
FASE INTESTINAL DE *Trichinella spiralis* EN MODELO MURINO

Intestinal *Trichinella spiralis* Phase In Murine Model

MARÍA ALEJANDRA MORENO GARCÍA¹, Ph. D.; CLAUDIA H. MALDONADO TAPIA¹, Ph. D.; ELDA ARACELI GARCÍA MAYORGA¹, M.Sc.; ROSA GABRIELA REVELES HERNÁNDEZ¹, M.Sc.; JOSÉ JESÚS MUÑOZ ESCOBEDO², M.Sc.

¹Unidad Académica de Biología Experimental.

²Instituto de Investigaciones Odontológicas.

Universidad Autónoma de Zacatecas. Apartado Postal 12.
98600 Guadalupe, Zac. México.

Presentado 11 de diciembre de 2007, aceptado 23 de febrero de 2008, correcciones 20 de octubre de 2008

RESUMEN

Trichinella spiralis se encuentra principalmente en el hombre, rata, cerdo, perro; puede infectar a cualquier carnívoro u omnívoro. Cuando la carne o sus derivados están contaminados con larvas infectantes (LI) de *T. spiralis* y son ingeridas éstas pasan al estómago, donde sus cápsulas son disueltas por acción de los jugos gástricos, las larvas son liberadas en pocas horas, después pasan a la porción proximal del intestino delgado, donde se lleva a cabo su desarrollo. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la fase intestinal de *T. spiralis* en un modelo murino. Un lote de 45 ratas Long Evans, se infectaron con aproximadamente 500 LI, y fueron sacrificadas tres diarias por 15 días. Se tomó un segmento de duodeno, yeyuno e íleon y se fijaron en formol al 10% para posteriormente ser procesados en parafina y teñido con hematoxilina-eosina. El resto del intestino delgado fue fraccionado, se incubó a 37 °C por dos horas y el sobrenadante se observó al microscopio de luz. Se encontró que el implante se lleva a cabo a nivel de yeyuno e íleon, que las hembras adultas dan origen aproximadamente 60-80 larvas recién nacidas (LRN), parto vivíparo en un tercio distal y subsecuentemente son destruidas. Los machos adultos tienen espermatozoides no ciliados.

Palabras clave: larvas infectantes, adultos, larvas recién nacidas.

ABSTRACT

Trichinella spiralis is a parasitic disease in man, rat, pig, but can infect any carnivorous or omnivorous. When the meat or their derivatives are contaminated with infective larvae (il) of *T. spiralis* pass to the stomach, their capsules are dissolved by the stomach juice, the larvae are liberated in few hours, and then they pass to the near portion of the slim intestine in which they develop. The objective of the present work was to evaluate the intestine phase of *T. spiralis* in a murine model. Fortyfive Long Evans rats were infected with 500 li approximately, then 3 rats were sacrificed everyday over a

period of 15 days. A portion of duodenum, jejunum and ileum were fixed in formaldehyde 10% and subsequently embedded in paraffin and dyed with hematoxylin-eosin. The rest of the small intestine was cut and fractionated and incubated at 37 °C for 2 hours; the supernatant was observed under light microscopy. We observed that the implant of larvae was in the jejunum and ileum. The adult females gave origin to approximately 60-80 newborn larvae (LRN) and subsequently were destroyed. The adult male had non-ciliated sperm.

Key words: Infectant larvae, adult, recently born larvae.

INTRODUCCIÓN

La *Trichinellosis* en el hombre moderno no ha sido erradicada; es considerada una enfermedad cosmopolita que tiene la atención de diferentes grupos de investigadores a nivel mundial, donde cada uno realiza estudios en características particulares y encontrar respuestas que aun no han sido contestadas.

