

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

CHÁVEZ R. F.<sup>1,3</sup>, CHAVEZ R. M. I.<sup>1</sup>, MUÑOZ E. J. J.<sup>2</sup>, REVELES H.R.R.<sup>1</sup>, MORALES V. M.<sup>3</sup>, y MORENO G. M. A.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Unidad Académica de Ciencias Biológicas, UAZ, México.

<sup>2</sup> Unidad Académica de Odontología, UAZ, México.

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias Biológicas UANL, México.

## ABSTRACT

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

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

## RESUMEN

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

Recibido: 14 de Julio de 2013. Aceptado: 26 de Agosto de 2013.

Correspondencia: Francisca Chávez Ruvalcaba. Genaro Codina #265 Fracc: Ramón López Velarde, Guadalupe, Zacatecas, CP. 98600.

E-mail: charuva@hotmail.com

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

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

## INTRODUCCIÓN

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

Los estudios en México sugieren que la parasitosis se distribuye en la zona centro del país, sin embargo la situación actual de la trichinellosis humana no refleja la verdadera situación epidemiológica de la enfermedad parasitaria en México. Permite mantener al parásito muy cerca de la población humana, en forma de infección de los cerdos de traspatio y otros animales como el caballo, que eventualmente y sin control sanitario, puede usarse como carne de consumo. En Zacatecas se reportó el primer brote en 1976, en la década de 2000-2010, se ha detectado en cerdo, rata, perro y humano lo cual nos indica su permanencia como zoonosis endémica en este

estado (Berumen *et al*, 2002). Chávez *et al*, (2006) encontró disminución de la carga parasitaria en murinos en fase intestinal y muscular tratados con albendazol. El objetivo del presente trabajo fue: caracterizar la respuesta inmune e histológica en ratas Long Evans infectadas con *T. spiralis* y tratadas con Albendazol e Ivermectina.

## MATERIAL Y MÉTODOS

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

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

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

infección y se sacrificó a los 28 días de haber terminado el tratamiento. Antes de sacrificar se toma muestra sanguínea y al sacrificar se obtiene porciones de tejido muscular (lengua, masetero, pierna, diafragma e intercostal), para realizar las técnicas de compresión de tejido y digestión artificial, para observar la presencia, cantidad y características del parásito. En fase digestiva se obtiene el intestino delgado de cada rata para recolectar hembras y machos adultos.

Se obtuvo el antígeno soluble total de *T. spiralis* a partir de LI de *T. spiralis*, se determinó la cantidad de proteínas para realizar las diferentes pruebas inmunológicas.

Se evaluó la triple respuesta de Lewis, por medio de intradermorreacción, aplicado antígeno de *T. spiralis* en el lomo del animal. Con los sueros problema se realizó la técnica de microimmunodifusión para observar la reacción del complejo Ag-Ac, también se realizó el corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida (EGPA), para después transferirlo en papel de nitrocelulosa y evaluar el patrón de bandeo de cada tira. Se realizó la técnica de hematoxilina-eosina para ver los cambios morfológicos de tejido muscular y ver la afección en las LI por los diferentes tratamientos.

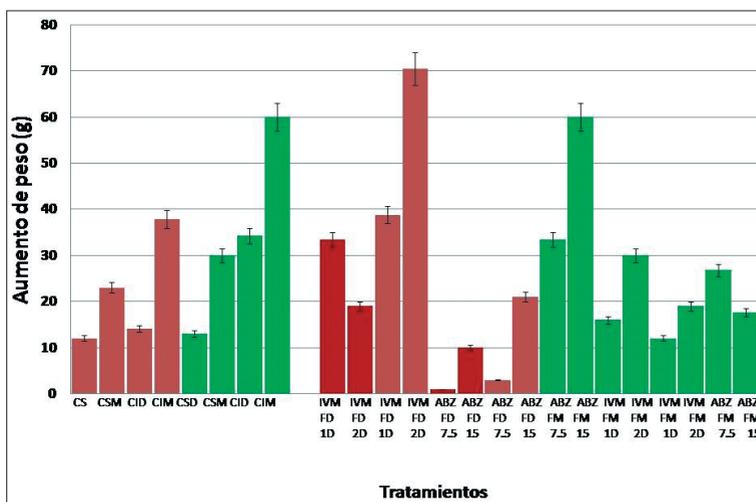
## RESULTADOS

En los grupos tratados con Ivermectina en fase digestiva con una y dos dosis, encontramos

