimentos semi-digeridos. A este mecanismo se le denomina “exfoliador- ladrón”.

II.- 5. Tratamiento de las parasitosis helmínticas

Los principales fármacos para combatir las parasitosis helmínticas actúan sobre una proteína denominada tubulina. La tubulina está conformada por una familia de proteínas globulares (alfa (α), beta (β), gamma (γ) delta (δ), epsilon (ϵ) y zeta (ζ)) de 55 kDalton, que comparten entre un 35-40% de similitud entre sus cadenas de aminoácidos. Las tubulinas α y β son las subunidades esenciales de los microtúbulos, los cuales son estructuras que intervienen en diversos procesos celulares que involucran desplazamiento de vesículas de secreción, movimiento de orgánulos, transporte intracelular de sustancias, así como en la división celular (mitosis y meiosis) y que, junto con los microfilamentos y los filamentos intermedios, forman el citoesqueleto. Además, constituyen la estructura interna de los cilios y los flagelos (Mathews y col., 2003)

Los antiparasitarios usados comúnmente contra infecciones por *A. lumbricoides*, entre otros parásitos, son los benzoimidazoles (tiabendazol, mebendazol y albendazol) (Scarcella y col., 2007; Junquera, 2010). Estos producen inmovilización y muerte de los parásitos intestinales susceptibles, en forma lenta, por

lo que la eliminación de los parásitos destruidos, se completa en varios días, situación conveniente para evitar o disminuir los efectos adversos. El efecto primario ocurre por inhibición de la polimerización de microtúbulos del parásito, mediada por unión del fármaco a la beta tubulina (β -tubulina). Este efecto tóxico para los parásitos ocurre en concentraciones muy inferiores a las necesarias para unirse a la β -tubulina de células de los mamíferos (WHO, 1987; Tamayo y col., 2007).

Para combatir los problemas ocasionados por las infecciones de parásitos helmintos tanto en poblaciones animales como en humanos, se ha establecido el uso de agentes químicos para la lucha contra las geohelmintiasis, sin embargo, los helmintos han desarrollado mecanismos de resistencia al efecto destructivo que tenían estos tratamientos sobre ellos (Prichard y col., 1980; Stephenson y col., 1989; Sanger y Gill., 1999; Prichard y col., 2000). De esta forma, la disponibilidad de nuevos antiparasitarios podría estar comprendida por el progresivo aumento de los casos de resistencia, además por los crecientes costos en investigaciones y desarrollo de los mismos y también por la falta de conocimiento y competencia para el descubrimiento de nuevas drogas (Vial y col., 1999; Sanger y Gill, 1999).

II.- 6. Respuesta inmunitaria contra *A. lumbricoides*

Los seres vivos estamos expuestos continuamente a la agresión por microorganismos patógenos y agentes infecciosos, y requerimos de un sistema de defensa efectivo. Este sistema es el llamado Sistema Inmunológico (SI), y está constituido por tejidos, células y mediadores químicos, que en conjunto defienden de

las potenciales agresiones que puedan invadir el organismo y además es responsable de un conjunto de funciones indispensables para la supervivencia de los seres vivos. La función más importante es la capacidad para reconocer, eliminar y discriminar entre agentes propios y extraños (Corado y Mora., 2003). La acción eficaz del sistema inmunológico desencadena en el individuo la inmunidad, la cual describe un estado de resistencia frente a los agentes patógenos. La inmunidad puede ser de duración variable, esto sucede porque el sistema de defensa del organismo desencadena una serie de eventos celulares y humorales que colectivamente reciben el nombre de Respuesta Inmunitaria (RI), y que según las características de la reacción y los elementos que participan en ella se ha clasificado en RI innata y RI adaptativa (Figura 5) (Corado y Mora., 2003).

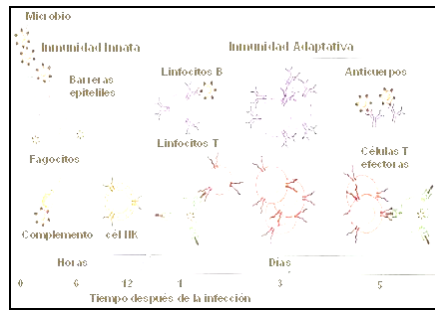


Figura 5: Respuesta Innata y Adaptativa.

El sistema inmunológico se puede clasificar en dos respuestas principales: el primero es la respuesta innata compuesto por barreras físico-químicas como la piel, las secreciones y los cilios; el complemento; los fagocitos; y las células natural killer (NK). La segunda es la respuesta inmune adaptativa más específico, que ocasiona la respuesta inmune humoral, mediada por linfocitos B, y la respuesta inmune celular, mediada por linfocitos T. La respuesta inmune innata es la primera que se activa cuando ingresa un agente invasor; después empieza a actuar la respuesta inmune adaptativa que da origen a los anticuerpos y linfocitos T que van a sensibilizarse y a actuar como células efectoras que reconocen el antígeno. (<http://www.medwave.cl/medios/atencionprimaria/atencionprimariainfantil/CursoExtPedHSBAediciones2006/VacunasIDFig1.jpg>)

La respuesta innata es la primera línea de defensa y se produce de manera inmediata ante cualquier señal de alarma detectada en el organismo. La interacción de los agentes invasores con los componentes de la RI innata, inducen procesos de reclutamiento y maduración celular, así como la liberación de mensajeros químicos que crean las condiciones para que se inicie la respuesta adaptativa.

La RI adaptativa se desencadena como consecuencia del reconocimiento de antígenos o inmunógenos específicos por las células linfoides de tipo T y B. Esta

respuesta es específica, genéticamente controlada y genera memoria inmunitaria (Abbas y Lichtman., 2004).

La respuesta inmunológica específica se caracteriza porque es efectiva ante aquellos antígenos frente a los cuales se ha iniciado y desarrollado. Este tipo de respuesta es mediada por los *linfocitos*. Los linfocitos son de dos tipos, como ya se había mencionado: *linfocitos B* y *linfocitos T*. Los linfocitos T, a su vez, pueden ser *linfocitos T colaboradores (Th)*, *linfocitos T citotóxicos (Tc)* y por algunos autores también se proponen los *linfocitos T reguladores (Treg)* (Corado y Mora, 2003; Abbas y Lichtman, 2004).

La respuesta inmunológica específica adaptativa, se considera que puede ser de dos tipos: humoral y celular (Figura 6). Aunque la separación de ambos tipos de respuesta es más de tipo didáctico que real, en general se considera que cuando el elemento efector final son las inmunoglobulinas producidas por los linfocitos B se trata de una respuesta tipo humoral, mientras que cuando participan los linfocitos T tanto Th como Tc, se trata de una respuesta tipo celular (Corado y Mora., 2003).

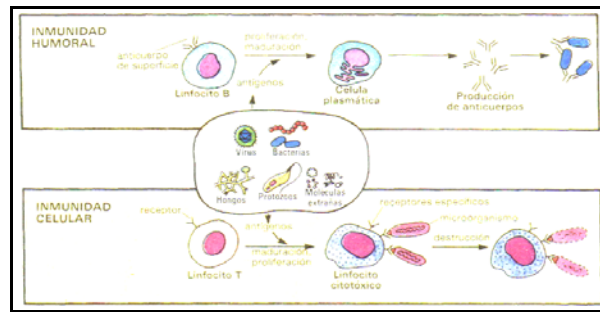


Figura 6: Respuesta inmune humoral y celular.

La respuesta humoral está dada por los linfocitos ubicados en la médula ósea, los que, por mecanismos propios del sistema inmune y del ambiente, originan las células B y éstas, al entrar en contacto con un antígeno, van a transformarse en células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas. En la respuesta inmunitaria celular hay distintas poblaciones: las células T colaboradoras (Th) que colaboran con la producción de anticuerpos y las células T citotóxicas (Tc) que tratan de eliminar el antígeno directamente y mediante adherencia de citoquinas. AnimacionesBio-Geo/WebBiologia08/barreras3.jpg).

Para que se inicie una respuesta se requiere el reconocimiento del antígeno por la célula presentadora de antígeno (CPA), y la activación de los linfocitos. Los linfocitos B reconocen los antígenos mediante inmunoglobulinas de membrana (Igs) mientras que los linfocitos T lo reconocen mediante una estructura especializada a tal fin conocida como receptor de linfocitos T (TcR). Para que los linfocitos se activen, se requiere además del reconocimiento del antígeno por los receptores de los linfocitos T, la participación de otras moléculas como son las moléculas accesorias y las interleuquinas. Si participa solo el TcR se produce anergia (no respuesta) (Abbas y Lichtman, 2004).

Los linfocitos T (LT) son los responsables de la inmunidad celular y según sus marcadores de membrana se conocen como linfocitos T CD3+, T CD4+ y T CD8+ (Bhaskaram, 2002; Amati y col., 2003). Los linfocitos T CD4 o colaboradores están clasificados en varios grupos Th1, Th2, y nuevas sub- poblaciones de LT como: Th17 y T reguladores, los cuales una vez activados comienzan a producir citoquinas o interleuquinas (IL), que difieren de las producidas por las células Th1 o Th2. Los linfocitos Th1 regulan la respuesta inmune celular y está basada fundamentalmente en la síntesis de IL2, de Interferón Gamma (INF γ) y del Factor de Necrosis Tumoral (TNF); mientras que los linfocitos Th2 se encargan de coordinar la respuesta de tipo humoral basada en la síntesis de IL4, IL5 e IL10 entre otras; produciéndose en ambos casos la proliferación y diferenciación de los linfocitos T y B respectivamente (Muñoz y col., 1995; Mosmann y Sad, 1996).

Las citoquinas, como moléculas efectoras de la respuesta inmunitaria permiten la comunicación entre diferentes clases de células y transmiten mensajes para iniciar o suprimir diferentes funciones, siendo algunas de éstas el crecimiento y la diferenciación celular, las reacciones inflamatorias y la modulación de la respuesta del sistema inmunitario. De acuerdo a sus funciones las citoquinas han sido categorizadas en aquellas producidas por macrófagos y células mononucleares (Linfocitos B, Monocitos, Macrófagos y células plasmáticas). Existe otro grupo de citoquinas producidas por los linfocitos T, las cuales regulan la inmunidad adquirida o adaptativa mediante la activación del crecimiento y diferenciación de diversas poblaciones linfocitarias, por lo que desempeñan un papel importante en la fase de

activación de la respuesta inmunitaria dependiente de células T. Entre estas citoquinas se encuentran la IL2, IL4, e IL10 (Asselin y col., 1997; Borish y Denver, 1998; Amesty-Valbuena y col., 2002)

Dentro de los componentes celulares y humorales de la respuesta inmunitaria, tenemos dos tipos de factores que como su nombre lo indica son factores celulares y humorales. Los factores humorales están formados por las citoquinas y anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig), los cuales son secretados por los linfocitos B en respuesta a la estimulación antigénica, produciendo la destrucción de muchos de los microorganismos extracelulares que se consideran de mayor importancia en las enfermedades infecciosas humanas (Janeway y col., 2000; Corado y Mora., 2003). Han sido identificadas 5 clases de inmunoglobulinas: IgG, IgD, IgM, IgA, IgE.

La inmunoglobulina G (IgG) es la inmunoglobulina más abundante de las inmunoglobulinas totales (80%), predominante en los fluidos séricos y que se difunde con facilidad hacia el espacio extravascular. La IgG se encuentra bajo la forma monómera y posee una cadena pesada γ . Su fórmula molecular se representa de la siguiente manera: γ_2/κ_2 y $2/\lambda_2$. Su peso molecular es de 150 kDa, siendo por tanto la inmunoglobulina más pequeña y pudiendo pasar fácilmente del sistema circulatorio a los tejidos. Posee dos valencias para el antígeno y su concentración sérica es de 8-16 mg/ml (Corado y Mora., 2003).

La IgG es la inmunoglobulina que posee la vida media más larga: 3-4 semanas. Existen en el humano 4 subclases de IgG: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, que se diferencian entre sí en la región bisagra, no solo por la secuencia de aminoácidos y la longitud de

la misma, sino también por el número de puentes disulfuro intercadenas pesadas y la disposición de los mismos en las uniones cadenas pesadas-cadenas ligeras. Se distinguen como propiedades importantes de la IgG, la actividad neutralizante, la activación del sistema del complemento por la vía clásica, la capacidad para atravesar la placenta produciendo un estado de inmunidad pasiva en el neonato de gran importancia en los primeros meses de vida y además actúa como coadyuvante en la fagocitosis (Janeway y col., 2000; Corado y Mora., 2003).

Los parásitos han desarrollado un sistema de adaptación que les permite evadir la respuesta inmune y así sobrevivir. La mayoría están bien adaptados a un determinado tipo de hospedador, y por ese motivo la mayoría no puede cumplir su ciclo de vida en el hospedador incorrecto. Los parásitos intestinales intentan sobrevivir en el hospedador el tiempo suficiente para asegurar la continuidad de su ciclo biológico, tratando de no destruirlo, con el propósito de producir morbilidad y no mortalidad (Corado y Mora., 2003).

La característica más resaltante de la respuesta inmune contra los parásitos helmintos es la producción de altos niveles de la Inmunoglobulina E (IgE) (Hagel y col., 1995), la cual tiene un peso aproximado de 200.000 Daltons, un coeficiente de sedimentación de 8S, y posee una alta movilidad electroforética (Holgate y Church, 1993; Else y col., 1994). En condiciones normales se encuentra en bajas cantidades en la sangre comparada con las otras inmunoglobulinas (0,02%), mientras que la IgE está en el orden de ng/ml, las otras están en el orden de los mg/ml. Tiene una vida

media corta de 24 horas en la circulación pero larga persistencia en los tejidos (Capron y col., 1992).

La IgE está constituida por dos cadenas livianas κ o λ y dos cadenas pesadas ϵ . Cada cadena pesada consiste de cinco dominios (VH- C ϵ 1 - C ϵ 4) y contiene 15 residuos de cisteína, uno participando en el enlace disulfuro con la cadena liviana, dos en los enlaces de las cadenas pesadas y los otros en los enlaces intracadena (Figura 7). A diferencia de otras inmunoglobulinas, la IgE no posee región bisagra, lo que la hace menos flexible (Holgate y Church, 1993). Sus funciones fundamentales características son actuar como mediador de reacciones de hipersensibilidad inmediata y constituir una importante línea de defensa contra los parásitos helmintos (Stiehm y Fulginiti, 1973).

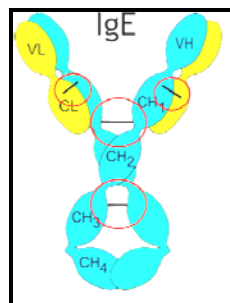


Figura 7: Estructura de la Inmunoglobulina E.

En amarillo se observan las cadenas livianas o ligeras y en color azul y verde las cadenas pesadas, cada cadena pesada consiste de cinco dominios, contiene 15 residuos de cisteína, uno participando en el enlace disulfuro con la cadena liviana, dos en los enlaces de las cadenas pesadas y los otros en los enlaces intracadena (Dichos enlaces se encuentran representados dentro de los círculos rojos). <http://www.allerresponz.com/ige.gif>

La inmunoglobulina E constituye un importante anticuerpo para la defensa especializada contra *Ascaris lumbricoides*. Se ha reportado, que tanto la malnutrición como la exposición continua a diversos agentes infecciosos desde muy tempranas edades, favorecen la producción policlonal de altos niveles de IgE a través de la estimulación no específica de la respuesta humoral o de los factores implicados en su producción y regulación (Hagel y col., 1995; Hagel, 2001).

Se ha reportado que la producción de anticuerpos IgE mediada por helmintos, constituye un componente importante involucrado en la respuesta de protección contra la infección (Hagel y col., 2006).

Como se mencionó anteriormente, la IL4 es una citocina que regula la producción de IgE, y como ya se había dicho, esta inmunoglobulina se encuentra asociada con los procesos alérgicos y como mecanismo de inmunidad contra los parásitos (Hagel y col., 1993; Cooper y col., 2000; Geiger y col., 2002). Hagel y colaboradores en (1993a y 1995) han estudiado la respuesta de IL4 e IgE contra *Ascaris lumbricoides* en niños desnutridos (Hagel y col., 1993b). Estos autores reportaron que en un grupo de niños venezolanos desnutridos y parasitados, viviendo en condiciones de pobreza, tanto la IL4 como la IgE se encontraron elevadas, resultados que sugieren una estimulación policlonal para la síntesis de IgE; posteriormente estos mismos autores en un interesante trabajo realizado en niños parasitados de estos mismos estratos sociales, encontraron valores elevados de IgE, contrastando con un bajo nivel de IgE específica contra *Ascaris lumbricoides* y contra

otros alérgenos, pero el hallazgo más relevante fue que después del tratamiento antihelmíntico, los valores de IgE anti- *Ascaris lumbricoides* en el grupo de desnutridos no sufrió ninguna modificación a diferencia del grupo de niños controles (nutridos) que si lo hicieron, hecho que incrementa la susceptibilidad del desnutrido a la infestación por estos parásitos.

