

Modificación de la célula nodriza de *Trichinella spiralis* en ratas Long Evans inmunizadas con antígeno soluble total de *Trichinella spiralis* y sacrificadas en diferentes tiempos

LAREDO S. V. T.¹, MARTÍNEZ M. P. L.¹, REVELES R. G.², MUÑOZ J. J. E.² y MORENO M. A.²

¹ Unidad Académica de Ciencias Químicas.

² Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas. México. Cuerpo Académico de Biología Celular y Microbiología.

ABSTRACT

MODIFICATION OF NURSE CELL FROM *TRICHINELLA SPIRALIS* IN LONG EVANS RATS IMMUNIZED WITH SOLUBLE TOTAL ANTIGEN OF *TRICHINELLA SPIRALIS* AND SACRIFICED AT DIFFERENT TIMES

The purpose of this study was to evaluate the changes in the *T. spiralis*' nurse cell in Long Evans rats immunized with Total Soluble Antigen *T. spiralis* sacrificed at different times. We worked with 25 male rats of two and a half months old, immunizing 20 of them. Then, the 25 rats were challenged with meat infected with *T. spiralis*, making the sacrifice of five rats each month, plus a rat control during 4 months to slaughter it; the techniques are carried out directly: on-board compression, artificial digestion and Hematoxylin-Eosin; indirect techniques of MIDD and Western Blot were applied for the serums. The result: a reduction in worm load. The maximum effects of protection were observed in the ultimate sacrifice after spending four months. The most obvious change to the nurse cell was a modification of the cyst and parasite's spiral loss. Changes in the nurse cell of *T. spiralis* in Long Evans rats' tissues immunized with AST and sacrificed at different times were evident with direct techniques of C/P, D/A and staining of H/E, we observed that the encystment was lost and the spiral was no longer viable, being statistically significant ($P \leq$ than 0.01).

Key words: *Trichinella spiralis*, nurse cell, changes, TSA, different times.

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue evaluar las modificaciones de la célula nodriza de *T. spiralis* en ratas Long Evans inmunizadas con Antígeno Soluble Total de *T. spiralis* y sacrificadas en diferentes tiempos. Se trabajó con 25 ratas macho de 2 meses y medio de edad, inmunizando 20. Posteriormente las 25 ratas

Recibido: 10 de Abril de 2012. Aceptado 10 de Diciembre de 2012.

Correspondencia: amoreno_29@hotmail.com

fany_fresnillo@hotmail.com; pilly911@hotmail.com

fueron retadas con carne infectada de *T. spiralis*, realizando el sacrificio de 5 ratas cada mes, más una rata control por 4 meses, al sacrificarlas se les realizó técnicas directas de compresión en placa, digestión artificial y la técnica de Hematoxilina-Eosina; a los sueros se les realizó técnicas indirectas de MIDD y Western Blot. Se obtuvo una disminución en la carga parasitaria. El efecto máximo de protección se observó en el último sacrificio después de haber transcurrido 4 meses. La modificación más evidente a la célula nodriza fue la modificación del quiste y pérdida del espiral del parásito. Las modificaciones en la célula nodriza de *T. spiralis* en tejidos de rata Long Evans inmunizadas con AST y sacrificadas en diferentes tiempos fue evidente con las técnicas directas de C/P, D/A y la tinción de H/E, se observa cómo se pierde el enquistamiento y la espiral ya no es viable, siendo estadísticamente significativo con un valor de $P < 0,01$.

Palabras clave: *T. spiralis*, célula nodriza, modificación, AST, diferentes tiempos.

INTRODUCCIÓN

La trichinellosis constituye una enfermedad zoonótica cosmopolita producida por el nematodo *Trichinella spiralis* el cual involucra en su ciclo de vida principalmente al cerdo, la rata y al hombre. Sin embargo, puede afectar a todos los animales carnívoros ya que su transmisión se produce a través de la ingesta de carne cruda o semi cruda de animales portadores de larvas (L1) del parásito en sus musculaturas.

En nuestro medio, los mecanismos más importantes para mantener la trichinellosis son, sin duda, los ciclos rata-cerdo y cerdo-cerdo, dada la crianza doméstica improvisada de cerdos, sin ninguna guía de zootecnia o sanitaria, con alimentación de desechos de comida, además de lo que en su libre deambular encuentre.