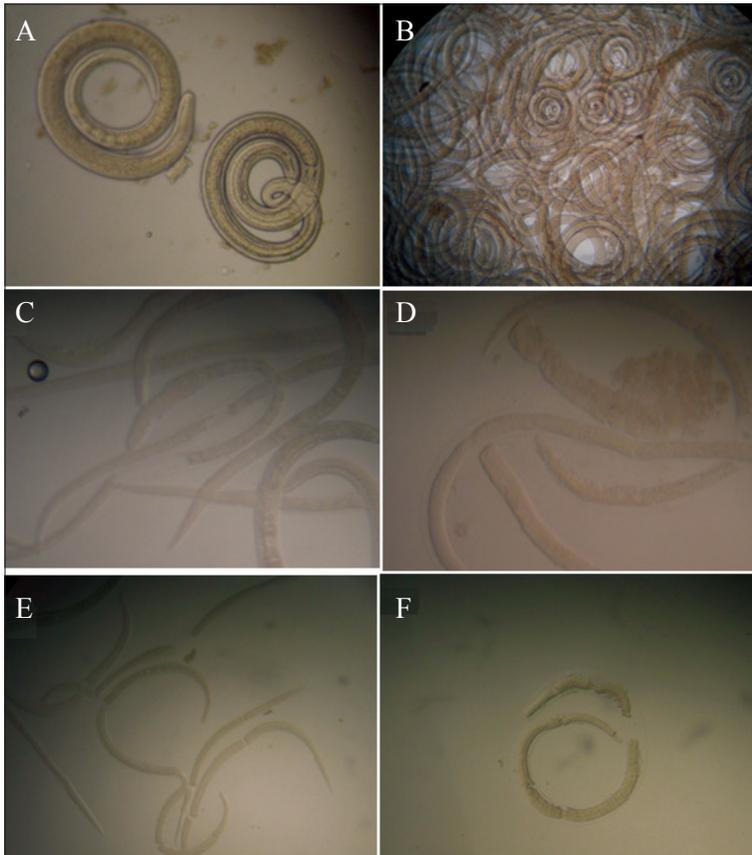
diferencia entre los grupos de hembras y machos, siendo los machos los que presentaron un mayor aumento de peso, principalmente en el que se le administraron dos dosis de IVM, contrario a las hembras que presentaron un mayor aumento en el grupo al cual se le administró una dosis de IVM. En los grupos tratados con ABZ en fase digestiva se pudo observar que solo el grupo de hembras tratadas con 7,5 mg de ABZ no presentaron diferencia en el aumento de peso (Figura 1). En la técnica de Bolas Fernández se obtuvieron adultos hembras y machos, por medio de la digestión artificial se obtuvieron en promedio 5.600 LI *T. spiralis* de (Figura 2) y compresión de tejido en los grupos tratados con ivermectina y albendazol se observó alteración en la morfología del parásito (Figura 3), mientras que en las Intradermorreacciones hubo una mayor respuesta al antígeno a las 24 h en control infectado y los infectados y tratados con las diferentes dosis y fármacos, presentando sólo negativos en controles sanos y el resto de los grupos positivos, en la inmuno-electrotransferencia se presentó el triplete característico de 42, 45 y 48 kDa en las bandas de los grupos infectados y los tratados (Figura 4).

## DISCUSIÓN

Los murinos de control sano, presentan un aumento de tamaño y peso proporcional al que muestran los controles sanos, tanto en hembras como machos, mientras que en las hembras tratadas con



**Figura 1.** Gráfica de aumento de peso, a lo largo del experimento, de cada uno de los grupos. Las hembras tratadas en fase muscular con una y dos dosis de IVM fueron las que presentaron un mayor aumento de peso, hasta 30 gr más que en los diferentes grupos tratados.