En nuevas investigaciones Hagel y col., 2003, reportan que estos hallazgos son el resultado de una respuesta defectuosa de la célula T en el niño desnutrido, como consecuencia de un desbalance en las subpoblaciones de linfocitos T (CD3+ y CD4+) y en la respuesta de las células T de memoria, debido a una maduración defectuosa de estas células T y en consecuencia una respuesta disminuida en la producción de IgE contra el parásito. Estudios más recientes confirman las múltiples anormalidades de la respuesta inmunitaria con incremento de IL4 y en las subpoblaciones de linfocitos T en los niños desnutridos (Rodríguez y col., 2005).

Respuesta celular contra *A. lumbricoides*

Los eosinófilos están típicamente asociados a las infecciones por helmintos. Se cree que evolucionaron como sistema de defensa específico frente a las fases tisulares de aquellos parásitos cuyo excesivo tamaño impide que puedan ser fagocitados, y parece ser que las reacciones de los mastocitos dependientes de la IgE han evolucionado para atraer a los eosinófilos hacia el parásito y estimular sus propiedades antiparasitarias (Mosmann y Sad, 1996).

Los eosinófilos ejercen un papel importante de defensa a través de la activación de los receptores de alta afinidad para IgE, liberando mediadores como la proteína catiónica del eosinófilo y el Oxido Nítrico, que ejercen un efecto tóxico contra las larvas (Gounni y col., 1997). Diversos trabajos en modelos experimentales “*in vitro*”, han demostrado que la transferencia de células como macrófagos, eosinófilos y plaquetas que expresan IgE en su superficie, provenientes de ratas inmunes a *Schistosoma*, induce protección en ratas sensibles (Capron y col., 1984; Verwaerder y col., 1987).

Ascaris lumbricoides induce una potente respuesta, caracterizada por el incremento de los niveles de IgE total, IgE específica, y eosinofilia debido a la producción de citoquinas IL-4, IL-5, e IL-13 característica de una respuesta inmunitaria de tipo Th2.

Trabajos más recientes, obtenidos de estudios en modelos experimentales en nemátodos, sobre el control de la respuesta inmune frente a la infección parasitaria, han aportado evidencias que los helmintos estimulan la activación de células T reguladoras, CD4⁺ CD25⁺, que producen citoquinas reguladoras tales como IL-10 y factores de crecimiento transformante beta (TGF- β), capaces de inhibir la respuesta inflamatoria de carácter protectorio, favoreciendo la persistencia de la infección (Yazdanbakhsh y col., 2002) (Figura 8).

que sugiere, una baja capacidad para controlar la infección (Else y col., 1994; Jiang y col., 1998; Scott, 2008).

Diversos modelos experimentales han demostrado que los anticuerpos IgE-específicos sensibilizan a los mastocitos en las mucosas del intestino, causando la liberación de mediadores anafilácticos que producen reacciones locales de hipersensibilidad inmediata, las cuales crean un microambiente inhóspito al parásito y favorecen su expulsión, como ya se había mencionado antes (Moqbel y col., 1990).

En el hombre, se han establecido distintos modelos poblacionales, que indican que la infección con helmintos como *Schistosoma* y *Ascaris lumbricoides*, está asociada a la producción de anticuerpos específicos de tipo IgE (Hagel y col., 1993; Grogan y col., 1997).

Sin embargo, no siempre los eosinófilos ayudan al hospedador en su lucha contra la infección, impidiendo la migración de los parásitos a través de los tejidos, ya que se ha demostrado que algunos ratones sin eosinófilos (tratados con antisero anti eosinófilos) presentan una respuesta inmune normal (Guardis y col., 2002).

Scott (2008), indica que los eosinófilos no poseen propiedades fagocíticas tan acusadas como los neutrófilos. Las perturbaciones de la superficie de su membrana inducen su desgranulación, y su actividad se ve estimulada por citoquinas como TNF- α y GM-CSF, indicando además que la mayoría de sus efectos se encuentran bajo el control de mecanismos específicos de Ag. Así, su unión *in vitro* a larvas de helmintos recubiertas con IgE o IgG estimula la liberación del contenido de sus gránulos sobre la superficie de los parásitos.

II.-7. Relación entre *Ascaris lumbricoides* y la Alergia

Las primeras evidencias de la existencia de la IgE fueron obtenidas por Praunitz y Kustner en 1921, quienes demostraron la presencia de un factor en la sangre de pacientes alérgicos, el cual al ser transferido a la piel de individuos no alérgicos, los hacía sensibles a alérgenos en la transferencia. Posteriormente, Ishizaka y colaboradores en 1985 lograron separar esta actividad de las otras inmunoglobulinas conocidas y la llamaron IgE por el eritema que este anticuerpo provoca en personas sensibles (Hurtado, 2003).

En las últimas tres décadas se ha reconocido un alarmante aumento en la frecuencia de las enfermedades alérgicas, más de 130 millones de personas sufren de asma y este número sigue creciendo. El aumento del asma y alergias en los países industrializados ha sido explicado por la disminución de las enfermedades infecciosas durante la infancia (Di Prisco y col., 2006).

El término atopia se refiere a manifestaciones clínicas de hipersensibilidad mediada por IgE, entre las que destacan la rinitis alérgica (fiebre del heno), el eczema, el asma y diversas alergias alimentarias, y se define operativamente como la presencia de una prueba cutánea positiva a extractos de alérgenos inhalados o la presencia de IgE específica de alérgeno en el suero ($>0,35$ UI/ml). Se han propuesto diferentes hipótesis para explicar por qué cada vez un número mayor de niños desarrolla un perfil inmunológico que favorece la síntesis de IgE y el desarrollo de atopia (Di Prisco y col., 2006).

Las parasitosis helmínticas, como por ejemplo la ascariasis, son capaces de modular la reactividad alérgica, e inducir el síndrome de Löeffler, episodios de broncoconstricción o crisis de asma bronquial. Además se ha demostrado una asociación entre la sensibilización contra aeroalergenos comunes del ambiente, y la infección por *Ascaris lumbricoides*, como mayor riesgo de padecer asma (Palmer y col., 2002).

Existe un conjunto considerable de datos a favor de la premisa que el ambiente de citoquinas de tipo Th2, inducido por la infección por *Ascaris lumbricoides*, es beneficioso en la prevención y/o el control de una serie de procesos atópicos y autoinmunes, en los cuales una respuesta de Th1 agresiva es patógena (Caballero, 1998; Scott, 2008).

Scott (2008) propone que éste es el resultado de la regulación cruzada entre los fenotipos de las respuestas de Th1 y Th2 o bien de la influencia de citoquinas reguladoras, producidas por las células T reguladoras (Treg), y que puede depender del haplotipo STAT-6 específico implicado en la transmisión de señales intracelulares.

La relación entre *Ascaris lumbricoides* y las enfermedades atópicas difiere si se considera la infección reciente o los antecedentes de infección por *Ascaris lumbricoides*. También se disponen resultados que confirman que dicha relación entre el parásito y las enfermedades atópicas, se ve alterada por la presencia de otras infecciones, incluyendo la tuberculosis activa (Scott, 2008).

En Ecuador, Cooper y colaboradores (2003), hallaron una fuerte asociación negativa entre la reactividad de pruebas cutáneas para alérgenos y la infección por *A. lumbricoides*. En ratones, se observó que la infección aguda por *A. suum* exacerbaba los síntomas alérgicos, mientras que la infección crónica producía efectos protectores. Se reportó una distinción similar en estudios efectuados en humanos con *A. lumbricoides* (Cooper y col., 2003).

En un estudio reciente realizado en Sudáfrica, se reportó que la prevalencia de *Ascaris lumbricoides*, en niños de 6 a 14 años de edad, era sólo del 14,8% y que la elevación de IgE específica contra el helminto (pero no de la cantidad de huevos del mismo, en las deposiciones) incrementó el riesgo de pruebas cutáneas positivas a una amplia gama de alérgenos transmitidos por aire, así como a rinitis atópica y asma. Sin embargo, este efecto no era detectable en niños afectados de tuberculosis activa (Obihara y col., 2006).

Un metanálisis de datos sobre huevos en las deposiciones reveló que una infección actual se asociaba a un mayor riesgo de asma (Leonardi-Bee y col., 2006), mientras que en un estudio de cohortes, retrospectivo, en Alemania del Este, se demostró que niños con antecedentes de infecciones helmínticas intestinales (*Ascaris lumbricoides* y/u oxiuros) presentaban una disminución de eczemas atópicos y no atópicos, así como un menor riesgo de sensibilización alérgica contra alérgenos transmitidos por aire (Schäfer y col., 2005).

Arruda y Santos, (2005) observaron que la tropomiosina aparece en una amplia gama de invertebrados, incluyendo *Ascaris lumbricoides*, y que la IgE frente a esta

molécula se halla en más del 50% de los individuos que viven en regiones en las que *Ascaris lumbricoides* es endémico. Estos resultados podrían explicar la asociación entre *Ascaris lumbricoides* y numerosas respuestas alérgicas.

En Venezuela, las evidencias poblacionales del papel protector del sistema IgE en la infección por helmintos gastrointestinales han sido proporcionadas por estudios en poblaciones altamente parasitadas, en los cuales se ha demostrado, en niños con niveles elevados de IgE específica contra el parásito, que tienen una menor tasa de reinfección después de recibir tratamiento antihelmíntico mensual por un año (Hagel y col., 1993).

Además, en los niños que han demostrado una mayor capacidad para producir altos niveles de anticuerpos IgE específicos contra estos parásitos, se encontraron intensidades significativamente menores de la infección que en los no atópicos. Esta situación podría ser un reflejo de la estimulación preferencial de la respuesta del tipo Th2 por parte de antígenos parasitarios (Hagel y col., 2006).

Otros trabajos han demostrado que *Ascaris lumbricoides* estimula la diferenciación de linfocitos Th2, productores de citoquinas tales como IL-4 e IL-13 en poblaciones endémicas, las cuales selectivamente inducen la producción de IgE (Turner y col., 2003). Además, otros estudios han demostrado que la IL-4 es un factor esencial en la estimulación de la expresión del CD23 sobre los linfocitos B cultivados *in vitro* en presencia de antígenos derivados de parásitos helmínticos (Yamaoka y col., 1994). El CD23 es el receptor de baja afinidad para la IgE, identificado por Spielberg y colaboradores (1979) al cual se le han asignado

diferentes funciones asociadas a las distintas interacciones con sus diferentes ligandos. Por ejemplo, el enlace del CD23 a complejos IgE-antígenos, en células presentadoras, facilita el mecanismo de procesamiento y presentación de los antígenos, promoviendo así la síntesis de IgE (Mudde y col., 1991). Así, los antígenos parasitarios de *Ascaris lumbricoides* podrían estimular la producción de IgE mediante la inducción de la expresión del receptor CD23 en los linfocitos, a través de una vía dependiente de células Th2 y de la estimulación selectiva de citoquinas, principalmente IL4 e IL13 (Yazdanbakhsh y col., 2002).

II.- 8. Antígenos de *Ascaris lumbricoides*.

Se han realizado diversos estudios para caracterizar diferentes antígenos que estimulan la respuesta inmune frente a *Ascaris lumbricoides*. El grupo de antígenos más importantes es una familia denominada poliproteínas alergénicas de nemátodos (NPA). La familia NPA fue definida como la molécula prototipo en *Ascaris*, siendo ABA-1, el principal constituyente del fluido pseudocelómico (50%) del parásito. ABA-1 es la proteína transportadora del retinol (forma activa de la vitamina A) y es considerada vital para la supervivencia del parásito. Se ha reportado que el líquido pseudocelómico (LPC) induce la producción de IgE total y específica y es responsable de las respuestas alérgicas observadas (Mc Reynold y col., 1993; Soto, 1998; Kennedy, 2000).

A comienzos de 1970 Ambler y colaboradores, realizaron trabajos sobre la purificación y caracterización bioquímica de un alérgeno importante presente en *A.*

suum que nombraron Alérgeno A. El peso molecular del alérgeno fue estimado en 14,4 kDa y su punto isoeléctrico en 5,2; igual que el estimado para la proteína ABA-1. Estudios realizados por Christie y colaboradores (1990), concluyeron que el constituyente principal del alérgeno A era ABA-1.

Kennedy y colaboradores (1987), observaron que la respuesta de los anticuerpos IgE e IgG a la proteína ABA-1, está regulada por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en ratones, en consecuencia el estudio detallado de la respuesta inmune frente a ABA-1 puede contribuir a la comprensión de las diferentes inmunopatologías en humanos con ascaridiasis (Christie y col., 1990).

Diferentes investigaciones postulan, que en áreas endémicas para *A. lumbricoides*, las personas que producen altos niveles del anticuerpo IgE contra ABA-1 están menos infectadas con vermes adultos, que personas que producen bajos niveles de IgE, alegando que probablemente se aplica a otros alérgenos de *Ascaris lumbricoides* y puede ser un indicador general del efecto protector del anticuerpo IgE.

Alternativamente, es posible que el anticuerpo IgE sea simplemente estimulado con la verdadera respuesta protectora. Por ejemplo, aquellos individuos quienes aparentemente tienen una respuesta inmune natural contra *A. lumbricoides* también tienen evidencias de mayores reacciones inflamatorias generalizadas (McSharry y col., 1999).

No obstante otros investigadores, han sugerido como mínimo, tres factores que intervienen en la diferencia en los resultados entre los estudios ya realizados: el tipo de antígeno, el isotipo de la respuesta de anticuerpos y la edad. Según Scott (2008),

no parece existir asociación alguna entre la intensidad de la infección de *Ascaris lumbricoides* y la respuesta de IgE o IgG4 frente a los antígenos naturales. La respuesta específica de IgE para la forma recombinante de un alérgeno de *Ascaris lumbricoides* (rABA-1A) se asocia a la resistencia contra el parásito.

Según una revisión realizada por Scott (2008), los títulos de IgE contra rABA-1A disminuyen frente al incremento de la intensidad de *Ascaris lumbricoides* en individuos de 12 a 36 años de edad en Camerún, y se detectaron respuestas de IgE elevadas a glucolípidos de *Ascaris lumbricoides* en niños del mismo país levemente infectados, en comparación con niños intensamente infectados y controles europeos no infectados.

En cambio, los títulos de IgG4 para rABA-1A aumentaron frente al incremento de la intensidad de *Ascaris lumbricoides* en niños de 4 a 11 años de edad, lo mismo que la respuesta de IgG4 a proteínas en niños indonesios. De manera interesante, el cociente IgG4/IgE en respuesta al rABA-1A aumentaba con el número de huevos por gramo de heces, lo que indica que IgG4 puede o bien bloquear la respuesta de IgE, que es necesaria para la resistencia al parásito, o interferir con la conmutación de clase de la producción de IgG4 hacia la producción de IgE (Scott, 2008). Por eso sería importante identificar otros antígenos asociados a la producción de anticuerpos IgE que confieran resistencia a la infección.

II.- 9. Justificación

Los parásitos intestinales, particularmente los helmintos, contribuyen de manera importante a la morbilidad de zonas rurales de Venezuela, especialmente en niños de esas zonas, donde son frecuentes las reinfecciones a pesar de los esfuerzos terapéuticos (MSDS, 1999; Hagel, 2001), generándose un problema de salud pública y deteriorando la estructura social y económica que afecta la salud alimentaria del venezolano. Dichos parásitos compiten con el organismo de estos infantes por los nutrientes, induciendo anorexia, pérdida de peso, anemia, entre otros, los cuales coadyuvan a disminuir la calidad de vida y retraso en el rendimiento escolar (Cerdas y col., 2003).

Las primeras evidencias en este sentido surgieron de los trabajos de Stiles (1915), en un área urbana de los Estados Unidos, con 2.116 niños, controlando variables de género, posesión de alcantarillado y letrina. El autor reportó que la infección por geohelmintos puede contribuir en pequeña proporción al deterioro de las funciones cognitivas en presencia de otras variables de tipo socioeconómico y ambiental. Es interesante resaltar los trabajos de Simeon y colaboradores, (1995), quienes proponen varios mecanismos mediante los cuales la desnutrición podría afectar el rendimiento escolar, incluyendo: *i)* cambios anatómicos o bioquímicos en el sistema nervioso central, en este sentido se ha postulado que la deficiencia de hierro altera la conducta debido al deteriorado catabolismo de las catecolaminas, transporte de electrones y síntesis de porfirinas; *ii)* la estimulación crónica del sistema inmune en las helmintiasis podría tener un efecto directo sobre el sistema nervioso central; *iii)*

las parasitosis geohelmínticas pueden reducir la actividad del niño y por lo tanto, reducir la exposición a estímulos y oportunidades de aprender; y iv) la enfermedad puede alterar la conducta del niño de manera que condicione un rechazo, o abandono por parte de sus maestros (Simeon y col., 1995; Devera y col., 1998; Becerril y Romero, 2004).