Su ciclo biológico contempla dos fases: una **entérica** en donde las LI son liberadas en el estómago de los carnívoros debido a la acción de los jugos gástricos y luego migran al epitelio columnar e intestino delgado en donde rápidamente se diferencian sexualmente y realizan la cópula, los machos mueren y las hembras penetran en la mucosa intestinal y liberando larvas recién nacidas (LRN) las que por vía linfática inician y cumplen la fase **parenteral**. En esta fase las LRN llegan a los músculos principalmente diafragma lengua, laringe, intercostales, bíceps y pectorales. La LRN aumenta su tamaño, empieza a enrollarse e induce la formación de un quiste, puede permanecer estable durante toda la vida del hospedero o

calcificarse. El ciclo se inicia nuevamente cuando estas larvas musculares son ingeridas (LI) por un nuevo huésped carnívoro, incluyendo el hombre. (Cabral *et al.*, 1990).

La prevalencia de la trichinellosis es mayor en las naciones en vías de desarrollo, donde las condiciones socio económicas y de insalubridad ambiental favorecen su transmisión, como sucede en el área de América Latina (Cabral *et al.*, 1990; Despommier, 1997). En México se han presentado numerosos brotes epidémicos de esta zoonosis, tanto en la capital de la República Mexicana como en diferentes estados y porque no se diagnostica con frecuencia en los humanos (Cabral *et al.*, 1990; Lanzas *et al.*, 1995).

Todos los parásitos, incluyendo la *T. spiralis*, escapan a la inmunidad protectora mediante la reducción de su inmunogenicidad o la inhibición de las respuestas inmunitarias de los huéspedes. Los parásitos cambian sus antígenos de superficie durante sus ciclos vitales de dos formas. La primera es el cambio de la expresión antigénica según su estadio (adultos o larvas). El segundo ejemplo es la continua variación de los principales antígenos de superficie de los *Trypanosomas* africanos. Una consecuencia de la variación antigénica en los parásitos es que resulta difícil vacunar a individuos de forma eficaz contra estas infecciones (Abbas, 2002; Lanzas *et al.*, 1995).

El objetivo de este trabajo será detectar los cambios de la célula nodriza de *T. spiralis* en ratas Long Evans inmunizadas con Antígeno Soluble Total del parásito y sacrificadas en diferentes tiempos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material y métodos

Modelo experimental 25 ratas Long Evans machos de 2 meses y medio de edad, formando 5 grupos (A,B,C,D,E) con 5 ratas cada uno:

- Grupo A. 5 ratas las cuales fueron inmunizadas cada semana por 4 ocasiones, a la quinta semana se infectaron con 500 LI de *T. spiralis* vía oral. Dejando un mes la infección para continuar con el sacrificio al término del tiempo establecido.
- Grupo B. 5 ratas las cuales fueron inmunizadas cada semana por 4 ocasiones, a la quinta semana se infectaron con 500 LI de *T. spiralis* vía oral, se dejó por dos meses la infección y luego se efectuó el sacrificio al término del tiempo establecido.
- Grupo C. 5 ratas las cuales se inmunizaron cada semana por 4 ocasiones, a la quinta semana se infectaron con 500 LI de *T. spiralis* vía oral, se dejó por tres meses la infección y posteriormente se sacrificaron.
- Grupo D. 5 ratas mismas que fueron inmunizadas cada semana por 4 ocasiones, a la quinta semana se infectaron con 500 LI de *T. spiralis* vía oral. Dejando cuatro meses la infección para continuar con el sacrificio al término del tiempo establecido.
- El grupo E. (Control) formado por 5 ratas sin inmunizar, a la quinta semana del experimento se infectaron con 500 LI de *T. spiralis* vía oral. Sacrificando una rata por cada grupo experimental cada mes.
- Los animales fueron sangrados vía ocular en la pre-inmunización y post-inmunización para obtener suero, luego se realizó técnicas indirectas (MIDD, IET).
- Se sacrificaron cada grupo de trabajo con una sobredosis de anestésico volátil (Halotano). Por disección se obtuvo músculo esquelético (macetero, lengua, pierna, diafragma) para realizar técnicas directas (C/P, D/A, cortes histológicos, conteo de carga parasitaria).

Las vías de inmunización en las ratas se presentan en la Tabla 1. En cada inmunización se aplicaron 10 µl de AST de *T. spiralis*.