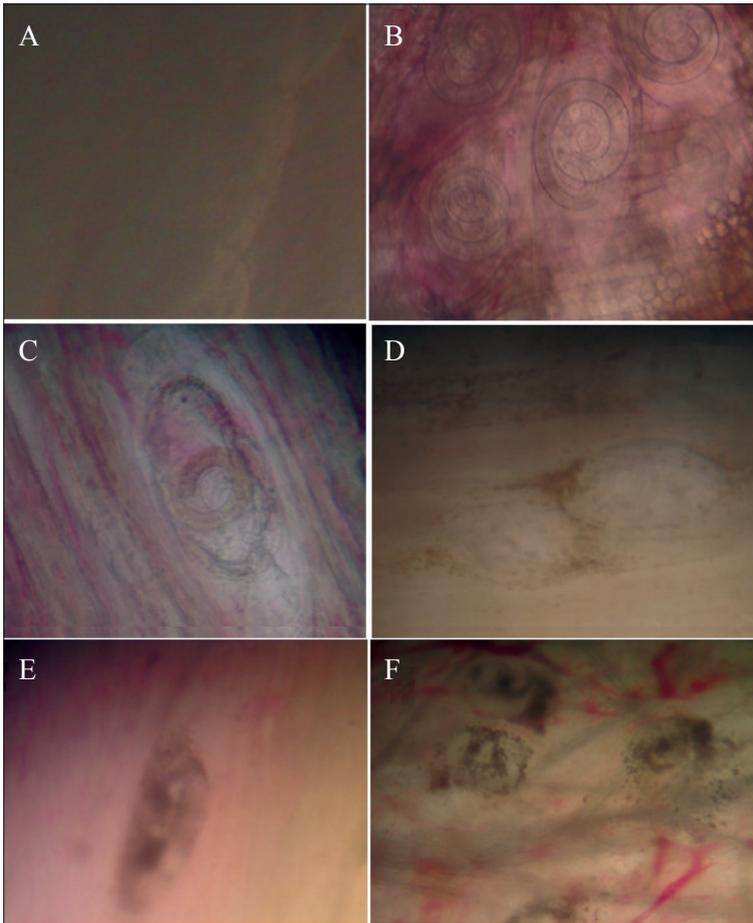


**Figura. 2.** LI de *Trichinella spiralis* obtenidas por medio de la técnica de digestión artificial, (100x). (A) control infectado fase digestiva, (B) control infectado fase muscular, (C) tratado con 1 dosis de IVM en fase muscular, (D) tratado con 2 dosis IVM en fase muscular, (E) tratado con 7,5 mg de ABZ en fase muscular, (F) tratado con 15 mg de ABZ en fase muscular. Se puede observar como las larvas obtenidas por medio de la técnica de digestión artificial, tienen una apariencia desenrollada, afectada y fragmentada.

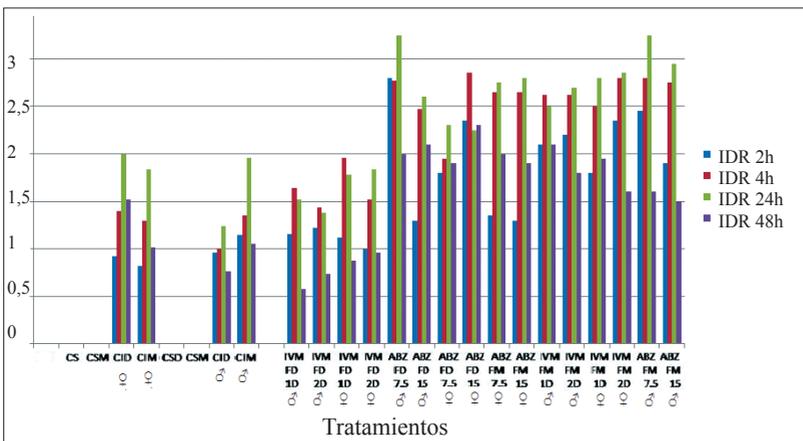
IVM en fase muscular se muestra un mayor aumento de peso y en los machos en fase digestiva. La compresión de tejido muestra en control infectado una LI en su forma típica en espiral, y su colágena bien definida, mientras que en todos los tratamientos se presenta una afección de la LI, que va desde la pérdida de su forma típica con alargamiento (una y dos dosis IVM-FD), puntillero negruzco en la colágena (7,5 y 15 mg de ABZ-FD), hasta una posible necrosis del parásito (15 mg ABZ-FM). En la digestión artificial, en el control infectado se observa la LI en su estado característico, mientras que en los tratados con IVM, hay desintegración del interior de la LI y en tratados con ABZ fragmentación de la misma. En cuando las técnicas de MIID que presentan una interacción Ag-Ac en cada una de las muestras tanto CI, como con los diferentes tratamientos, así como en la IET, la cual presenta cada una el triplete característico: 42, 45 y 48 kDa, más marcado en CI.