Es importante tomar en cuenta que la Ascariasis como muchas otras parasitosis es transmitida en gran parte de los casos por malos hábitos de limpieza y cocción de los alimentos, por tanto si no se logran modificar los hábitos higiénicos de la población, principalmente en los grupos infantiles, es posible que se formen "nichos ecológicos" por la contaminación fecal del suelo y los alimentos, dando lugar a la aparición y mantenimiento de las endemias que constituyen focos de infección entre los individuos que viven en una determinada región (Neghme y Silva, 1971).

La identificación de antígenos derivados del parásito, capaces de estimular la respuesta inmunológica de tipo IgE, en poblaciones endémicas, para *Ascaris lumbricoides*, permitiría diferenciar el comportamiento de la respuesta inmune entre individuos resistentes y sensibles, en función de los antígenos y además abriría la posibilidad de ampliar el campo de la investigación, el cual en nuestro país ha sido poco explorado con el fin de desarrollar nuevas terapias para el control de estas infecciones, y estudiar más a fondo la relación del parásito y la inducción de la alergia y su posible papel protector.

III.- OBJETIVOS

III.- 1. GENERAL

Estudiar la respuesta específica de anticuerpos de tipo IgG e IgE contra extractos de vermes adultos de *Ascaris lumbricoides* en el suero de individuos venezolanos.

III.- 2. ESPECÍFICOS

- 1) Determinar el perfil proteico de extractos solubles de *Ascaris lumbricoides*.
- 2) Identificar proteínas inmunogénicas en extractos de *Ascaris lumbricoides* reconocidas por los anticuerpos de tipo IgG e IgE presentes en el suero de individuos infectados.
- 3) Medir la respuesta específica de anticuerpos de tipo IgG e IgE contra las proteínas de extractos de *Ascaris lumbricoides*.

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS.

IV.- 1. Población de estudio.

En el presente estudio, fueron evaluados 117 individuos previa información y consentimiento informado (Anexo 1).

Los individuos provenían de las siguientes comunidades rurales: El Guapo – Machurucuto (26 individuos), Jardín de Infancia Felipe Neri “El Guapo” (17 individuos) y La Peica (64 individuos) ubicadas en el Edo. Miranda. Además se estudiaron individuos de 2 centros de salud ubicados dentro de la ciudad de Caracas: Hospital Infantil J. M de los Ríos (9 individuos) y La Clínica Popular de Catia (1 individuo). No se hizo distinción de sexo, y las edades estuvieron comprendidas entre 2 a 60 años, sin embargo el 95% de la población estudiada (111 individuos) fueron niños entre los 2 y 18 años de edad. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Inmunología de la UCV.

IV.- 2. Diagnóstico Parasitológico.

La detección de individuos con huevos de *Ascaris* en las heces, fue realizada por la técnica solución salina y Lugol, técnica de Kato, Formol-Tritón –Eter observando al microscópico directo. Dicha detección fue realizada gentilmente por la Lic. Aurora Hernández y la Dra. Leonor Pocaterra.

IV.- 3. Parásito.

Se utilizó para la preparación del extracto un verme adulto hembra de *Ascaris lumbricoides*, obtenido de una niña de 5 años.

IV.- 4. Preparación del extracto.

El parásito fue cortado y macerado en un mortero, para la obtención de un extracto soluble en 18 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 150 mM. El extracto fue sometido a una centrifugación durante 20 minutos, a 14.000 xg y 4 °C (centrífuga IEC Centra ® GP8R). El sobrenadante fue recuperado y el sedimento se procesó para una segunda extracción (bajo las mismas condiciones), y fue incorporado a la primera extracción, obteniendo así un extracto soluble. Este fue almacenado a – 80 °C.

IV.- 5. Determinación de concentración de proteínas.

Para determinar la concentración de proteínas se utilizó el estuche comercial DC Protein Assay de BIO-RAD, el cual se basa en el método de Lowry (1951). Se elaboró una curva de calibración utilizando Albúmina de Suero Bovino (BSA), como estándar, en diluciones seriadas, y leídas a una longitud de onda de 405 nanómetros.

IV.- 6. Separación de las proteínas del extracto soluble por electroforesis en geles de poliacrilamida.

Para la separación de las proteínas del extracto soluble se utilizó una electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (Laemmli, 1970).

Se preparó el gel de corrida, mezclando, 4,15 ml de H₂O destilada, 2,5 ml de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 3,30 ml de Acrilamida 30%, 100 µl de SDS 10%, 90 µl de Persulfato de Amonio y 9 µl de TEMED. Se dejó polimerizar y posteriormente se preparó el gel de apilamiento, mezclando 3,5 ml de H₂O destilada, 1,25 ml de Tris-HCl 1,5 M pH 6,8; 650 µl de Acrilamida 30%, 50 µl SDS 10%, 40 µl de Persulfato de Amonio y 9 µl TEMED. Se dejó polimerizar el gel y se colocó en los bolsillos las muestras del extracto (300-400µg/carril), las cuales fueron disueltas previamente en buffer de muestra 2X. Las muestras fueron corridas a 100V, a temperatura ambiente, en condiciones disociantes (en presencia de SDS y β-mercaptoetanol), sin desnaturalizar por calor, en el equipo de BIO-RAD mini Protean IV.

Los geles se realizaron por duplicado. Para uno de ellos se utilizó un peine preparativo, y al finalizar la corrida electroforética, el gel fue cortado, teñido una parte con Azul de Coomasie y la otra con Sales de Plata. El otro gel fue transferido electroforéticamente según el protocolo descrito por Towbin, (1979).

- **Azul de Coomassie:** Este método de tinción presenta una sensibilidad de hasta 50 ng de proteína (Maldonado y Jorin, 2010), tiñe de azul todo el gel y más intensamente las bandas proteicas.
- **Tinción con sales de plata:** Esta tinción permite detectar 2 ng de proteína (Blum y col., 1987; Rabilloud, 1992), dejando una coloración ocre en el gel y más intensamente las bandas proteicas.

Estimación de la Masa Molecular.

En cada una de las corridas se utilizó 7 μ L de marcadores de Peso Molecular de referencia de la Casa Comercial BIO- RAD, que contiene las siguientes proteínas: Miosina (206,338 kDa); Beta-galactosidasa (118,149 kDa); Albúmina de Suero de Bovino (BSA) 97,281 kDa; Anhidrasa Carbónica (37,650 kDa); Inhibidor de Tripsina de Soya (29,383 kDa) y Lisozima (17,469 kDa). El valor de las masas moleculares de las proteínas se obtuvo a partir de la comparación según el frente de migración de proteínas con pesos moleculares de referencia (PM) conocidos, y el uso del programa Quantity One de la Casa Comercial BIO- RAD.

IV.- 7. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF (Polivinildenedifloruro).

Finalizada la corrida electroforética, los geles fueron teñidos como se describió en el punto anterior o se usaron para la transferencia de dichas proteínas a una membrana de PVDF. La transferencia se realizó usando la misma cámara Bio-Rad mini Protean IV. Esta transferencia conocida como “tipo sándwich”, se caracteriza por: transferir del gel a la membrana de PVDF las proteínas, mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel. Dicho sándwich se construye apilando sucesivamente una esponja plana, papel absorbente, el gel, la membrana sintética, más papel y finalmente otra esponja plana, y se dispone de forma tal que el gel quede hacia el ánodo (-) y la membrana hacia el cátodo (+).

La membrana de PVDF se incubó con metanol previamente, durante 30 segundos para su activación. Todas las transferencias se realizaron a 180 mA durante una hora a temperatura ambiente. Finalizada la transferencia, las membranas fueron teñidas con Rojo Ponceau 0,1 % en ácido acético 5%, para verificar la transferencia de las proteínas a la membrana.

IV.- 8. Identificación de las proteínas inmunogénicas mediante Western Blot (WB).

La identificación de proteínas inmunogénicas a partir de los extractos, se realizó mediante inmunodetección usando los isotipos IgG e IgE. Esta técnica constó de 5 etapas: bloqueo, incubación con los anticuerpos primarios, lavados, incubación con los anticuerpos secundarios y finalmente el revelado.

Procedimiento.

1. Las membranas fueron bloqueadas con 10 ml de BSA al 5% en TBS-Tween 20-0,1%, durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación constante.
2. Pasado este tiempo, se lavaron las mismas 3 veces con TBS-Tween 20-0,1% durante 10 minutos.
3. Se incubaron las membranas con los sueros de los individuos a estudiar, diluidos 1:30, para ambos isotipos con TBS-BSA 1%, -Tween 20-0,1% por 16 horas aproximadamente (toda la noche) en agitación constante.

4. Posterior a esta incubación, se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 20-0,1% durante 10 min c/u en agitación constante.
5. Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios anti-humano IgG de SIGMA- ALDRICH en una dilución 1:2000, y el anticuerpo secundario antihumano IgE de SIGMA- ALDRICH en una dilución 1:500, ambos acoplados a fosfatasa alcalina, en solución de albúmina TBS-Tween 20-0,1% durante 1 hora en agitación y a temperatura ambiente.
6. Se realizaron 3 lavados, durante 10 min c/u, con TBS-Tween 20-0,1%.
7. Mediante un estuche comercial para revelación de la reacción de la fosfatasa alcalina BCIP/NBT (SIGMA- ALDRICH) se procedió a la visualización de las proteínas.
8. Finalmente, se fotografiaron las membranas para digitalizarlas y determinar la masa molecular de las bandas observadas mediante el programa Quantity One de la Casa Comercial BIO- RAD.

IV.- 9. Cuantificación de la respuesta específica de anticuerpo IgG e IgE mediante la técnica ELISA.

Para medir la respuesta de anticuerpos IgG e IgE específicas contra las proteínas del extracto de *Ascaris lumbricoides* se utilizó la técnica ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*):

1. El extracto soluble de *Ascaris lumbricoides* fue acoplado, a placas de 96 pozos (IMMULON), a razón de 10µg/pozo en PBS pH 7,2 a 37 °C durante toda la noche.
2. Al día siguiente, se lavaron las placas con PBS-Tween 20- 0,1% y se bloquearon con BSA al 5% en PBS-Tween 20- 0,1% durante 1h a 37 °C. para evitar uniones inespecíficas.
3. Se lavaron 3 veces con PBS-Tween 20-0,1% para eliminar el exceso de solución.
4. Fueron incubados los sueros de los individuos a estudiar, a una dilución 1:10 para el isotipo IgE, y una dilución 1:100 para el isotipo IgG en PBS-BSA 1%-Tween 20-0,1%, durante 1 hora a 37 °C.
5. Transcurrido este tiempo, se lavaron las placas 3 veces con la solución de lavado, como en el paso 3.
6. Las placas fueron incubadas en presencia de los anticuerpos secundarios, anti-IgE humano ó anti-IgG humano (SIGMA- ALDRICH) en sus respectivos pozos, diluidos 1:500 y 1:2000 respectivamente, en PBS-BSA 1%-Tween 20-0,1%, durante 1 hora a 37 °C.
7. Transcurrido este tiempo, las placas fueron lavadas 5 veces con la solución de lavado.

8. Posteriormente se reveló usando pastillas comerciales de P-Nitrofenilfosfato de la marca comercial SIGMA- ALDRICH, diluidas cada una en 5 ml de Buffer Dietinolamina pH 9,8. La reacción fue detenida colocando 25µl por pozo de NaOH 3N, y la densidad óptica fue leída a 405 nm, en un lector de ELISA (SUNRISE serie 801000880) bajo el programa Magellan Tecan V 6.4.

9. El valor del punto de corte fue calculado del promedio de las densidades ópticas para cada isotipo, de 18 de los individuos NSOP de la población de estudio, restando el blanco y sumado 2 veces el valor obtenido de la desviación estándar.

Los sueros se clasificaron en positivos para las densidades ópticas superiores al valor del punto de corte para cada isotipo y como negativos a las densidades ópticas inferiores al valor obtenido para el punto de corte en cada isotipo.

IV.- 10. Análisis estadístico.

Se utilizó estadística descriptiva de datos, tales como: media, desviación estándar, frecuencia y porcentaje.

Para el análisis de los resultados obtenidos en el inmunoensayo - ELISA se utilizó el Programa Estadístico MedCalc (MedCalc Statistical Software) 9.3.0.0, el cual es un paquete de programas estadísticos para las ciencias biomédicas. Algunas características especiales del programa son, el análisis de curvas ROC (Operación Características del Receptor), con cálculo de sensibilidad, especificidad,

probabilidades y valores predictivos positivos y negativos para todos los valores de umbral posibles. El programa calcula el área bajo la curva (AUC) con su error estándar y el intervalo de confianza del 95%. Además, los valores de umbral se pueden seleccionar en un diagrama de puntos interactivo con cálculo automático de la sensibilidad y especificidad correspondientes. La comparación de curvas ROC incluye el cálculo de la diferencia entre las áreas bajo las curvas, con error estándar, intervalo de confianza del 95% y valor p.

V.- RESULTADOS

V.- 1. Población estudiada.

De los 117 individuos, el 95% de la población estudiada (111 individuos) fueron niños entre los 2 y 18 años de edad. Los individuos provenientes de las distintas comunidades se distribuyeron (previa información y consentimiento informado) según su diagnóstico parasitológico en:

- 34 individuos *A. lumbricoides* positivos (Asc. I),
- 40 individuos *A. lumbricoides* positivos y otras parasitosis (Asc I + OP),
- 20 individuos *A. lumbricoides* negativos y otras parasitosis (OP), y
- 23 individuos que no presentaron parásitos en heces (NSOP).

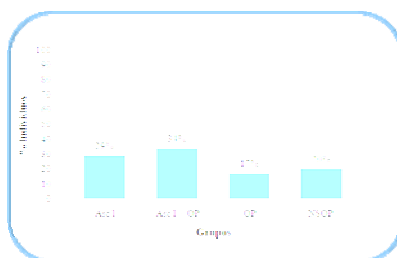


Figura 9: Distribución de la población estudiada por grupos.

De izquierda a derecha: grupo de *Ascaris lumbricoides* positivo (Asc.I) (34 individuos), *Ascaris lumbricoides* más otras parasitosis (Asc.I + OP) (40 individuos), grupo de otras parasitosis sin *Ascaris lumbricoides* (OP) (20 individuos), y grupo de individuos que en heces no se observaron parásitos (NSOP) (23 individuos).

V.- 2. Distribución de los individuos seleccionados.

De acuerdo a las zonas de estudio, la población estuvo distribuido de la siguiente manera: 107 individuos provenientes de las comunidades rurales de: la Peica (64 individuos), Guapo y Machurucuto (26 individuos), y Jardín de Infancia Felipe Neri (17 individuos), dentro del Edo. Miranda; y 10 individuos fueron provenientes de instituciones hospitalarias públicas dentro de Caracas: Hospital de Niños J. M de los Ríos (9 individuos), y Clínica Popular de Catia (1 individuo) (Figura 10).

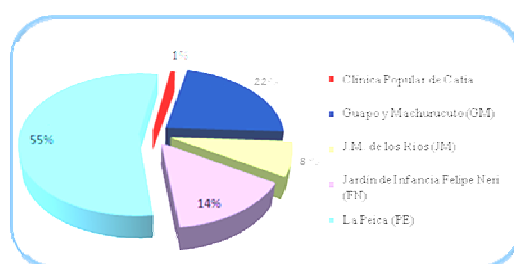


Figura 10: Distribución de los individuos seleccionados por población.

Distribución de la población estudiada por comunidad. De los 117 individuos estudiados, 64 individuos (55%) provenían de la Peica, 26 individuos (22%) provenían del Guapo y Machurucuto, 17 individuos (14%) provenían del Jardín de Infancia Felipe Neri, 9 individuos (8%) provenían del Hospital Infantil J.M. de los Ríos y 1 individuo (1%) provino de la Clínica Popular de Catia.

Es importante mencionar que de los 17 individuos infectados con *Ascaris lumbricoides* y provenientes del Jardín de Infancia Felipe Neri, 14 de ellos presentaron en su historia al menos uno de los siguientes síntomas: alergia, erupciones y asma bronquial. Obteniendo en esta población un 82% de individuos que afirman la relación entre los cuadros alérgicos y la ascariasis.