El parásito *Trichinella spiralis* es un nemátodo que fue descrito morfológicamente por Richard Owen en 1835; él localizó larvas infectantes de *T. spiralis* en el músculo estriado de un cadáver humano (Owen, 1835). *T. spiralis* es el agente que provoca la trichinellosis en los mamíferos, y al infectar a un hospedero, se observa el desarrollo de sus diferentes estadios. Se pueden identificar tres estadios; estado adulto hembra y macho, larva recién nacida (LRN) y larva infectante (LI; Reveles *et al.*, 1996). En Zacatecas, México en los últimos cinco años se ha detectado en cerdo, perro y rata doméstica (Moreno *et al.*, 2007a; Berumen De La T *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2007b).

CICLO DE VIDA

T. spiralis es un parásito que desarrolla sus estadios a nivel enteral, parenteral (paso por vía sanguínea) y muscular. En estos lugares induce modificaciones significativas de tipo bioquímico y estructural.

Fase enteral. El huésped que consume carne contaminada que contiene LI, en el estómago son liberadas por acción de enzimas digestivas y son transportadas pasivamente por peristaltismo a las dos terceras partes del intestino delgado. El parásito que entra mide aproximadamente 1 mm de largo, el cual sufre cuatro mudas tomándole aproximadamente 30 horas para desarrollarse completamente de un estado juvenil a un estado maduro. Hay un crecimiento del macho de 1,5 mm, y la hembra de 3 mm, y como resultado *T. spiralis* está dentro de un nicho intramulticelular, así se expande en este sitio de manera lineal como consecuencia de un crecimiento longitudinal (Moreno *et al.*, 1993).

El parásito adulto vive dentro de una fila de células epiteliales del intestino delgado, este es un estado transitorio. El parásito contiene en su interior esticositos granulados que constantemente secretan antígenos en el nicho intramulticelular durante el proceso de muda. Probablemente la función secretoria en el nicho es la modificación del mismo cuando es considerado que la cantidad de energía es excedida por el parásito para su síntesis, almacenamiento y secreciones. Los machos ocupan una hilera de células adyacentes a las que ocupa la hembra; se cree que cada macho puede fecundar

a dos hembras, ya que el promedio de adultos encontrados es de dos hembras por cada macho. Después que ha ocurrido la cópula, los machos mueren y son expulsados; las hembras aumentan de tamaño penetrando más profundamente en la mucosa intestinal, llegando incluso al peritoneo y a los ganglios linfáticos mesentéricos. La embriogénesis dura alrededor de 90 horas, ya que las LRN son liberadas hasta el quinto día post-infección. La LRN es solo un estado no-intracelular y existe como un organismo que nada libremente dentro del lumen de los vasos sanguíneos y linfáticos. Las LRN miden 0,08 mm, de longitud (Reveles *et al.*, 1996; Moreno *et al.*, 1993; Canong *et al.*, 1974).

Fase parenteral. Las LRN migran dentro de la lámina propia y viajan a través del mesenterio linfático; otro sitio de migración es a través de la cavidad peritoneal, ducto torácico linfático y el torrente circulatorio. Todas las larvas eventualmente entran a la circulación general vía porta y son distribuidas por todo el cuerpo. Se piensa que estas LRN poseen un estilete en la parte anterior del esófago con el cuál puede penetrar a las células musculares ya que el sitio de penetración muestra rasgos de desorganización como si se tratara de un proceso mecánico. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que la penetración de las larvas de *T. spiralis* se lleve a cabo por medio de procesos enzimáticos (Reveles *et al.*, 1996; Moreno *et al.*, 1993).

Fase muscular. En las células musculares las LRN inician un período de desarrollo post-embriionario creciendo exponencialmente y desarrollándose sin mudas; la máxima diferenciación se alcanza entre los días 4 y 20 después de la penetración (Reveles *et al.*, 1996). En la literatura se menciona que el implante es en duodeno y en los últimos años que se lleva a cabo en yeyuno, así mismo que el parto es ovíparo, que cada hembra da origen entre 500 y 1.000 LRN en un periodo de 4-6 semanas (Vera, 2001, Merck Sharp, 2005), de ahí la importancia de definir estos detalles. Por lo tanto el objetivo del presente trabajo fue evaluar la fase intestinal de *T. spiralis* en modelo murino, así mismo determinar el número de LRN y el sitio de implante.