Actualmente en Zacatecas en el laboratorio de

Biología Celular y Microbiología de la Unidad Académica de Biología Experimental de la UAZ, se han analizado sueros procedentes del sector salud, donde se han encontrado aproximadamente un 20% de positivos, estos examinados por medio de MIID e inmunoelectrotransferencia. Los murinos utilizados en nuestro estudio presentaron diarrea en las fase intestinal, tal como lo menciona Contreras *et al.*, (2001), las manifestaciones clínicas de la trichinellosis son sumamente variables, dependiendo de la carga parasitaria, sensibilidad del individuo, estado inmunitario, nutricional y hormonal; por ello, al utilizar una misma carga parasitaria para observar las diferencias entre nuestros controles infectados, así como los tratados, observamos como las hembras presentaron una mayor respuesta inmunitaria, encontrándose también en las hembras tratadas una mejor respuesta en los tratamientos con cada uno de los fármacos, tanto en fase digestiva como en la muscular, por medio de la técnica de compresión de tejido, así como en la digestión



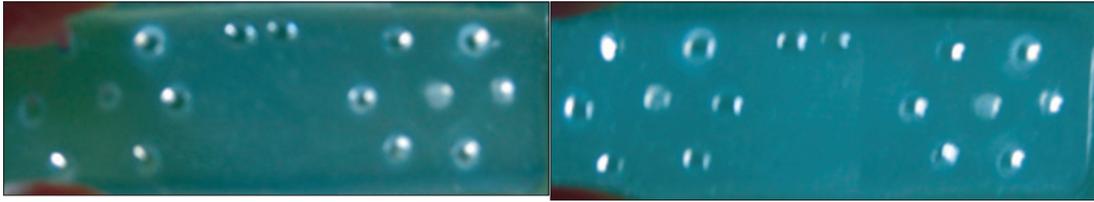
**Figura 3.** LI en músculo por medio de la técnica de compresión de tejido en machos en fase digestiva y control sano e infectado (100x). (A) control sano, (B) control infectado de músculo masetero, (C) tratado con 1 dosis de IVM, (D) tratado con 2 dosis IVM, (E) tratado con 7,5 mg de ABZ, (F) tratado con 15 mg de ABZ. Por medio de la técnica de compresión de tejido se puede observar como en las muestras infectadas y tratadas presentan alteración, desintegración de la larva, así como un puntilleo negruzco.



**Figura 4.** Gráfica de induración en la aplicación del antígeno, presentado en cada uno de los grupos a las 2, 4, 24 y 48 h. Se presentó un mayor edema a las 24 h de la aplicación del antígeno en los controles infectados.

artificial, hubo mayor afección en hembras en comparación con murinos machos. La mayoría de los expertos recomiendan el uso combinado de anti-helmínticos y glucocorticoides (Dupouy y Murrell,

2007). En nuestro estudio pudimos observar que las ratas infectadas y tratadas con los diferentes tratamientos utilizados a base de 7,5 y 15 mg/kg y una y dos dosis de 200 µg/kg de IVM en las diferentes



**Figura 5.** MIID realizada a control sano (1) y control infectado (2) en fase digestiva y (3) en fase muscular y **Figura 6.** MIID realizada en murinos infectados con *T. spiralis* y tratadas con 1(1) y 2 (2) dosis de IVM en fase digestiva. Por medio de esta técnica inmunológica pudimos observar la interacción antígeno-anticuerpo tanto en controles infectados, como en los infectados y tratados a diferentes dosis.



**Figura 7.** Resultados obtenidos por la técnica de inmunoelectrotransferencia: CI (control infectado), CS (control sano), 1 (tratados con 7,5 mg de ABZ en fase digestiva (FD)), 2 (tratados con 25 mg de ABZ en FD), 3 (tratados con 1 dosis de IVM en FD), 4 (tratados con 2 dosis de IVM en FD), 5 (tratados con 7,5 mg de ABZ en fase muscular (FM)), 6 (tratados con 15 mg de ABZ en FM), 7 (tratados con 1 dosis de IVM en FM), 8 (tratados con 2 dosis de IVM en FM). Se puede observar el triplete característico de *T. spiralis* 42, 45 y 48 kDa en los diferentes grupos.

fases la serología fue positiva en cada una de ellas, así como por el método de compresión de tejido todas mostraron el parásito, pero con aspecto ne-gruzco tanto en la célula nodriza como en la larva, por la técnica de digestión artificial se observó la LI fragmentada y algunas con el contenido interno de la LI desintegrada.