Distribución por sexo:

Por otra parte se hizo distinción entre los individuos que aleatoriamente se tomaron para el estudio en cuanto al sexo, y en qué proporción se encontraban distribuidos los individuos parasitados con *Ascaris lumbricoides*, obteniendo así que de los 117 individuos 60 fueron del sexo femenino (44 positivos para *Ascaris lumbricoides* con o sin otras parasitosis implicadas) y 57 del sexo masculino (31 positivos para *Ascaris lumbricoides* con o sin otras parasitosis implicadas), como se muestra en la Figura 11.

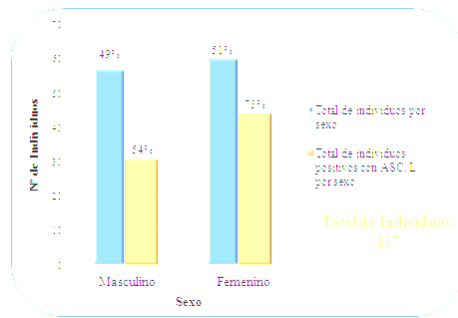


Figura 11: Proporción del porcentaje de individuos seleccionados en relacion al sexo.

Distribución de los géneros en la muestra estudiada. En la Figura las columnas del lado izquierdo muestran que de 117 individuos, 57 (49%) fueron del sexo masculino de los cuales 31 (54%) fueron positivos para *Ascaris lumbricoides* con o sin otras parasitosis implicadas. Las columna del lado derecho muestran que de 117 individuos, 60 (51%) fueron del sexo femenino de los cuales 44 (73%) fueron positivos para *Ascaris lumbricoides* con o sin otras parasitosis implicadas.

Prevalencia de las distintas parasitosis presentes en la muestra estudiada

De los 117 individuos, 75 fueron positivos para *Ascaris lumbricoides* pero de estos, 40 individuos poseían a la par otra (as) parasitosis, las cuales según su índice de incidencia se representan en la siguiente proporción: 28% presenta *Trichuris trichiura*, el 23% presenta *Blastocystis hominis*, el 19% presenta *Giardia duodenalis*, un 13% presentan las parasitosis *Entamoeba histolitica/dispar* y *Entamoeba coli* , y finalmente con un 2% se presentas individuos parasitados a la par con *Strongyloides stercoralis* y huevos de anquilostomidio (Figura 12).

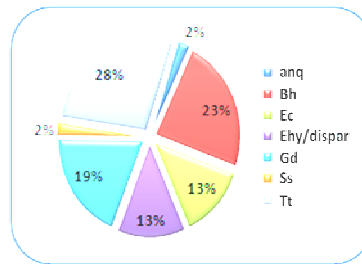


Figura 12: Distribución de las parasitosis asociadas a la presencia de *Ascaris lumbricoides*.

Presencia de las parasitosis encontradas a la par para los individuos infectados con *Ascaris lumbricoides* de la muestra estudiada. Se observa un 28% presentado para *Trichuris trichiura* (Tt), el 23% presentado para *Blastocystis hominis* (Bh), un 19% presentado para *Giardia duodenalis* (Gd), un 13% presentado para las parasitosis *Entamoeba hystolitica/dispar* (Ehy/dispar) y *Entamoeba coli* (Ec), finalmente con un 2% se presentaron individuos parasitados con *Strongyloides stercolaris* (Ss) y huevos de anquilostomidio (anq).

V.- 3. Perfil Electroforético del extracto soluble de *Ascaris lumbricoides*.

Para la identificación del perfil electroforético del extracto soluble se realizaron electroforesis en condiciones disociantes, no desnaturalizantes. En la Figura 13 se observa el perfil proteico a partir de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, teñido por Nitrato de Plata y Azul de Coomassie. Se identificaron al menos 16 proteínas de distintas masas moleculares distribuidas en orden descendente: 148,48; 101,24; 95,19; 75,95; 67,26; 60,60; 56,29; 53,24; 51,10; 44,77; 41,15; 39,68; 34,77; 32,53; 31,51 y 26,3 kDa (Figura 13).

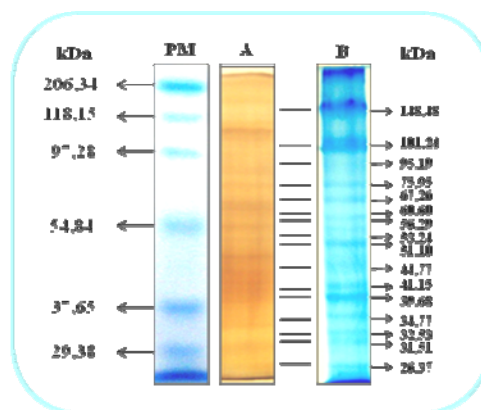


Figura 13: Perfil Electroforético de las proteínas del extracto soluble de *Ascaris lumbricoides*.

A la izquierda: Peso Molecular de Referencia; A.- Perfil proteico teñido con Nitrato de Plata; B.- Perfil Proteico teñido con Azul de Coomassie y señalizando 16 proteínas (148,48; 101,24; 95,19; 75,95; 67,26; 60,60; 56,29; 53,24; 51,10; 44,77; 41,15; 39,68; 34,77; 32,53; 31,51 y 26,3 kDa) que se observaron para ambas tinciones luego de varias repeticiones de dicho experimento.

V.- 4. Estudio de la Reactividad Serológica.

Para identificar las proteínas del extracto estudiado y la respuesta de anticuerpos en los diferentes grupos, se realizó un estudio de reactividad serológica, haciendo énfasis en la producción de inmunoglobulinas G y E frente al extracto soluble de un parásito hembra de *Ascaris lumbricoides*. Para lograr estos objetivos fue necesaria la estandarización de una metodología incluyendo la obtención del extracto proteico, así como las técnicas de WESTERN BLOT (WB) y ELISA para detectar el reconocimiento de las inmunoglobulinas G y E frente al extracto soluble y los niveles de anticuerpos específicos respectivamente.

V.- 5. Evaluación del extracto soluble de *Ascaris lumbricoides*.

Se obtuvo una concentración de proteínas de 6,1 mg / ml por el método empleado.

A.- Identificación de proteínas inmunogénicas reconocidas por los anticuerpos de tipo IgG e IgE en el suero de individuos infectados mediante la técnica de WESTERN BLOT.

Se muestran un total de 17 Figuras que reportan los resultados obtenidos por WB para los isotipos IgG (desde la figura 14 hasta la 21) y para el isotipo IgE (desde la figura 22 hasta la 30).

A.- 1. Proteínas inmunogénicas reconocidas por los anticuerpos de tipo IgG.

El extracto soluble de *Ascaris lumbricoides* se evaluó enfrentándolo con los 117 sueros de pacientes estudiados, de los 4 grupos según su diagnóstico parasitológico, mediante la técnica de Western Blot, reconociéndose siete bandas antigénicas de mediana masa molecular las cuales aparecieron con mayor número de incidencia. Estas bandas fueron: 29, 30, 31, 39, 40, 41 y 44 kDa, las cuales están dentro de las proteínas de masas moleculares observadas en el perfil proteico del extracto soluble, y además, se observaron en repetidas ocasiones en los grupos A y B los cuales están representados por los individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* y *Ascaris lumbricoides* más otras parasitosis, respectivamente.

En la Figura 14 se observaron las proteínas de 101, 75 y 44 kDa, sin embargo, pese a su alto número de apariciones se observa para todos los grupos, por ello no se consideraron dentro de las proteínas importantes para este estudio.

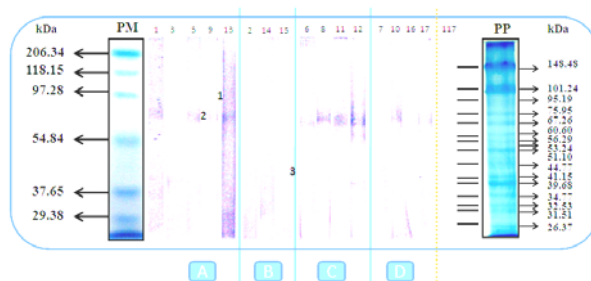


Figura 14: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgG (Exp. 0210).

A – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides*, B – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* y otros parásitos, C – Individuos positivos para Otros parásitos, D – No se observaron parásitos, Paciente 117: NSOP de la Clínica Popular de Catia. Proteínas observadas en WB y reportadas en el perfil proteico: 1 – 101 kDa, 2 – 75 kDa y 3 – 44 kDa.

Las proteínas de 44 y 31 kDa, se consideraron importante por el número de apariciones totales para los 117 pacientes, dentro de los grupos A y B para la de 44 kDa, y dentro de los grupos A, B y D para la de 31 kDa (Figuras 15, 16 y 20).

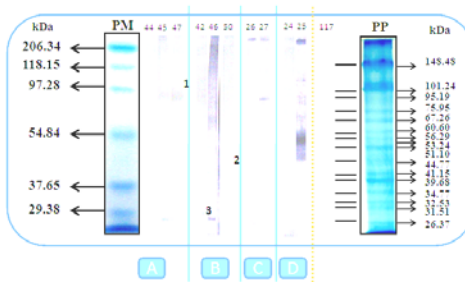


Figura 15: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgG (Exp. 0907).

A – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides*, B – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* y otros parásitos, C – Individuos positivos para Otros parásitos, D – No se observaron parásitos, Paciente 117: NSOP de la Clínica Popular de Catia. Proteínas observadas en WB y reportadas en el perfil proteico: – 101 kDa, 2 – 44 kDa y 3 – 31 kDa.

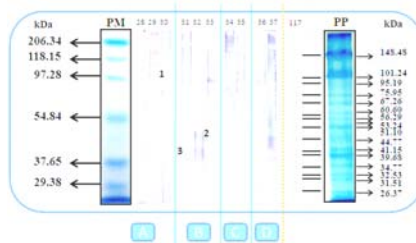


Figura 16: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgG (Exp. 1407).

A – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides*, B – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* y otros parásitos, C – Individuos positivos para Otros parásitos, D – No se observaron parásitos, Paciente 117: NSOP de la Clínica Popular de Catia. Proteínas observadas en WB y reportadas en el perfil proteico: 1 – 101 kDa, 2 – 51 kDa y 3 – 44 kDa.

En la Figura 17 se observan repetidamente las proteínas señaladas de 67, 53 y 51 kDa, sin embargo dicha frecuencia de aparición es para todos los grupos, por ello no se consideraron dentro de las proteínas importantes para este estudio.

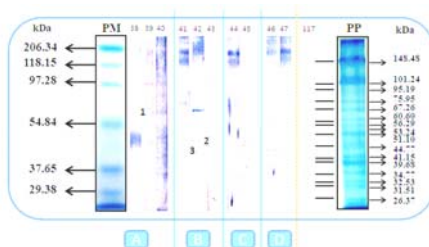


Figura 17: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgG (Exp. 1507).

A – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides*, B – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* y otros parásitos, C – Individuos positivos para Otros parásitos, D – No se observaron parásitos, Paciente 117: NSOP de la Clínica Popular de Catia. Proteínas observadas en WB y reportadas en el perfil proteico: 1 – 67 kDa, 2 – 53 kDa y 3 – 51 kDa.

La proteína de 44 kDa, se considera importante dentro de nuestro estudio, por el número de apariciones totales para los 117 pacientes, dentro de los grupos A y B (Figura 18, 19 y 20).

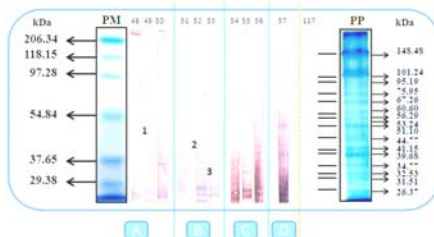


Figura 18: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgG (Exp. 1607).

A – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides*, B – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* y otros parásitos, C – Individuos positivos para Otros parásitos, D – No se observaron parásitos, Paciente 117: NSOP de la Clínica Popular de Catia. Proteínas observadas en WB y reportadas en el perfil proteico: 1 – 51 kDa, 2 – 44 kDa y 3 – 32 kDa.



Figura 19: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgG (Exp. 2709).

A – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides*, B – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* y otros parásitos, C – Individuos positivos para Otros parásitos, D – No se observaron parásitos, Paciente 117: NSOP de la Clínica Popular de Catia. Proteínas observadas en WB y reportadas en el perfil proteico: 1 – 95 kDa, 2 – 44 kDa y 3 – 31 kDa.

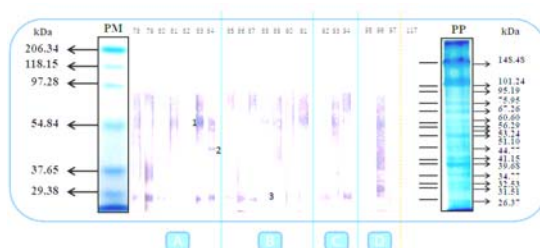


Figura 20: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgG (Exp. 2909).

A – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides*, B – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* y otros parásitos, C – Individuos positivos para Otros parásitos, D – No se observaron parásitos, Paciente 117: NSOP de la Clínica Popular de Catia. Proteínas observadas en WB y reportadas en el perfil proteico: 1 – 56 kDa, 2 – 44 kDa y 3 – 31 kDa.

Observamos en la Figura 21, que a pesar de que para el Grupo A y B el reconocimiento de bandas es débil, se observa reconocimiento claro de bandas protéicas por parte del grupo D, grupo de individuos que no presentaron huevos de parásitos en las heces.

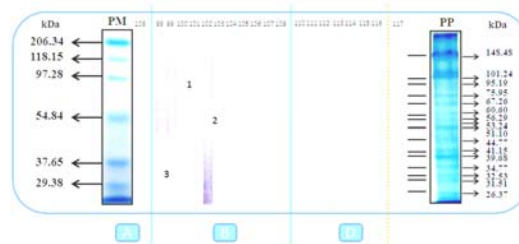


Figura 21: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgG (Exp. 3009).

A – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides*, B – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* y otros parásitos, C – Individuos positivos para Otros parásitos, D – No se observaron parásitos, Paciente 117: NSOP de la Clínica Popular de Catia. Proteínas observadas en WB y reportadas en el perfil proteico: 1 – 95 kDa, 2 – 56 kDa y 3 – 32 kDa.

A.- 2. Proteínas inmunogénicas reconocidas por los anticuerpos de tipo IgE.

El extracto soluble de *Ascaris lumbricoides* se evaluó enfrentándolo con los 117 sueros de pacientes estudiados, de los 4 grupos según su diagnostico parasitológico, mediante la técnica de Western Blot, reconociéndose nueve bandas antigénicas de mediano peso molecular las cuales aparecieron con mayor número de incidencia. Estas bandas fueron: 64,52, 54, 49, 41, 39, 30, 29 y 26 kDa, las cuales están dentro de las proteínas de masas moleculares observadas en el perfil proteico del extracto soluble, además se observaron en repetidas ocasiones, en los grupos A y B los cuales están representados por los individuos positivos para *Ascaris lumbricoides*, y *Ascaris lumbricoides* más otras parasitosis, respectivamente.

Se observa en la Figura 22 un único reconocimiento de bandas proteicas por parte del grupo A, dichas bandas de 52 y 39 kDa, corresponden con las aproximaciones reportadas para el perfil proteico.

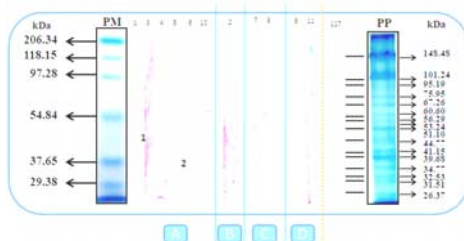


Figura 22: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgE (Exp. 2804).

A – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides*, B – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* y otros parásitos, C – Individuos positivos para Otros parásitos, D – No se observaron parásitos, Paciente 117: NSOP de la Clínica Popular de Catia. Proteínas observadas en WB y reportadas en el perfil proteico: 1 – 52 kDa y 2 – 39 kDa.

Igualmente en la Figura 23, se observó reconocimiento en todos los grupos, por las bandas proteicas de 53 y 34 kDa, lo que las descarta como proteínas de interés para nuestro estudio. La proteína de 76 kDa tampoco fue de interés, ya que a pesar de que fue reconocida por el grupo B, esta también fue reconocida en el grupo C.

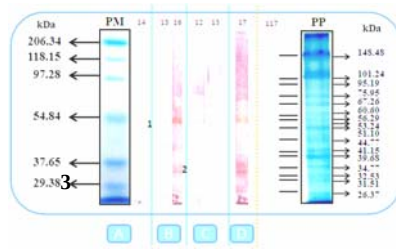


Figura 23: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgE (Exp. 1805).

A – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides*, B – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* y otros parásitos, C – Individuos positivos para Otros parásitos, D – No se observaron parásitos, Paciente 117: NSOP de la Clínica Popular de Catia. Proteínas observadas en WB y reportadas en el perfil proteico: 1 – 53 kDa, 2 – 34 kDa y 3- 76 kDa.

En los experimentos mostrados en las Figuras 24, 25 y 29, observándolos aisladamente, no se logró identificar ninguna proteína de interés ya que las mismas se repetían constantemente en los 4 grupos de estudio.

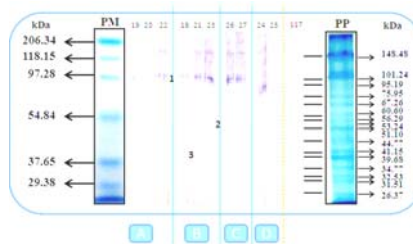


Figura 24: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgE (Exp. 0807).

A – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides*, B – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* y otros parásitos, C – Individuos positivos para Otros parásitos, D – No se observaron parásitos, Paciente 117: NSOP de la Clínica Popular de Catia. Proteínas observadas en WB y reportadas en el perfil proteico: 1 – 95 kDa, 2 – 51 kDa y 3 – 41 kDa.

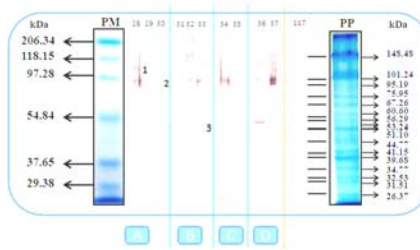


Figura 25: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgE (Exp. 1407).

A –Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides*, B – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* y otros parásitos, C – Individuos positivos para Otros parásitos, D – No se observaron parásitos, Paciente 117: NSOP de la Clínica Popular de Catia. Proteínas observadas en WB y reportadas en el perfil proteico: 1 – 101 kDa, 2 – 95 kDa y 3 – 53 kDa.

Las proteínas de 53 y 26 kDa, se consideran importantes por el número de apariciones totales para los 117 pacientes, dentro de los grupos A y B (Figuras 26 y 27).

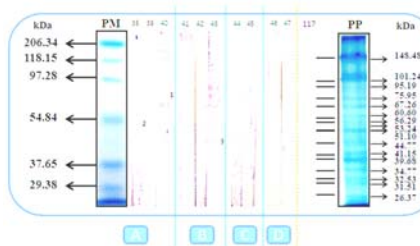


Figura 26: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgE (Exp. 1507).

A –Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides*, B – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* y otros parásitos, C – Individuos positivos para Otros parásitos, D – No se observaron parásitos, Paciente 117: NSOP de la Clínica Popular de Catia. Proteínas observadas en WB y reportadas en el perfil proteico: 1 – 67 kDa, 2 – 53 kDa y 3 – 44kDa.

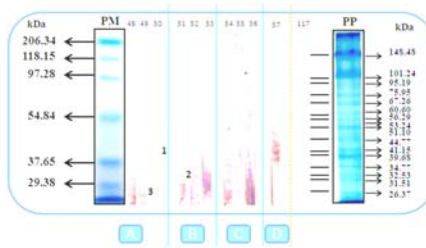


Figura 27: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgE (Exp. 1607).

A – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides*, B – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* y otros parásitos, C – Individuos positivos para Otros parásitos, D – No se observaron parásitos, Paciente 117: NSOP de la Clínica Popular de Catia. Proteínas observadas en WB y reportadas en el perfil proteico: 1 – 44 kDa, 2 – 32 kDa y 3 – 26kDa.

Los Exp. 2709 y Exp. 3009 para la IgE, no arrojaron resultados importantes, debido a la débil respuesta del anticuerpo y los sueros de los pacientes estudiados (Figura 28 y 30).



Figura 28: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgE (Exp. 2709).

A – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides*, B – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* y otros parásitos, C – Individuos positivos para Otros parásitos, D – No se observaron parásitos, Paciente 117: NSOP de la Clínica Popular de Catia. Proteínas observadas en WB y reportadas en el perfil proteico: 1 – 95 kDa y 2 – 44 kDa.

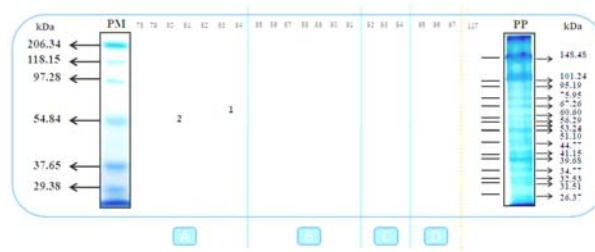


Figura 29: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgE (Exp. 2909).

A –Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides*, B – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* y otros parásitos, C – Individuos positivos para Otros parásitos, D – No se observaron parásitos, Paciente 117: NSOP de la Clínica Popular de Catia. Proteínas observadas en WB y reportadas en el perfil proteico: 1 – 60 kDa, 2 – 56 kDa.



Figura 30: Identificación de proteínas inmunogénicas con anticuerpos de tipo IgE (Exp. 3009).

A –Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides*, B – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* y otros parásitos, C – Individuos positivos para Otros parásitos, D – No se observaron parásitos, Paciente 117: NSOP de la Clínica Popular de Catia. Proteínas observadas en WB y reportadas en el perfil proteico: 1 – 44 kDa y 2– 25 kDa.

B.- Cuantificación de IgG e IgE frente al extracto soluble de *Ascaris lumbricoides*, mediante la técnica de ELISA.

Para conocer la positividad de la población frente al extracto soluble de *Ascaris lumbricoides*, se realizaron ensayos ELISA para comparar la respuesta de los sueros evaluados en WB y los niveles de IgG e IgE frente a este antígeno. Para ello se calculó el punto de corte para cada isotipo a partir de los individuos que no presentaban parásitos en heces (NSOP) (Tabla I).

Tabla I: Valores de D. O. y puntos de corte para la cuantificación de IgG e IgE.

	NSOP	Cálculo para la IgG. (+) (-) 0,38 < D.O. < 0,38			NSOP	Cálculo para la IgE. (+) (-) 0,16 < D.O. < 0,16		
	0,0445				0,2145			
	0,141				0,401			
	0,288				0,1665			
	0,24				0,302			
	-0,012				0,1865			
	0,351				0,2015			
	0,4665				0,1795			
	0,3925				0,207			
	0,416				0,179			
	0,547				0,2035			
	0,404				0,185			
	0,194				0,1825			
	0,1705				0,204			
	0,1153				0,105			
	0,1028				0,18			
	0,0743				0,092			
0,0953	0,146							
0,0853	0,1325							
PROMEDIO	0,2286667	0,0634519	PROMEDIO – (EL BLANCO)	PROMEDIO	0,1926667	0,0268333	PROMEDIO – (EL BLANCO)	
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0,1605831			DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0,0691907			
	0,3211661				0,1383814			
PUNTO DE CORTE	0,3846181			PUNTO DE CORTE	0,1652147			

Se estableció como positivos los sueros de los pacientes evaluados para la inmunoglobulina G, cuya D.O. fuese superior al punto de corte ($0,38 \text{ D.O.} < x$) y para la inmunoglobulina E, cuya D.O. fuese superior al punto de corte ($0,165 \text{ D.O.} < x$). Se tomaron como negativos a los sueros cuya D.O. fuese inferior al punto de corte ($x < 0,38 \text{ D. O.}$), y se tomaron como negativos a los sueros cuya D.O. fuese inferior al punto de corte ($x < 0,165 \text{ D. O.}$) para el isotipo IgE.

La sensibilidad y especificidad de la ELISA con sus intervalos de confianza, se determinaron utilizando los sueros de las poblaciones descritas anteriormente como el patrón de comparación, como se puede apreciar en las siguientes Figuras:

B.- 1. Densidades Ópticas obtenidas en los ELISA- IgG

En los Grupos A (*Asc. lumbricoides*) (Figura 31), se detectaron 14 individuos por encima del punto de corte, mientras 18 individuos fueron seronegativos, aún cuando estos últimos tenían huevos del parásito en sus heces. En el caso de los individuos del grupo B (*Asc. lumbricoides* más otras parasitosis), 32 individuos eran seropositivos y 3 niños fueron negativos (Figura 32).

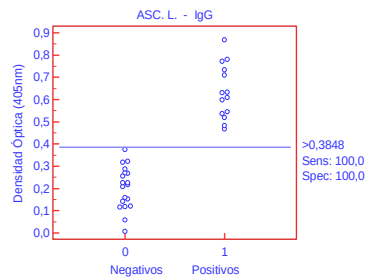


Figura 31: Dispersión de los sueros positivos y negativos para la IgG contra *Ascaris lumbricoides* en individuos positivos para *Ascaris lumbricoides*.

Los valores se agrupan de acuerdo a las densidades ópticas obtenidas para los individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* y evaluados contra el conjugado del anticuerpo IgG.

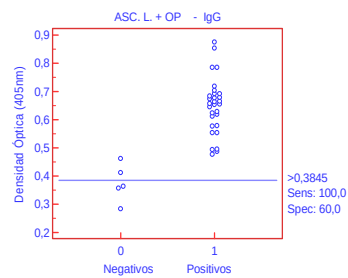


Figura 32: Dispersión de los sueros positivos y negativos para la IgG contra *Ascaris lumbricoides* en individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* más otras parasitosis.

Los valores se agrupan de acuerdo a las densidades ópticas obtenidas para los individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* más otras parasitosis, y evaluados contra el conjugado del anticuerpo IgG.

Para el Grupo C (Otras parasitosis) se observan 17 pacientes seropositivos, y 3 pacientes negativos. (Figura 33).

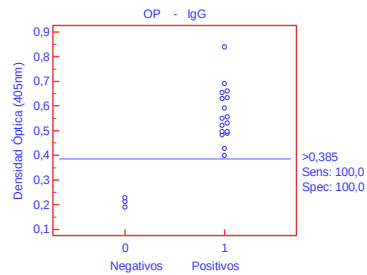


Figura 33: Dispersión de los sueros positivos y negativos para la IgG contra *Ascaris lumbricoides* en individuos positivos para otras parasitosis sin *Ascaris lumbricoides*.

Los valores se agrupan de acuerdo a las densidades ópticas obtenidas para los individuos positivos para otras parasitosis, y evaluados contra el conjugado del anticuerpo IgG.

En el grupo D (individuos que no presentaron huevos de parásitos en heces), se observaron algunos individuos con altos valores de densidad óptica, se detectaron mayor número de individuos seropositivos. Lo que concuerda con lo que podríamos esperar de este grupo (Figura 34).

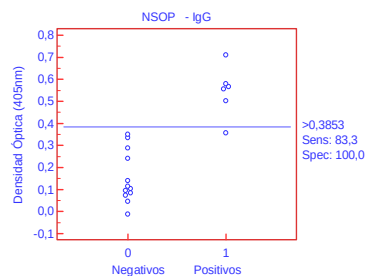


Figura 34: Dispersión de los sueros positivos y negativos para la IgG contra *Ascaris lumbricoides* en individuos no parasitados.

Los valores se agrupan de acuerdo a las densidades ópticas obtenidas para los individuos positivos para los individuos donde no se observaron parasitosis, y evaluados contra el conjugado del anticuerpo IgG.

Comparación de los niveles de IgG entre los grupos evaluados.

En la figura 35 encontramos que para la IgG, el promedio de los valores de densidad óptica del grupo A es menor que los valores del grupo B, pero estos fueron mayores que el grupo C y el grupo D, respectivamente.

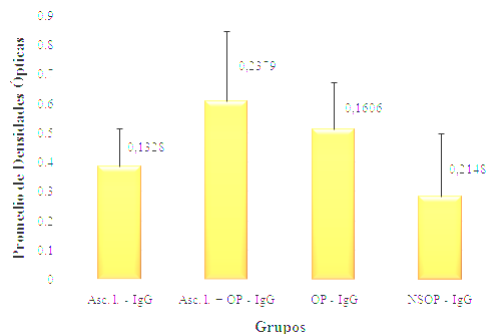


Figura 35: Promedio de los valores de Densidades Ópticas obtenidas para los diferentes grupos evaluados, contra el conjugado del anticuerpo IgG y sus respectivas desviaciones estándar.

De izquierda a derecha A –Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides*, B – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* y otros parásitos, C – Individuos positivos para Otros parásitos, D – No se observaron parásitos.

B.- 2. Densidades Ópticas obtenidas en los ELISA- IgE.

Los Grupos A (*Asc. lumbricoides*) (Figura 36), y B (*Asc. lumbricoides* más otras parasitosis) (Figura 36 y 37), presentan individuos negativos, debido al bajo nivel de anticuerpo, lo que se presume corresponde con individuos que estén saliendo de la parasitosis.

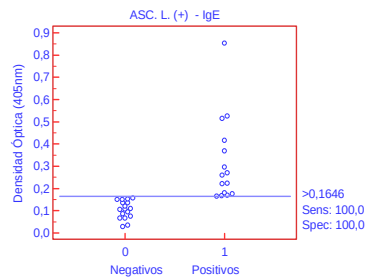


Figura 36: Dispersión de los sueros positivos y negativos para la IgE contra *Ascaris lumbricoides* en individuos positivos para *Ascaris lumbricoides*.

Los valores se agrupan de acuerdo a las densidades ópticas obtenidas para los individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* y evaluados contra el conjugado del anticuerpo IgE.

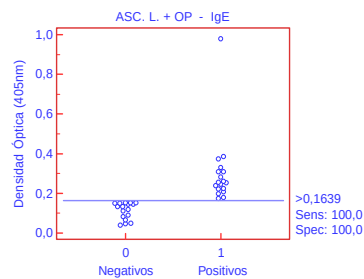


Figura 37: Dispersión de los sueros positivos y negativos para la IgE contra *Ascaris lumbricoides* en individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* más otras parasitosis.

Los valores se agrupan de acuerdo a las densidades ópticas obtenidas para los individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* mas otras parasitosis, y evaluados contra el conjugado del anticuerpo IgE.

Se observa un buen reconocimiento por parte de los sueros de los pacientes, que dan como positivos únicamente a 3 dentro del grupo C que representa otras parasitosis menos *Ascaris lumbricoides* (Figura 38).

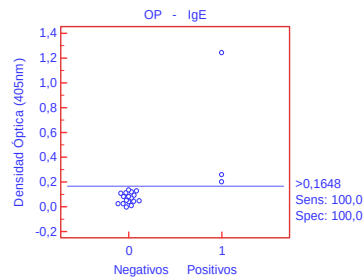


Figura 38: Dispersión de los sueros positivos y negativos para la IgE contra *Ascaris lumbricoides* en individuos positivos para otras parasitosis sin *Ascaris lumbricoides*.

Los valores se agrupan de acuerdo a las densidades ópticas obtenidas para los individuos positivos para otras parasitosis, y evaluados contra el conjugado del anticuerpo IgE.

Los valores presentados en la Figura 39, nos indican que los individuos poseen bajos niveles de anticuerpos anti-ascaris que puedan reaccionar con el isotipo IgE, mientras solo se detectaron dos pacientes seropositivos para estos antígenos.

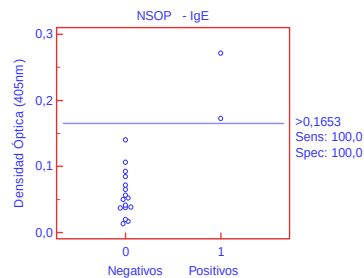


Figura 39: Dispersión de los sueros positivos y negativos para la IgE contra *Ascaris lumbricoides* en individuos no parasitados.

Los valores se agrupan de acuerdo a las densidades ópticas obtenidas para los individuos positivos para los individuos donde no se observaron parasitosis, y evaluados contra el conjugado del anticuerpo IgE.

Comparación de los niveles de IgE entre los grupos evaluados.

En la figura 40 encontramos que para la IgE, el promedio de los valores de densidad óptica del grupo A y B son muy similares y a su vez fueron mayores que el grupo C y el grupo D. Es importante destacar la desviación estándar de estos dos últimos grupos y compararlo con las Figuras 38 y 39, respectivamente.

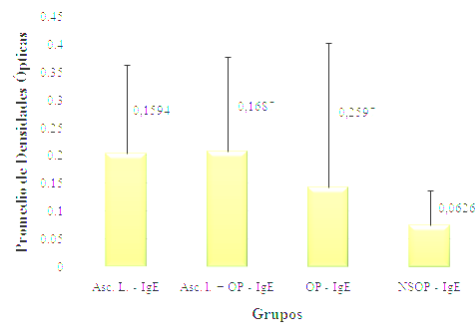


Figura 40: Promedio de los valores de Densidades Ópticas obtenidas para los diferentes grupos evaluados, contra el conjugado del anticuerpo IgE y sus respectivas desviaciones estándar.