Tabla 1. Vías de inmunización

Etapa de inmunización	Vía de inmunización
1 era.	Intradérmica
2 da.	Subcutánea
3 era.	Intramuscular
4 ta.	Intraperitoneal

METODOLOGÍA

A) Técnicas directas

Compresión en placa: Presionando entre dos laminillas de vidrio, verificando la presencia de *T. spiralis*, en objetivo de (10X) (Del Río *et al.*, 1986). Al sacrificar a los animales se obtiene tejido muscular 0,5 gr (pierna, lengua, diafragma, macetero) por triplicado. Observándolo al microscopio.

Digestión artificial: El proceso se llevó a cabo a 37° C por 24 horas según el método descrito por Del Río *et al.*, en 1986, donde se colocan aproximadamente 30 g de tejido infectado triturado, en un tamiz de tul, en forma de saco; suspendido en una solución de 3,5 ml de HCl, 1,75 gramos de pepsina y 500 ml de agua destilada en un embudo de separación; transcurridas las 24 horas se procedió a separar las LI que se depositaron en el fondo del embudo de separación y se recolectaron en un tubo cónico (Del Río *et al.*, 1986).

Técnica de cortes histológicos: Los tejidos musculares se conservaron en formol al 10% hasta el momento de ser sometidas al proceso de inclusión en parafina. La metodología de la técnica se llevó a cabo de acuerdo a lo propuesto por las Fuerzas Armadas de USA. (*Manual of Histologic 1957 a,b*).

Elaboración del Antígeno Soluble Total de *T. spiralis*: Las LI de *T. spiralis* se colocaron en un mortero con un inhibidor de proteasas (PMSF) 20 µl/ml; y continuando con la extracción por nitrógeno líquido para romper la estructura del parásito, y permitir extraer su contenido antigénico. Se centrifugó por 1 hora a 4° C a 10.000 rpm. Continuando con la separación de la parte soluble la que nos interesa, a la cual se le realizó la determinación de proteínas para saber la concentración del antígeno soluble total de *T. spiralis*. (Bradford, 1976).

B) Técnicas indirectas

Microimmunodifusión doble (MIDD): Prueba conocida como de Ouchterlony, (Ouchterlony O. 1958), se disolvió agar al 1% (0,9 mg de agar) en 100 ml de solución de fosfatos (PBS) y azida de sodio al 1% (como conservador) dejándose hidratar por 5 min continuando con un calentamiento hasta su ebullición.

Se dejó enfriar entre 55 - 65° C, luego el agar se depositó en portaobjetos con una cantidad de aproximadamente de 4,5 ml dejándolo gelificar por 30 min a temperatura ambiente. Se guardaron los portaobjetos a 4° C en cámara húmeda durante 18 hrs.

Se hicieron pozos en forma de flor, con 6 pozos periféricos y uno central, se colocaran 10 µl de la muestra antigénica en el pozo central y en los periféricos el suero de cada rata del estudio, así como controles positivos y negativos (Ouchterlony 1958).

Dejando difundir por 24 hrs a temperatura ambiente en una cámara húmeda, para observar los resultados de la interacción antígeno-anticuerpo que presenten los sueros de cada rata.

Inmunoelctrotransferencia (IET): Los geles que contienen la separación del antígeno soluble total de *T. spiralis* por PAGE, no teñidos se transfirieron a un papel de nitrocelulosa de acuerdo al método descrito por Towbin, se utilizó una cámara de Transblot-cell (Bio-Rad®) a 29 volts, durante toda la noche a 4° C. Se detectaron las bandas específicas de la interacción antígeno-anticuerpo por medio del relevado con 3,3 diamino-benzidina (DAB), 50 mg en 100 ml de PBS, agregándole 20 µl de peróxido de hidrogeno al 30% a 4°C (Laemmil *et al.*, 1990; Towbin *et al.*, 1979).

RESULTADOS

Los resultados se presentan en las Figuras 1- 6.

Se obtuvo una disminución en la carga parasitaria. El efecto máximo de protección se observó en el último sacrificio después de haber transcurrido 4 meses. La modificación más evidente a la célula nodriza fue la modificación del quiste y pérdida del espiral del parásito.