Las intradermorreacciones tienen gran importancia diagnóstica y pronóstica, por lo que es de suma importancia que se lleven a cabo en el diagnóstico diferencial de enfermedades; Martínez (1998) menciona que una de las técnicas diagnósticas de la trichinellosis es la IDR y menciona que se distinguen dos reacciones: una precoz (a los 30 minutos), esta se hace positiva entre los diez y treinta días de la infección y una tardía (que se presenta a las 24 h), reconociendo de mayor diagnóstico la reacción precoz positiva; en contraste con los analizados en el presente estudio, donde se evaluaron cuatro diferentes momentos, siendo a las 2, 4, 24 y 48 hrs, observamos que tanto en la fase intestinal como en la muscular la reacción predominante en los sueros positivos al parásito, fue a las 24 hrs, sin

importar el estado clínico, ni la fase en la que se encontraba el hospedero. Mientras que Rodríguez *et al.*, (2008), mencionan que la lectura debe realizarse a las 48 hrs, cuando la reacción inmunitaria es menos marcada que a las 24 h. Nuestro diseño estadístico nos muestra que los resultados encontrados en la técnica de IDR realizada a nuestros 120 murinos, es estadísticamente significativa, por medio del análisis ANOVA presenta un  $p < 0,05$ .

En el presente trabajo por medio de la técnica de IET realizada tanto al grupo control infectado como a los tratados con las diferentes dosis de ABZ e IVM en fase digestiva y fase muscular, presentaron el triplete característico del parásito que oscila entre 42, 45 y 48 kDa (Pozio y Murrell, 2006).

## REFERENCIA

1. BERUMEN V, MUÑOZ J, MORENO M. 2002. Trichinellosis en perros callejeros de la Ciudad de Zacatecas, México. *Parasitol latinoamericana* (57): 72-74.

2. CHÁVEZ I, REVELES G, SALDIVAR S, MUÑOZ J, MORALES M, MORENO M. 2006. Evaluation of 3 antiparasites on Intestinal and Muscular phase infection of *Trichinella spiralis* in the pig model. Red Vet. (VII). No. 06. México. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060606.htm>
3. CONTRERAS CM, SANDOVAL L, SALINAS P, SAAVEDRA TIRZA, SCHENONE H. 2001. Inmuno-diagnóstico de la Triquinosis humana. Bol Chile Parasitol. (57): 3-4.
4. DUPOUY CJ, MURRELL K. D. 2007. Guidelines for the surveillance, management, prevention and control of Trichinellosis. FAO/WHO/OIE
5. MARTÍNEZ R. 1998. Revisión Bibliográfica: Situación de la Triquinosis en Chile. Departamento de Epidemiología. Ministerio de Salud. <http://www.chilemed-cl/xxi/articulos/feb99/>
6. MEDINA L, RAMÍREZ A., PÉREZ T., PACHECO G., RUVALCABA G., GONZÁLEZ A., DE LA ROSA A. Y KUHNE M. 2007. Viabilidad de *Trichinella spiralis* con carne de cerdo expuesta a diferentes condiciones experimentales de conservación. IX Congreso de Ciencia de los Alimentos y V foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos.
7. MORENO A, ÁVALOS E, MUÑOZ J, HERRERA R, 1997. Detección de Antígenos Inmunodominantes de *Trichinella spiralis* en conejo como modelo experimental, Investigación Científica 9 (1): 5-8.
8. MORENO A, MALDONADO C, REVELES G, GUTIÉRREZ J, MUÑOZ J, 2008, Detección y Permanencia de Anticuerpos anti-*trichinella* en ratas Long Evans productos de madres infectadas con *Trichinella spiralis*, RECVET, (III): 10.
9. POZIO E, MURRELL K. 2006. Systematics and Epidemiology of *Trichinella*. Adv Parasitol. (63): 367-439.
10. RODRÍGUEZ M, LIZÁRRAGA C, JURADO F. 2008. Intradermorreacciones en dermatología. Dermatol Rev. Mex. pp: 160-174.