De izquierda a derecha: A – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides*, B – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* y otros parásitos, C – Individuos positivos para Otros parásitos, D – No se observaron parásitos.

C.- Proteínas destacadas:

En las siguientes Figuras 41 y 42, observaremos 19 proteínas de diferentes masas moleculares las cuales fueron seleccionadas según: isotipo estudiado, número de apariciones en los Western Blot, D. O. obtenida en el ELISA y, presencia o

ausencia dentro del grupo de 16 proteínas presentes en el Perfil Proteico de *A. lumbricoides*.

Las proteínas mas resaltantes en orden de importancia, dentro este grupo de 19, son para IgG, las de 30, 29 y 41 kDa, como se puede observar en la Figura 41, ya que se presentan en gran número de oportunidades en los grupos A y B, los individuos que la presentaron dieron positivos para *Ascaris lumbricoides*, y en el caso de la proteína de 41 kDa, esta fue reportada dentro del las proteínas observadas en el perfil proteico del extracto soluble. Aún cuando las de 29 y 31 kDa, no fueron reportadas en el perfil proteico del extracto soluble de *Ascaris lumbricoides*, si fue reportada una de 32 kDa que pudiese ser la misma de 31 kDa.

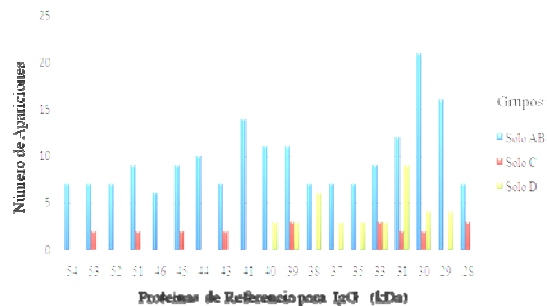


Figura 41: Número de reconocimiento de las proteínas presentes con mayor incidencia para IgG dentro del grupo de pacientes estudiados.

Grupos: A – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides*, B – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* y otros parásitos, C – Individuos positivos para Otros parásitos, D – No se observaron parásitos.

Dentro del grupo de 19 proteínas para IgE, encontramos que las proteínas mas resaltantes en orden de importancia fueron las de 52, 49, 41, 29 y 26 kDa, como se puede observar en la Figura 42, ya que se presentan en gran número de oportunidades en los grupos A y B, los individuos que la presentaron dieron positivos para *Ascaris lumbricoides*, y en el caso de las proteínas de 26 y 41 kDa, fueron reportadas dentro del las proteínas observadas en el perfil proteico del extracto soluble, y aún cuando la proteína de 52 kDa, no fue reportada en el perfil proteico del extracto soluble de *Ascaris lumbricoides*, si fueron reportadas las de 51 y 53 kDa que pudiese ser la misma de 52 kDa.

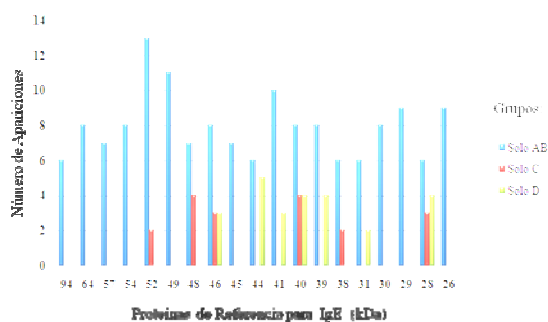


Figura 42: Número de reconocimiento de las proteínas presentes con mayor incidencia para IgE dentro del grupo de pacientes estudiados.

Grupos: A –Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides*, B – Individuos positivos para *Ascaris lumbricoides* y otros parásitos, C – Individuos positivos para Otros parásitos, D – No se observaron parásitos.

VI.- DISCUSIÓN

En nuestra investigación, los resultados y su respectivo análisis permiten indicar que la muestra estudiada tenía alta prevalencia de helmintos intestinales, como *Ascaris lumbricoides* en un 63% de la población total, similar a lo reportado en Venezuela (Díaz y Flores, 1990; Di Prisco y col., 2006; Cordero y col., 2009).

Esta parasitosis se encontró asociada con ambientes carentes de una salubridad apropiada. El sector geográfico donde residen la mayoría de los niños evaluados en el Edo. Miranda, se caracteriza por tener calles sin asfalto y carecer de un sistema de recolección de aguas servidas y basura. Estas últimas condiciones han sido íntimamente asociadas a una alta prevalencia de *Ascaris lumbricoides* por otros investigadores, tanto a nivel nacional (Hagel y col., 1995; Hagel y col., 2001; Hurtado, 2003; Di Prisco y col., 2006; Cordero y col., 2009), como a nivel internacional (Ishizaka, 1985; Christie y col., 1990; Capron y col. 1992; Crompton, 1994; Martínez y col., 2000; Yazdanbakhsh y col., 2002; Cerdas y col., 2003; Cooper y col., 2003; Gutiérrez y Orlich, 2004; Arruda, 2005; Escalante y col., 2005; Scott, 2008; Sánchez y col., 2010).

Los datos de las encuestas epidemiológicas en una variedad de infecciones por helmintos, indican que la infección no está uniformemente distribuida en una población, con una significativa variación en la intensidad de la infección, particularmente, en los grupos de edades más jóvenes (Pessoa y Vianna-Martins, 1977; Cazorla y col., 2006). En nuestro caso el 95% de la población estudiada estaba

representada por niños en edad escolar de ambos sexos, probablemente en esta etapa no se han adquirido aun buenos hábitos higiénicos y se presentan fenómenos de: onicofagia, geofagia, chuparse el dedo u otros objetos, rascado de región perianal/perineal, y luego llevan la mano a la boca sin habérselas lavado adecuadamente, ya sea antes o después de comer; el jugar con mascotas, las cuales pueden transportan en sus pelos los huevos de *A. lumbricoides*, entre otros (Pessoa y Vianna-Martins, 1977; Becerril y Romero, 2004; Cazorla y col., 2006). Sin embargo, otros investigadores han encontrado que la Ascariasis es más común en niños en edad escolar que en los preescolares, y consideran que los primeros poseen mayor contacto con el sucio y el polvo, ya que los niños en edad preescolar reciben mayores cuidados y atenciones por parte de sus maestros y cuidadores, donde sus horas de recreo se limitan a una merienda dentro del salón de clases (Becerril y Romero, 2004; Cazorla y col., 2006).

Estas variaciones necesitan ser consideradas cuando se diseñan las estrategias de control (McCarthy, 1996). La intensidad y prevalencia de la infección generalmente disminuye con el aumento de la edad, lo cual sugiere que la adquisición de la inmunidad, por efecto de exposición a la infección, es un fenómeno gradual y acumulativo (García y col., 1985; Maizels y col., 1993).

Nuestros resultados mostraron un predominio de individuos infectados del sexo femenino (59%) sobre el masculino (41%), como también lo reportaron en sus resultados (Abdul-Hadi y col., 2009; Díaz y col., 2009; Sánchez y col., 2010). Sin embargo, varios investigadores encuentran que los varones exhiben mayores tasas de

infección que sus pares del sexo femenino, posiblemente debido a que éstas desarrollan más tempranamente hábitos higiénicos (Becerril y Romero, 2004). Contrariamente, otros estudios no revelan diferencias estadísticamente significativas de las prevalencias entre sexos, lo que pudiera ser debido a que todos los individuos se encuentran similarmente expuestos a los mismos factores de riesgo (Rivera y col., 1996; Cazorla y col., 2006).

Así mismo las 3 parasitosis de mayor prevalencia para los individuos *Ascaris lumbricoides* positivos, fueron las de *Trichuris trichiura* 28 %, *Blastocystis hominis* en un 23 %, y *Giardia duodenalis* en un 19 % (Cazorla y col., 2006; Scott, 2008; Abdul-Hadi y col., 2009; Díaz y col., 2009; Sánchez y col., 2010).

Dentro de los factores que facilitan el mantenimiento y diseminación de la enterohelmintiasis, se encuentra, el hacinamiento familiar, escolar o de recintos como asilos, lo que facilita el contacto persona-persona (Pessoa & Vianna-Martins, 1977; Becerril & Romero, 2004; Scott, 2008). Un factor que deben tener siempre presente los individuos, es que los huevos del helminto pululan fácilmente en todos los ambientes, dispersos en el suelo, donde pueden permanecer viables hasta por 3 semanas, de allí que el aseo, tanto personal, familiar y hasta comunitario, es un factor relevante en la disminución de la contaminación por *Ascaris*.

En este mismo sentido, se ha comprobado, de allí el término “gusano de los asientos” (*threadworm*), que a través de los inodoros ocurre la transmisión de los huevos de *A. lumbricoides*, al posarse sobre los mismos un individuo infectado

(Becerril y Romero, 2004; Cazorla y col., 2006). Desconocer estas premisas condiciona su persistencia, principalmente en asentamientos humanos donde predominan las condiciones socio-económicas precarias, el hacinamiento y falta de educación en salud, y favorece que persistan altas tasa de infección. Actualmente habría que evaluar los refugios y estimar la presencia de parásitos intestinales.

El patrón de reconocimiento de las proteínas del extracto puro de *Ascaris lumbricoides*, en las diferentes obtenciones del perfil proteico, se mantuvo siempre heterogéneo y reproducible. Se observaron bandas a lo largo de todo el gel, y estas mismas con más o menos intensidad se presentaron en diversas ocasiones en las cuales se quiso corroborar la presencia de ellas para las diferentes alícuotas del extracto usado, generándose un total de 16 bandas proteicas entre: 148 y 26 kDa. Es importante mencionar que en nuestro estudio no se lograron observar bandas inferiores a 26 kDa, por tanto no se logró identificar las reportadas previamente con mayor frecuencia, como la proteína ABA de 14 kDa, lo que posiblemente se debió a que en el extracto quedasen restos de tejido celular entre otros detritos celulares, que no permitiesen una buena resolución de las proteínas en el gel y terminaran migrando junto con dichos detritos hasta el final de la corrida, ó alternativamente pudiesen haber quedado aglomeradas y solapadas junto a otras proteínas de un mayor peso molecular, ó posiblemente la resolución del gel no fue la más apropiada para llevar a cabo nuestro estudio. Es importante mencionar que dentro de las proteínas que se presentaron en el perfil proteico del extracto soluble de *Ascaris lumbricoides*, están las de: 31 kDa ya reportada (Kennedy y Qureshi, 1986; Christie y col., 1990;

McSharry y col., 1999; Gibiaqui, 2007; Alba y col., 2009), así como la de 29 kDa, que podrían ser en tal caso las mismas, y las de: 32, 39, 60 y 75 kDa reportadas para un extracto de cutícula de *Ascaris lumbricoides* femenino (Alba y col., 2009), así como la de 35 kDa, que podrían ser en tal caso la misma de 34,77 reportada por nosotros.

La proteína de 41 kDa, presentada por nosotros en el perfil proteico y con alto número de incidencia en los WB, tanto para el isotipo IgG, como para el isotipo IgE (Figuras 13,41 y 42), pudiese ser la ya reportada Tropomiosina (Santos y col., 2008; Acevedo y col., 2011). Recordando que las tropomiosinas en invertebrados tienen un peso molecular entre 38 y 41 kDa (Torres y col., 2003).

En cuanto al análisis inmunológico, encontramos que estas proteínas presentaron reconocimiento por parte de los sueros de los individuos de estudio en los Western Blot, indicando la posible importancia de estas proteínas desde el punto de vista antigénico en nuestras muestras.

El estudio de 2 Entidades Federales distintas, como lo son las comunidades rurales del Estado Miranda y los 2 Hospitales de Caracas, pudieron servir como método de identificación de verdaderos NSOP, ya que a medida que avanzábamos en la experimentación, nos percatamos que los individuos de las comunidades rurales, que en teoría no presentaban en heces ningún tipo de parásito, en las pruebas serológicas para ambos isotipos se observaba algún tipo de banda o marcaje proteico, lo que indicaba que al momento de la toma de muestra el individuo podría estar

desparasitado pero estaría haciendo uso la memoria inmunológica y generando anticuerpos contra una parasitosis previamente padecida por el individuo o ser positivo para *Ascaris lumbricoides* pero poseer baja carga de huevos en heces. Fue entonces cuando optamos por trabajar con un paciente de la Clínica Popular de Catia, el cual tenía como características, ser un infante de menos de un año y que en su historia no hubiese el reporte de ningún tipo de diarrea u otro indicio de presencia de alguna parasitosis.

En el estudio serológico para la infección por Ascariasis mediante la prueba de ELISA para IgG, se detectaron muestras positivas (Grupo A) con valores por debajo del punto de corte, lo que los catalogaba como negativos para la parasitosis, sin embargo al compararlo con los resultados obtenidos para el WB, se obtuvo el reconocimiento de algunas bandas (Figuras desde 14-17, 25-27), esto pudo ocurrir ya que el WB se caracteriza por tener mayor especificidad, particularmente cuando se observa presencia de anticuerpos dirigidos contra las fracciones livianas de 25 a 40 kDa, fracciones representadas en el perfil proteico obtenido a partir del extracto soluble de *Ascaris lumbricoides* (Magnaval y col., 1991). Además, estos resultados también podrían confirmar que dicha prueba podría tener un punto de corte alto, debido a los valores arrojados por los NSOP que como mencionamos anteriormente, no correspondían al perfil obtenido de individuos libres de parásitos. Sin embargo, el punto de corte calculado coincide con el de la marca comercial (NovaTec Immundiagnostica GmbH- Technologie & Waldpark).

Es importante recordar la proporción (80%),x< en la cual se encuentra la inmunoglobulina IgG en el organismo y la función que ejerce dentro del sistema inmunológico.

En el caso del isotipo IgE, se detectaron positivos algunos de los individuos que eran *Ascaris lumbricoides* negativos, pero con otras parasitosis, tal vez aun cuando para la prueba en heces no se observaron huevos del parásito *Ascaris lumbricoides*, puede que este individuo ya haya padecido dicha parasitosis, y tenga en su memoria inmunológica, la acción que desencadena la activación de la cascada celular que induce a la producción de las células B, que al entrar en contacto con un antígeno, van a transformarse en células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas, y en particular para el caso específico de la IgE. Además, es bien conocido que las infecciones por helmintos pueden llegar a durar años. Sin embargo, los resultados obtenidos mediante el ELISA para la población de estudio frente a la inmunoglobulina E, revelan resultados que confirman la eficiencia de dicha prueba y las técnicas realizadas previamente.

Por otro lado, podemos observar en las Figuras 41 y 42, que en los casos positivos, la intensidad de bandas observada en los WB, se correlacionó claramente con la DO obtenida en el ensayo de ELISA, más específicamente para la IgE (Figura 42). Según estos resultados podemos concluir que el ensayo de inmunodetección o WB, acá descrito podría constituir un método adecuado para el diagnóstico de la Ascariasis, particularmente útil en casos de áreas endémicas en lo que los test de

ELISA resulte negativo o positivo con valores de DO bajos, y en presencia de signos y/o síntomas de la infección.

El interés por el papel desempeñado por las infecciones parasitarias sobre los procesos alérgicos, y especialmente en el asma, decayó a mediados de la década de 1990, si bien en los últimos años ha renacido. En el estudio de Lynch y colaboradores, en 1993 se obtuvo una sustancial mejoría del asma, a pesar del aumento de la tasa de sensibilizaciones a inhalantes habituales, entre los pacientes tratados con antiparasitarios, mejoría que desaparecía 2 años después de suspendido dicho tratamiento. Luego, se ha reportado en Ecuador que las parasitosis intestinales protegían frente a la sensibilización alérgica y al broncospasmo inducido por ejercicio, pero no tenían efecto protector alguno frente a otros síntomas alérgicos (Copper y col., 2003). En nuestro estudio, aun cuando no se realizó un profundo análisis en los datos crudos recabados por las encuestas epidemiológicas, se pudo observar como en las historias clínicas del Jardín de Infancia Felipe Neri, reflejaban un 82% de la población estudiada positivos para pruebas alérgicas, asma bronquial, erupciones en la piel y hasta impétigo costroso, y luego de las pruebas serológicas, dichos pacientes resultaban positivos para *Ascaris lumbricoides*, lo que deja una interrogante sobre la ya debatida relación entre la presencia de IgE contra esta parasitosis y el efecto protector o no contra las enfermedades alérgicas.