Las modificaciones en la célula nodriza de *T. spiralis* en tejidos de rata Long Evans inmunizadas

con AST y sacrificadas en diferentes tiempos fue evidente con las técnicas directas de C/P, D/A y la tinción de H/E, se observa cómo se pierde el enquistamiento y la espiral ya no es viable, siendo estadísticamente significativo con un valor de $P < 0,01$.

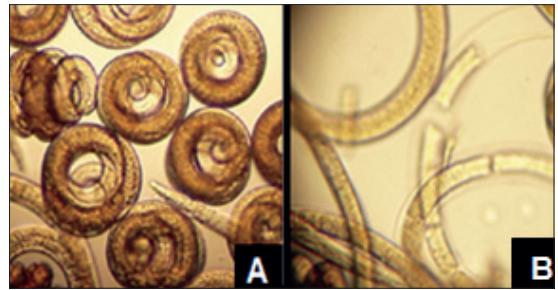
LI de *T. spiralis* obtenidas por la técnica de D/A

Figura 1. A) Se observa al microscopio óptico de luz con 40X LI de *T. spiralis* después de digestión con pepsina ejemplares del grupo control del modelo experimental con un promedio de 15 LI por campo en espiral. **B)** LI del cuarto sacrificio, no se observa el espiral y están fraccionadas por lo que ya no son viables.

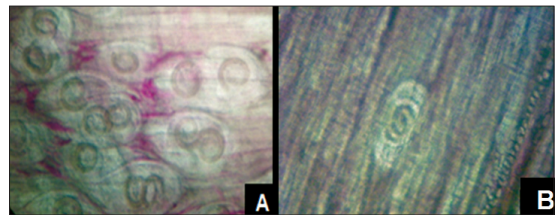
Técnica directa cortes histológicos compresión en placa

Figura 2. Se observa LI dentro de la célula nodriza al microscopio óptico de luz 10X **A)** Tejido de pierna del grupo control en el cual se observa un promedio de 15 LI de *T. spiralis* por campo, **B)** Tejido de diafragma del cuarto sacrificio se observa cutícula externa casi pérdida, CN paralela a las fibras musculares, pérdida definitiva de los polos o par de lóbulos, presencia de masas de células adiposas, una CN por campo, en los polos hay precipitados finos granulares por toda la cápsula.

Técnica directa cortes histológicos Hematoxilina-Eosina modificación de célula nodriza

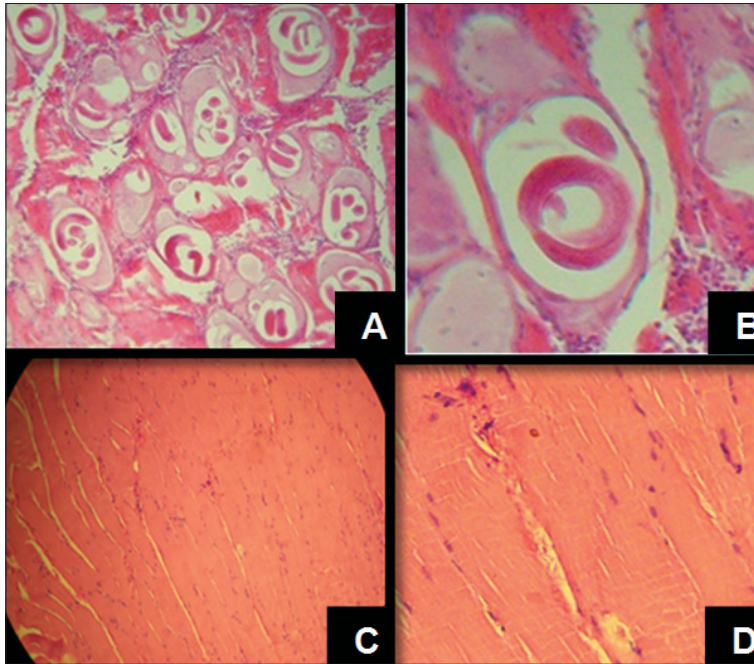


Figura 3. Se observa al microscopio óptico de luz cortes histológicos con técnica H/E, **A)** 10X y **B)** 40x tejido de macetero, grupo control infectado con *T. spiralis* y sin ningún tratamiento se observa presencia de células polimorfonucleares, presencia la LI de *T. spiralis* enquistada y enroscada con cutícula externa en forma alargada, con su polos extremos oscuros, **C)** 10X y **D)** 40X tejido de pierna del cuarto sacrificio, no se observan CN enquistado en tejido muscular.

Técnica indirecta MIDD

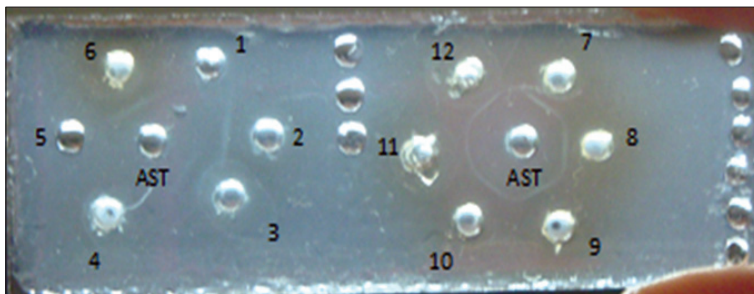


Figura 4 Se observa la interacción Ag-Ac contra *T. spiralis*. Pozo del No. 1 al 4 y 7 al 10 suero de animales inmunizados e infectados, pozo No. 5 y 11 negativos, pozo No. 6 y 12 positivos.

Técnica indirecta WB



Figura 5. Se aprecia el complejo inmune Ag-Ac de *T. spiralis*. Carril (1 a 6) suero de animales pre-inmunizados, en el carril 1 al 6 no se detecta bandeo, carril (7 a 8) suero de animales inmunizados e infectados, se detecta el complejo inmune Ag-Ac, carril 9 suero positivo, carril 10 suero negativo, carril (11 a 18) suero de animales inmunizados e infectados y se aprecia el complejo inmune Ag-Ac, se observa el predominio de una banda de 45 kDa.

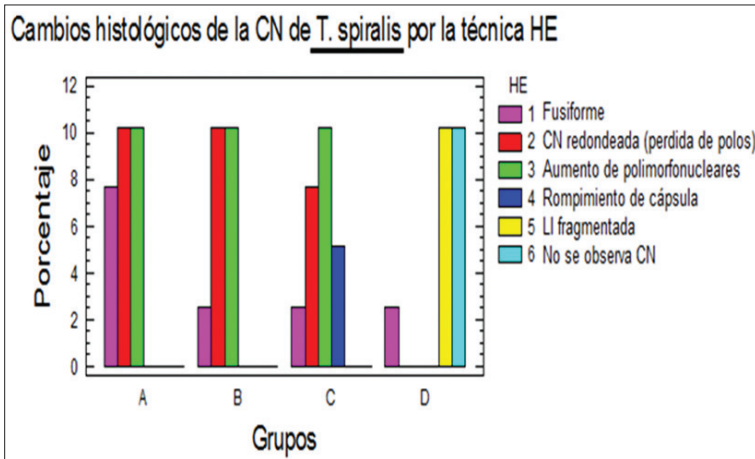


Figura 6. Representación en porcentaje de los cambios morfológicos observados mediante la técnica de H/E y la frecuencia en la que estos aparecen. Los porcentajes sobresalientes en los grupos A, B y C son del 10% indican presencia de polimorfonucleares y en el grupo D el 10% indica fragmentación de la LI y desapareciendo la CN.

DISCUSIÓN

La trichinellosis constituye en la época actual uno de los problemas graves que afectan la salud humana y de las 32 especies de nematodos que parasitan al hombre se ha señalado a *T. spiralis* como la más peligrosa (Cabral *et al.*, 1990), con mayor complejidad antigénica por consecuencia en la especie humana la infección por trichinellosis presenta manifestaciones clínicas y la diversidad de signos y síntomas hacen difícil el diagnóstico clínico (Cabral *et al.*, 1990) que puede pasar como asintomáticas y la patología de *T. spiralis* depende de varios factores, pero está estrechamente relacionada con la carga parasitaria; edad y la inmunidad adquirida los casos graves siempre se deben a infecciones intensas, pues por un lado son consecuencia de la agresión directa del parásito durante su migración y por otro, de la reacción inflamatoria desencadenada; esta última puede causar complicaciones cardíacas (miocarditis, insuficiencia cardíaca o arritmias), neurológicas, (encefalitis, meningitis, convulsiones, alteraciones visuales o auditivas) o pulmonares (neumonitis, pleuresía). Los casos mortales suelen ser consecuencia de miocarditis (Chomel *et al.*, 1993; Pozio y La Rosa, 1990).