Son evidentes las numerosas discordancias entre unos trabajos y otros y hay varias posibles explicaciones, según los autores. En primer lugar existe la posibilidad de los falsos positivos y negativos, aspecto importante, máxime si se tiene

en cuenta que los cuestionarios epidemiológicos empleados en algunos de estos estudios no eran instrumentos validados. En segundo lugar, todos los estudios citados han buscado una relación con la parasitosis endémica aparentemente dominante, pero no se ha analizado el papel de posibles parasitosis asociadas; además, ninguno de ellos ha investigado la carga ambiental de otros factores que puedan modular la respuesta inmunológica, tales como la exposición a endotoxinas, alérgenos, virus de la hepatitis A o cualquiera de los factores ligados al asma, por poner un ejemplo. Una tercera posibilidad es que algunos de estos efectos sean específicos de la especie de parásito y los datos contradictorios existentes en la bibliografía sean el resultado de la presencia de más de una infestación parasitaria. Esta explicación es, a nuestro juicio, una de las más tangibles; de este modo, el antígeno predominante al que responde una población, modularía el grueso de la respuesta inmunológica lo cual podría llevar a ser un marcador serológico.

Dado que la sensibilización alérgica es un factor de riesgo importante de asma en la mayoría de los países desarrollados, la ausencia de esta asociación en muchas poblaciones tropicales merece un análisis en profundidad. Si se confirmara la relación inversa entre ambas, referida en varios estudios, tendría importantes implicaciones en la teoría de la polarización inmunitaria de los linfocitos T en la patogenia de la enfermedad alérgica. Puesto que la erradicación de la infestación por parásitos es un problema sanitario universal, es muy importante conocer las consecuencias que dicha erradicación podría acarrear sobre las patologías alérgicas y la posible capacidad protectora de las proteínas del paciente.

VII.- CONCLUSIONES.

1.- Con el método empleado para la obtención del extracto proteico del verme adulto de *Ascaris lumbricoides*, se logró de una manera rápida y sencilla la obtención de un perfil proteico. Se observaron 16 proteínas de masas moleculares, 148,48; 101,24; 95,19; 75,95; 67,26; 60,60; 56,29; 53,24; 51,10; 44,77; 41,15; 39,68; 34,77; 32,53; 31,51 y 26,3 kDa respectivamente.

2.- Mediante ensayos de Western Blot, se indicaron diferencias en el patrón de reconocimientos para ambos isotipos en los sueros de los pacientes a muestrear. Se destacaron 19 proteínas, que pudiesen asociar la presencia de la misma con la presencia de la parasitosis. Las proteínas reconocidas en el suero de los individuos infectados por *Ascaris lumbricoides* según su número de apariciones fueron de: 30, 29, 41, 31, 39, 40, 44, 51, 33, 45, 38, 43, 35, 37, 54, 53, 28, 52 y 46 kDa para IgG, y de 52, 49, 41, 29, 26, 54, 46, 30, 64, 40, 39, 45, 48, 57, 94, 44, 28, 31 y 38 kDa para IgE. Las proteínas 29, 37, 28, 46, 49, 64 y 48 kDa respectivamente reconocidas por el suero de los individuos evaluados, no fueron observadas en el perfil proteico para el extracto soluble de *Ascaris lumbricoides*.

3.- Los resultados de los ensayos de ELISA, a partir de los antígenos del extracto soluble de *Ascaris lumbricoides*, indican que diferentes proteínas presentes en este extracto podrían estimular la producción de IgE en los niños estudiados. Además de que dichos ensayos permitieron definir los Grupos de estudio en el caso de IgE.

4.- Considerando que el estudio realizado fue de tipo exploratorio, se logró obtener un perfil proteico nunca antes reportado, tanto a nivel nacional como internacional, con 16 proteínas detectadas y reconocidas por los sueros de los pacientes de este estudio, donde se observo la proteína de 41 kDa ya reportada como tropomiosina.

VIII.- APÉNDICES.

Protocolos

Gel de corrida

Reactivos	10%	12%
Agua destilada	4.15 ml	3.35 ml
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml
Acrilamida 30%	3.30 ml	4.0 ml
SDS al 10%	100 µl	100 µl
Persulfato de Amonio	100 µl	90 µl
TEMED	10 µl	9 µl

Gel de Apilamiento 4%

Reactivos	2 geles	1 gel
Agua destilada	3.05 ml	1.525 ml
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	1.25 ml	625 µl
Acrilamida	650 µl	325 µl
SDS al 10%	50 µl	25 µl
Persulfato de Amonio	40 µl	20 µl
TEMED	10 µl	5 µl

PBS

Reactivo	Cantidad (g)
NaCl	8.0
KCl	0.2
Na ₂ HPO ₄	1.44
KH ₂ PO ₄	0.2

Se lleva a un litro con agua destilada a pH 7.4

TBS

Reactivo	Cantidad (g)
Tris-HCl 50nM	6.05
Na Cl 150nM pH 7.5	8.76

Se lleva a un litro con agua destilada a pH 7.5

Buffer de corrida

Reactivo	Cantidad (g)
Tris base	3.0
Glicina	14.4
SDS	1.0

Se lleva a un litro con agua destilada a pH 8.3

Buffer de transferencia

Reactivo	Cantidad
Tris base	3.03 g
Glicina	14.4 g
Metanol	200 mL

Se lleva a un litro con agua destilada a pH 8.3

IX.- BIBLIOGRAFÍA

IX.- 1. Referencias bibliográficas

- Abbas, A., Lichtman, A., 2004. Basic Immunology: Functions and disorders of the immune system. Saunders. Segunda Edición, Philadelphia- E.U.A.
- Abdul-Hadi, S., Figueira, I., Madera, C., Olaizola, C., Contreras, R., Sánchez, M., Colmenares, C., Safar, M. 2009. Estudio de la *Fasciolosis hepática* humana y parasitosis intestinales en el caserío Mesa Arriba del municipio Carache, estado Trujillo- Venezuela .Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. **29**:128-132.
- Acevedo, N., Erler, A., Briza, P., Puccio, F., Ferreira F., Caraballo, L.. 2011. Allergenicity of *Ascaris lumbricoides* Tropomyosin and IgE Sensitization among Asthmatic Patients in a Tropical Environment. *Int Arch Allergy Immunol.* **154**:195-206.
- Acuña, A., Calejari, L., Curto, S., Lindner, C., Rosa, R., Salvatella, R., Savio, M., Zanetta, E. 2001. Helminthiasis intestinales, Manejo de las geohelminthiasis. Ministerio De Salud Pública. Caracas – Venezuela.
- Alba, J., Comia, M., Oyong, F., Claveria, F. 2009. *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*: A comparison of electrophoretic banding patterns of

protein extracts from the reproductive organs and body wall. *Vet. Arhiv.* **79 (3)**: 281-291.

- Amati, L., Cirimele, D., Pugliese, V., Covelli, V., Resta, F., Jirillo, E. 2003. Nutrition and immunity: laboratory and clinical aspects. *Curr Pharm Des.* **9 (24)**: 1924-1931.
- Amesty-Valbuena, A., Castillo, J., Vicente-Villarroel, M., Núñez-González, J., Marcano, H., Colmenares, Y., Atencio, R., Rivero, M., Cayama, N. 2002. Citocinas proinflamatorias y proteína C reactiva en niños desnutridos graves infectados y en un grupo control. *Arch Venez Puer Ped.* **65 (3)**: 91-99.
- Anderson, R., Mary, R. 1991. Infections Diseases of Human. Dynamics and Control. Oxford, Oxford University Press.
- Arruda, L., Santos, M. 2005. ABR: Immunologic responses to common antigens in helminthic infections and allergic disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* **5**: 399-402.
- Asselin, S., Breban, M., Fradelizi, D. 1997. Action of cytokines IL-12 and IL-4 on T helper cells: Cellular immunity or humoral immunity. *Presse Med.* **26 (6)**: 278-283.
- Bardón, M. 1992. Contribución a la biología e inmunología de *Toxocara canis*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. España.

- Beaver, P., Jung, R., Cupp, E. 1986. Parasitología Clínica. Editorial Salvat, S.A. Segunda Edición. Barcelona-España.
- Becerril, M., Romero, R. 2004. Parasitología Médica. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 1ª Edición. México- DF.
- Bhaskaram, P. 2002. Micronutrient malnutrition, infection and immunity: an overview. *Nutr Rev.* **60 (52):** S40-5.
- Blum, H., Beier, H., Gross, J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gel. *Electroforesis.* **8:** 93-99.
- Bodini, R., Rada, D. 1980. Biología Animal Laboratorio. Editorial Ateneo de Caracas.Venezuela.
- Borish, L., Denver, C. 1998. Updates on cells and cytokines. *J. Allergy Clin Immunol.* **101 (3):** 293-297.
- Bundy, D., Wong, M., Lewis, L., Horton, J. 1990. Control of geohelminths by delivery of targeted chemotherapy through schools. *Transactions of the Royal society of Tropical Medicine and Hygiene.* **84:** 115-120.
- Caballero, S. 1998. Inmunología de la infección por helmintos *Rev. Esp. Alergol Inmunol Clín.* **13 (6):** 297-313.

- Capron, A., Dessaint, J., Capron, M. 1992. Allergy and Immune Defence: common IgE –dependent mechanisms or divergent pathways. Editor R. Moqbel. Allergy and immunity to helminths. Common mechanisms or divergent pathways? Taylor and Francis. London. **1-15**.
- Cazorla, D., Acosta, M., García, E., Garvett, M., Ruiz, A. 2006. *Enterobius vermicularis* infection in preschool and schoolchildren of six rural communities from a semiarid region of Venezuela: A clinical and epidemiological study. *Helminthologia*. **43 (2)**: 81-85.
- Cerdas, C., Araya, E. Coto, S. 2003. Parásitos intestinales en la escuela 15 de agosto, Tirrases de Curridabat, Costa Rica. Mayo-Junio de 2002. *Rev. Costarric Ciencia Médica*. **24(3-4)**: 127-133.
- Chandler, A., Read, C. 1965. Introducción a la Parasitología. Ediciones Omega, S.A. Barcelona – España.
- Christie, J., Dunbar, B., Davidson, I., Kennedy, M. 1990. N-terminal amino acid sequence identity between a major allergen of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*, and MHC-restricted IgE responses to it. *Immunology*. **69**: 596-602.
- Cooper, P., Chico, M., Rodrigues, L. 2003. Reduced risk of atopy among school-age children infected with geohelminth parasites in a rural area of the tropics. *J. Allergy Clin Immunol*. **111**: 995-1000.

- Cooper, P, Chico, M., Sandoval, C, Espinel, I, Guevara, A, Kennedy, M. 2000. Human infection with *Ascaris lumbricoides* is Associated with a Polarized Cytokine Response. *J. Infect Dis.* **182**: 1207-1213.
- Corado, J., Mora, S., 2003. Inmunología actual. Alfa Impresores. Primera edición. Carabobo- Venezuela.
- Cordero, R., Infante, B., Zabala, M., Hagel, I. 2009. Efecto de las parasitosis intestinales sobre los parámetros antropométricos en niños de un área rural de río chico. Estado Miranda, Venezuela. *Revista de la Facultad de Medicina.* **32(2)**:132-138
- Crompton, D. 1994. *Ascaris lumbricoides*. In parasitic and Infectious Diseases. Academic Press Inc. **14**: 175-196.
- Devera, R., Pérez, C., Ramos, Y. 1998. Enterobiasis en escolares de Ciudad Bolívar, Estado Bolívar, Venezuela. *Bol. chil. parasitol.* **53 (1-2)**: 14-18.
- Devera, R., Finali, M., Franceschi, G., Gil, S., Quintero, O. 2005. Elevada prevalencia de parasitosis intestinales en indígenas del Estado Delta Amacuro, Venezuela. *Rev Biomed.* **16**:289-291.

- Díaz, I., Flores, D. 1990. Prevalencia de parasitosis intestinales en alumnos de educación básica del Municipio Cacique Mara, Maracaibo, Estado Zulia. *Kasmera*. **18**:46-70.
- Díaz, S., Bastardo, N., Dib, J., Lea, M. 2009. Ascaridiasis biliar en un paciente pediátrico: Reporte de caso. *Gen*. **63(4)**: 296-297
- Di Prisco, M., Hagel, I., Puccio, F. 2006. Efectos moduladores de las parasitosis helmínticas en el desarrollo del asma y las enfermedades alérgicas. *VITAE*. **26**.
- Else, K., Finkelman, F., Maliszewski, C., Grencis, R. 1994. Cytokine mediate regulation of Chronic Intestinal Helminth Infection. *J. Exp. Med*. **179**: 347-351.
- Escalante, H., Liñan, R., Díaz, E., Davelois, K., Huamanchay, O., 2005 Antígenos de larvas pulmonares de *Ascaris suum* reconocidas por anticuerpos producidos en *Oryctolagus cuniculus*. *Parasitol Latinoam*. **60**: 132-137.
- Figuera, L. 1997. Helmintología Básica. Editorial Gráfica Leon S.R.L. Venezuela. **11-17**.
- García, H. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Univ Diag*; **1(2)**: 31-41.

- García, J., Martín, A., Pérez, M. 1985. Incidencia de parasitismos intestinales humanos en la Provincia de Salamanca. *Rev. Iber. Parasitol.* **45**:129-139.
- Geiger, C., Bethony, J., Soboslay, T., Carvalho, O., Correa, C. 2002. Cellular responses and cytokines profiles in *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infected patients. *Parasite Immunol.* **24 (11-12)**: 499-509.
- Gibiaqui, J. 2007. Capacidad del Líquido pseudocelómico de *Ascaris lumbricoides* de estimular la respuesta IgE en niños de comunidades endémicas venezolanas. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas- Venezuela.
- González, R., Barbadillo, I., Merino, A., Sánchez M. 1999. Aparato Digestivo. Parasitosis intestinales, protocolo diagnóstico-terapéutico. *Boletín de Pediatría.* **39**: 106-111.
- Gounni, J., Kusnierz, J., Vorng, H., Sarfati, M., Kinet, J., Tonnel, A., Capron, A., Capron, M. 1997. Expression and functions of the high affinity IgE receptor on human platelets and megakaryocyte precursors. *Eur. J. Immunol.* **27**: 2212-2218.

- Grogan, J., Kremsner, P., Van Dam, G. 1997. Anti-Schistosome IgG4 and IgE at 2 year after chemotherapy: infected versus uninfected individuals. *J. Infect. Dis.* **176(5)**: 1344-1350.
- Gutiérrez, L., Orlich, D. 2004. Pseudoobstrucción intestinal por *Ascaris lumbricoides*: Reporte de un caso clínico y revisión bibliográfica. *Revista Medica de Costa Rica y Centroamerica.* **61(569)**: 153-156.
- Hagel, I., Lynch, N., Pérez, M., Di Prisco, M., López, R., Rojas, E. (1993a). Modulation of the allergic reactivity of slum children by helminthic infection. *Parasite Immunol.* **15 (6)**: 311-5.
- Hagel, I., Lynch, N., Pérez, M., Di Prisco, M., López, R., Rojas, E. (1993b). Relationship between the degree of poverty and the IgE response to *Ascaris* infection in slum children. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **87 (1)**: 16-8.
- Hagel, I., Lynch, N., Di Prisco, M., 1995. Nutritional status and the IgE response against *Ascaris lumbricoides* in children from a tropical slum. *Trans Roy Soc of Trop Med Hyg.* **89**: 562-5.
- Hagel, I. 2001. Factores ambientales asociados a las respuestas helmínticas, que regulan la producción de inmunoglobulina E (IgE) en niños de diferentes comunidades rurales de Venezuela. Tesis doctoral en Inmunología, Universidad Central de Venezuela. Caracas - Venezuela.

- Hagel, I., Salgado, A., Rodríguez, O., Ortiz, D., Hurtado, M. 2001. Factores que influyen en la prevalencia e intensidad de las parasitosis intestinales en Venezuela. *Gac Med Caracas*. **109(1)**: 82-90.
- Hagel, I., Lynch, N., Puccio, F., Rodríguez, O., Luzondo, R., Rodríguez, P. 2003. Defective regulation of the protective IgE response against intestinal helminth *Ascaris lumbricoides* in malnourished children. *J Trop Pediatr*. **49 (3)**: 136-42.
- Hagel, I., Cabrera, M., Sánchez, P., Rodríguez, P., Lattouf, J. 2006. Role of the affinity IgE receptor (CD23) on the IgE response against *Ascaris lumbricoides* in Warao Amerindian children from Venezuela. *Invest Clin*. **47(3)**: 241–251.
- Holgate, S., Church, M. 1993. Allergy, editado por Gower Medical Publishing, London, New York.
- Hurtado, M. 2003. Estado nutricional antropométrico y respuesta inmune frente a helmintos gastrointestinales, en niños indígenas de la etnia Warao. Tesis de Maestría, Universidad Central de Venezuela. Caracas – Venezuela.
- Ishizaka, K., 1985. Twenty years with IgE: From the identification of IgE to regulatory factors for the IgE response. *J. Immunol*. **135**: 1-I.

- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Capra, D. 2000. *Inmunologia. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*. Masson; Barcelona.
- Jiang, G.Z., Kato, Y., Sugiyama, T., Koide, N. 1998. Role of CD86 (B7-2) in triggering of antigen –specific IgE antibody response by lipopolysaccharide. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. **21(4)**: 303-311.
- Junquera, P. 2010. Benzimidazoles como antihelmínticos para el control de gusanos (helminths) endoparásitos en bovinos. http://parasitosdelganado.net/index.php?option=com_content&view=article&id=206&Itemid=293. Última actualización Jueves 14 de Octubre de 2010 07:28. [Consulta: 20 de Enero de 2011].
- Kennedy, M., Qureshi, F. 1986. Stage-specific secreted antigens of the parasitic larval stages of the nematode *Ascaris*. *Immunology*. **58**: 515-522.
- Kennedy, M., Gordon, A., Tomlinson, L., Qureshi, F. 1987. Genetic (major histocompatibility complex?) Control of the antibody repertoire to the secreted antigens of *Ascaris*. *Parasite Immunology*. **9**: 269-273.
- Kennedy, M. 2000. The nematode Poliprotein Allergens/Antigens. *Parasitology Today*. **16**: 3737-380.

- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680–685.
- Leonardi-Bee, J., Prichard, D., Britton, J. 2006. Asthma and current intestinal parasite infection: systematic review and meta-analysis. *Am J Respir Crit Care Med*. **174**: 514-523.
- Loreille, O., Roumat, E., Verneau, O., Bouchet, F., Hanni, C. 2001. Ancient DNA from *Ascaris*: extraction amplification and sequences from eggs collected in coprolites. *Int J Parasitol*. **31(10)**:1101-6.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. 1951. Protein Measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. **193**: 265-275.
- Lynch, N.R., Hagel I., Pérez, M., Di Prisco, M., López, R., Álvarez, N. 1993. Effect of antihelminthic treatment on the allergic reactivity of children in a tropical slum. *J. Allergy Clin. Immunol.* **92**: 404-411.
- Lynch, N., Hagel, I., Palenque, M., Di Prisco, M., Escudero, J., Corao, L., Sandia, J., y colaboradores. 1998. Relationship between helminthic infection and IgE response in atopic and nonatopic children in a tropical environment. *J. Allergy Clin. Immunol*. **101**: 217-221.
- Magnaval, J., Fabre, R., Maurieres, P., Charlet, J., De Larrard, B. 1991. Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariosis. *Parasitol Res*. **77**: 697-702

- Maizels, R., Bundy, D., Selkirk, M., Smith, D., Anderson, R. 1993. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature*. **365**: 797-805.
- Maldonado, A., Jorin, J. 2000. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana*. Disponible en internet: <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/16%20ELECTROFORESIS%20GELES%20PAA.pdf>. Feb 2010. [Consulta: 28 de Noviembre de 2010].
- Markell, E., Voge, M., John, T. 1994. Parasitología Médica. Editorial Interamericana. Sexta Edición. Madrid- España.
- Martínez, I., Gutiérrez, M., Fernández, A., Vázquez, O., Pérez, M., García, Y. 2000. Inmunoepidemiología de *Ascaris lumbricoides* en escolares de la ciudad de México. *Rev.Mex.de Patologia Clinica*. **47**: 1.
- Mathews, C., Van Holde, K., Ahern, K. 2003. Bioquímica. Pearson Education, S. A. Tercera Edición. Madrid – España.
- McCarthy, J., Nutman, T. 1996. Perspective: prospects for development of vaccines against human helminth infections. *J Infect Dis*. **174**: 1384-90.
- McReynold, L., Kennedy, M., Selkirk, K. 1993. The Polyprotein Allergens of Nematodos. *Parasitology Today*. **9(11)**:43-406.

- McSharry, C., Xia, Y., Holland, C.V., Kennedy, M.W. 1999. Natural immunity to *Ascaris lumbricoides* associated with immunoglobulin E antibody to ABA-1 allergen and inflammation indicators in children. *Infection and Immunity*. **67 (2)**: 484-489.
- MSDS, 1999. Dirección de Epidemiología, Boletín Epidemiológico de la República Bolivariana de Venezuela. Departamento de Estadísticas.
- Mosmann, T., Sad, S. 1996. The expanding universe of T-Cell subsets: Th1 Th2 and more. *Immunol Today*. **17**: 138-146.
- Moqbel, R., Walsh, G.M., Nagakura, T., MacDonald, A.J., Wardlar, A.J., Likura, Y., Kay, A.B. 1990. The effect of platelet activating factor on IgE binding to and IgE dependent biological properties of human eosinophils. *Immunology*. **70**: 251-257.
- Muñoz, C., Schlesinger, L., Cavaillon, J. 1995. Interaction between cytokines, nutrition and infection. *Nutrition Research*. **15 (12)**: 1815-1844.
- Neghme, A. y Silva, R. 1971. Ecología del parasitismo en el hombre. *Bol. Of. Sanit. Panam*. **70**:313-323.
- Nelson, K., Darby, J. 2001. Inactivacion of viable *Ascaris* eggs by reagents during enumeration. *Appl. Environ. Microbiol*. **67(12)**: 5453-5459.

- Noemi, H. 1999. Eosinofilia y parasitosis. *Reviews Children Pediatrics*. **70 (5)**: 435-440.
- Obihara, C., Beyers, N., Gie, R. 2006. Respiratory atopic disease, *Ascaris*-immunoglobulin E and tuberculin testing in urban South African children. *Clin Exp Allergy*. **36**: 640-648.
- Ortiz, D., Alfonso, C., Hagel, I., Rodríguez, O., Ortíz, C., Palenque, M., Lynch, N. 2000. Influencias de las infecciones helmínticas y el estado nutricional en la respuesta inmunitaria de niños venezolanos. *Rev Panam Salud Pública*. **8(3)**: 156-163.
- O'Lorcain, P., Holland, C. 2000. The public health importance of *Ascaris lumbricoides*. *Parasitology*. **121**: S51-S71
- Palmer, L., Celedon, J., Weiss, S., Wang, B., Fang, Z., Xu, X. 2002. *Ascaris lumbricoides* infection is associated with increased risk of childhood asthma and atopy in rural China. *Am J Respire Crit Care Med*. **165**: 1489-93.
- Pessoa, S., Vianna-Martins, A. 1977. *Parasitología Médica*. 10 a edición. Río Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan.
- Prichard, R., Hall, C., Kelly, J., Martin, C. Donald, D. 1980. The problema of anthelmintic resistance in neatodes. *Australian Veterinary Journal*. **56**: 239-251.

- Prichard, D., Quinnel, R., Walsh, C. 1995. Immunity in human yo Necator Americanus. *Parasite Immunology*. **17**: 605-607.
- Prichard, D., Hewitt, C., Moqbel, R. 1997. The relationship between immunological responsiveness controlled by helper TH2 lymphocytes and infections with parasitic helminths. *Parasitology*. **115**: 33-44.
- Prichard, R., Oxberry, M., Bounhas, Y., Sharma, S., Lubega, G., Geary, T. 2000. Polymerisation and benzimidazole binding assays with recombinant a- and b-tubulins from *Haemonchus contortus*. *American Association of Veterinary Parasitologists, 45th Annual Meeting*. Abstract 108.
- Quintero-Victoria, A., Torres-Farias, D., Villalobos-Beuses, M., Nápoles, M., Pérez, L., Villalobos-Perozo, R. 2008. Pancreatitis ascaridiana aguda en niños en el Hospital “Nuestra Señora de Chiquinquirá” de Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. *Kasmera*. **36(2)**:129-136.
- Rabilloud, T. 1992. Comparison between low background silver diamine and silver nitrate protein stains. *Electrophoresis*. **13**: 429-439.
- Rey, L. 1991. Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. Editora Guanabara Koogan. Segunda Edição. Brasil.

- Rivera, R., Acevedo, C., Casanova, I., Hernández, S., Malaspina, A. 1996. Enteroparasitosis en escolares de dos unidades educativas rurales del Municipio la cañada. Estado Zulia-Venezuela. *Arch Venez Pueric Pediatr.* **71(2)**: 42-47
- Rodríguez, L., Gonzalez, C., Flores, L., Jimenez-Zamudio, L., Graniel, J. Ortiz, R. 2005. Assessment by flow cytometry of cytokine production in malnourished children. *Clin Diagn Lab Immunol.* **12 (4)**: 502-7.
- Rojas, E., Suárez, Z., Izquierdo, P., Torres, G., García, A. 2006. Composicion lipídica de la membrana mitocondrial interna del músculo de *Ascaris suum*. *Rev.Cient. Fcv-Luz.* **16 (2)**: 105-112.
- Sánchez, R., Patricio, V., Vázquez, J. 2010. Perforación apendicular por *Ascaris lumbricoides* en zona endémica de Chiapas. Presentación de un caso. *Cir Gen.* **32(1)**:58-60
- Sanger, N., Gill, J. 1999. Pharmacology of anthelmintic resistance. *Parasitol Today.* **15**: 141-146.
- Santos, A., Rocha, G., Oliver, C., Ferriani, V., Lima, R., Palma, M., Sales, V., Aalberse, R. y colaboradores. 2008. Cross-reactive IgE antibody responses to tropomyosins from *Ascaris lumbricoides* and cockroach. *J Allergy Clin Immunol.* **121(4)**:1040-6.e1.

- Scarcella, S., Ceriani, C., Rodríguez, J., Solana, H. 2007. Caracterización de la proteína microtubular de diferentes helmintos parásitos. Sus implicancias en el modo de acción de los benzimidazoles antihelmínticos. *REDVET*. **8(6)**.
- Schäfer, T., Meyer, T., Ring, J. 2005. Worm infestation and the negative association with eczema (atopic/nonatopic) and allergic sensitization. *Allergy*. **60**: 1014-1020.
- Scott, M. 2008. *Ascaris lumbricoides*: Una revisión de su epidemiología y su relación con otras infecciones. *Ann Nestlé [Esp]*. **66**: 7-22.
- Simeon, D., Grantham-McGregor, S., Callender, J. & Wong, M. 1995. Treatment of *Trichuris trichiura* infections improves growth, spelling scores and school attendance in some children. *J. Nutrit.* **125 (7)**: 1875-1883.
- Solomon, E., Berg, L., Martín, D. Ville, C. 1996. Biología de Ville. McGraw-Hill-Interamericana. Tercera Edición. 569-570, 1161.
- Soto, C. 1998. Immunología de la infección por helmitos. *Alerg e inmunolog Clín*. **13 (6)**: 297-313.
- Spielberg, H., O'Connor, R., Simon, R., Mathison, D. 1979. Lymphocytes with immunoglobulin E receptor in patients with atopic disorders. *Journal Clinical Investigation*. **64**: 714-720.

- Stephenson, L., Latham, M., Kurz, K. 1989. Treatment with a single dose of albendazole improves growth of Kenyan schoolchildren with hookworm, *Trichuris trichiura*, and *Ascaris lumbricoides* infections. *ASTMH*. **41 (1)**: 78-87.
- Stiehm, E., Fulginiti, V. 1973. Immunologic disorders in infants and children. USA, Saunders.
- Stiles, C. 1915. The school grades attained by 2.166 white school children (1062 boys, 1104 girls) in the city of x, classified by age, sanitation, and intestinal parasites. *US Public Health Reports*. **121**.
- Stranieri, M., Silva, I., Molina, Y., Monges, D., Montenegro, L., Morales, M., Dávila, I. 2009. Parasitosis intestinales en alumnos de la Unidad Educativa Carabobo. Belén, Municipio Carlos Arvelo, Estado Carabobo, Venezuela. *Comunidad y Salud*. **7(1)**: 23-28
- Tamayo, L., Carvallo, F., Pozo, E. 2007. Enclavamiento de *Ascaris lumbricoides* en vía biliar: Presentación de un caso. *Rev. Cuadernos*: **52 (1)**: 78 - 81
- Tay, J. 1993. Microbiología y Parasitología Médica. Méndez Editores, México D. F.
- Torres, J., Martínez, J., Tejero, J. 2003. Reactividad cruzada entre pescados y mariscos. *Allergol et Immunopathol*. **31(3)**:146-51.

- Towbin, H., Elson, D. 1976. The use of a cleavable crosslinking reagent to identify neighboring proteins in the 30-s ribosomal subunit of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **63**, 83-92
- Turner, J., Faulkner, H., Kamgno, J., Cormont, F., Van Snick, J., Else, K., Grencis, R., Behnke, J., Boussinesq, M., Bradley, J. 2003. Th-2 Like Cytokine Responses Correlate with Age-dependent Reduction in Worm Burdens in a Human Intestinal Nematode Infection. *J Infect Dis.* **188**: 1768-1755.
- Valbuena, D., Díaz, S., Botero, L., Cheng, R. 2001. Detección de helmintos intestinales y bacterias indicadoras de contaminación en aguas residuales, tratadas y no tratadas. *Kasmera.* **28**: 27-35.
- Verwaerde, C., Joseph, M., Capron, M., Pierce, R., Daumonneville, M., Velge, F., Ariault, C., Capron, A. 1987. Functional properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for *Schistosoma Mansoni*. *Journal Immunology.* **138**: 4441-4446
- Vial, H., Traore, M., Failamb, R. 1999. Renewed strategies for drug development against parasitic diseases. *Parasitol Today.* **15**: 393-394.
- Villaroel, M., Valbuena, A., Pereira, N. 2008. Citocinas TH2 (IL 4 e IL10) en el niño desnutrido: Universidad del Zulia, Maracaibo - Venezuela. *Arch Venez Puer Ped.* **2**: 42-47.

- Yazdanbakhsh, M., Kremmsner, P.G., Van Ree, R. 2002. Allergy, parasite and the hygiene hypothesis. *Science*. **296**: 490-494.
- Yamaoka, K., Kolt, J.P., Miyasaka, N., Inuo, G., Fujita, K. 1994. Purified excretory-secretory component of filarial parasite enhances Fcε RII/CD23 expression on human splenic B and T cells and IgE synthesis while potentiating T-helper type 2-related cytokine generation from cells. *Immunology*. **81**: 507-512.
- WHO. 1987. Prevention and control of Intestinal Parasitic Infections. Geneva: World Health Organization. Technical Report Series. 749.

IX.- 2. Consultas en línea:

- <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/westernblot.htm> [Consulta: 05 de Octubre de 2009].
- <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/fraccionamiento.htm> [Consulta: 15 de Octubre de 2009].
- <http://www.medwave.cl/medios/atencionprimaria/atencionprimariainfantil/CursoExtPedHSBAediciones2006/VacunasIDFig1.jpg> [Consulta: 15 de Octubre de 2009].
- <http://www.labolan.es/categorias.php?idarea=17&p=395&lang=es> [Consulta: 10 de Enero de 2010].

- http://www.deltalab.es/catalogo/Pdf_ESP/bolsas_y_kits_para_toma_de_muestras.pdf [Consulta: 10 de Enero de 2010].
- <http://actualmd.blogspot.com/2008/12/hipertensin-resistente-diagnostico.html> [Consulta: 10 de Enero de 2010].
- www.cultek.com/img/web/BSE-productos-KIT-DE-W... [Consulta: 19 de Enero de 2010].
- http://1.bp.blogspot.com/_G8kpFmtoA9w/TAQAYUWZ8hI/AAAAAAAAAAAM/DXFPn1Jiyh4/s1600/Adultos_ascaris.jpg [Consulta: 19 de Enero de 2010].
- probes.invitrogen.com/handbook/images/g001475.gif [Consulta: 24 de Febrero de 2010].
- http://www.clontech.com/images/products/1240_fig1.gif [Consulta: 24 de Febrero de 2010].
- www.molecularstation.com/images/western-blot.gif [Consulta: 24 de Febrero de 2010].
- <http://www.angelfire.com/trek/biometriaygenetica/practicass.PDF> [Consulta: 01 de Abril de 2010].
- http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/nemátodos/imagenes/Ascariasisciclo_CDC.jpg. [Consulta: 01 de Abril de 2010].

- <http://parasitologiaclinique.blogspot.com/2010/05/ascaris-lumbricoides.html> [Consulta: 15 de Enero de 2011].
- <http://paralosparasitosdelavida.blogspot.com/2010/10/ascaris-lumbricoides-clasificacion-y.html> [Consulta: 15 de Enero de 2011].

X.- ANEXOS