Nuestros resultados demostraron que se tuvo un efecto de protección total con el AST y posterior a la infección con *T. spiralis* hubo una disminución de LI, esto fue evidente en el transcurso del experimento utilizando métodos de diagnóstico directos e indirectos.

El estímulo antigénico que es determinado por

las fases del parásito, se produce una inmunidad general (Cabral *et al.*, 1990), formando anticuerpos contra los antígenos esto hace que inhiba el desarrollo normal del parásito.

Las modificaciones en la célula nodriza de *T. spiralis* en tejidos de rata Long Evans inmunizadas con AST y sacrificadas en diferentes tiempos fue evidente con las técnicas directas de C/P, D/A y la tinción de H/E, se observa cómo la *T. spiralis* pierde su enquistamiento, su espiral y se encuentra fragmentada por lo que ya no es viable, obteniendo resultados que son estadísticamente significativos con un valor de $P < 0,01$.

En el presente estudio se demostró en la trichinellosis experimental como en la infección natural existe un estado de inmunidad y resistencia adquirida. La inmunidad total y el estado de resistencia de un hospedero se deben en parte a los estímulos antigénicos.

REFERENCIAS

1. ABBAS AK. 2002. Inmunología Celular y Molecular 4ta. Edición, Editorial McGraw - Hill Interamericana, pág. 367-370.
2. BRADFORD HA. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of proteindyebinding. Annual. Biochem. 72: 248-254.
3. CABRAL J, VILLICAÑA H, FRAGOZO R, CONTRERAS A. 1990. Perfil epidemiológico de la triquinosis en el estado de Zacatecas. Salud Pública Méx; No. 32, pág. 575-582.

4. CHÁVEZ GE, SALDIVAR ES, MUÑOZ EJ, MORENO G A. 2006. Trichinellosis una zoonosis vigente. REDVET, Vol. VII, No. 05, pág. 1-12.
5. CHOMEL BB, KASTEN R, ADAMS C, LAMBILLOTTE D, THEIS J, GOLSMITH R, KOSS J, CHIOINO C, WIDJANA DP, SITISNA P. 1993. Serosurvey of some major zoonotic infections in children and teenagers in Bali, Indonesia. Southeast Asian J Trop Med Public Health No. 24 pág. 321-326.
6. DEL RÍO A, HERRERA DRM, HERRERA R. 1986. Triquinosis experimental I: extracción del antígeno y procedimiento para detectar anticuerpos. Arch. Invest. Med. 17: 359-367.
7. DESPOMMIER DD. 1977. Immunity to *Trichinella spiralis*. Am J Trop Med Hyg No 26: 68.
8. FLISSER A, PÉREZ TR. 2006. Aprendizaje de la parasitología basado en problemas, Triquinellosis Capítulo 50, Editorial ETM, pág. 560-570.
9. LAEMMIL UK, CHERG SH, ADOLPH K, PAULSON JR, BROWN J, BAUMBACH WR. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. 227: 680-685.
10. LANZAS GT, GALARZA MI, SÁNCHEZ J, QUILEZ Y, MARTÍNEZ AVS. 1995. Report: an outbreak of trichinosis in Navarra, Spain. Am J Trop Med Hyg 53: 241-242.
11. MANUAL OF HISTOLOGIC AND SPECIAL STAINING TECHNIC. 1957a. Armed Forces, Institute of Pathology. Washington, D.C. Chapter 2, pp. 7-16.
12. MANUAL OF HISTOLOGIC AND SPECIAL STAINING TECHNIC. 1957b. Armed Forces, Institute of Pathology. Washington, D.C. Chapter 4, pp. 29-38.
13. OUCHTERLONY O. 1958. Diffusion in gel methods for immunological analysis. In: progress allergy. Vol. V Editor: Kallos, P., Basel and New P., Basel.
14. POZIO EG, LA ROSA KD, MURRELL AND LICHTENFELS. 1992. Taxonomic Revision of the genus *Trichinella*. J. Parasitol. 78 (4): 654-659.
15. TOWBIN HT, STANLIN T, GORDON. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets, procedure an some application. Proct Nathl Acadp Sci USA 76: 4350.