MATERIALES Y MÉTODOS

CONSERVACIÓN DE CEPAS

Para mantener la cepa de *T. spiralis* que fue obtenida de carne de cerdo infectada con *T. spiralis* de un brote infeccioso de Laguna del Carretero de Zacatecas, México en 1976, se infectaron ratas Long Evans y conejos Nueva Zelanda con una serie de pases para mantener la viabilidad y patogenicidad de la cepa (Moreno *et al.*, 1996).

AISLAMIENTO DE LARVAS

Las LI viables se obtuvieron de músculo de ratas Long Evans infectadas con *T. spiralis* de seis semanas de infección, las cuales fueron sacrificadas; se obtuvo el tejido muscular que fue molido. Se pesaron 60 g y se colocaron en un costal de tela de tul que fue introducido en un embudo de separación para ser sometida a una digestión artificial, la cual se preparó con 1L de agua potable con pepsina de 10,000 U al 0,3% de HCl 0,2N (pepsina 3,5g + 7mL de HCl), por incubación de 24 horas a 37 °C posterior a esto se recolectó el paquete larvario, el cual se mantuvo en PBS (Ching-Huan-Wang, 1997).

MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron 45 ratas de raza Long Evans con una edad promedio de dos meses y medio, de un peso aproximado de 300 g, fueron infectadas con 500 (LI) vía oral y se sacrificaron tres diarias por 15 días, se tomaron segmentos de duodeno, yeyuno e íleon y se fijaron en formol al 10%. Se deshidrataron los tejidos para procesarlos en parafina. Esto fue llevado a cabo en el aparato *Lipshaw Automatic Tissue Processor*, el cual contenía soluciones específicas por un tiempo establecido. El esquema de tiempo y soluciones fue: formol al 10%, por 12 horas alcohol etílico al 80% por una hora, alcohol etílico de 96 °C con tres pasos y cada paso de una hora y media, alcohol absoluto con tres pasos de una hora y media, xileno de dos pasos también de una hora y media y por último parafina a 60 °C de dos pasos de una hora y media. Se continuó con la colocación de los tejidos en bloques, en forma de cubo los cuales contenían parafina a 60 °C, luego se dejaron enfriar. Después de 24 horas estos bloques fueron colocados en una cama de hielo para lograr una mejor consistencia, al momento fueron efectuados los cortes en un Microtomo modelo 820 rotary, American Optical. Cada corte tuvo un grosor de 4 µm y fue colocado en un portaobjetos. Los portaobjetos fueron cubiertos con resina que fue preparada a base de clara de huevo y glicerol. La resina se preparó de la siguiente manera, fue medida la clara de huevo y agregando la misma cantidad de glicerol, homogeneizando lentamente (para evitar la formación de espuma) como conservador se le añadió unos granos de tibil. Esta mezcla quedó como un gel y fue aplicado de manera manual al portaobjetos.

Los cortes ya en el portaobjetos se colocaron en una placa caliente para desparafinar y se continuó con el proceso de tinción que en este caso fue con hematoxilina-eosina. El proceso se realizó como un tren de tinción, los portaobjetos estaban en una canastilla que fueron introducidas en las soluciones como se indica: xileno 5 min, xileno 5 min, alcohol etílico absoluto 3 min, alcohol etílico de 96 °C 3 min, alcohol etílico de 96 °C 3 min, agua potable y agua destilada (de manera rápida), hematoxilina de Harris (por 5 s), agua potable, alcohol ácido 1% (de manera rápida), agua potable, solución saturada de carbonato de litio 2 min, agua potable, eosina (por 5 s), agua potable, dos veces en alcohol etílico de 96 °C, tres veces en alcohol etílico absoluto, xileno (todos los pasos anteriores fueron de 1 min); en xileno se mantuvieron las laminillas mientras fueron montándose con resina sintética Sigma® y cubrió con un cubreobjetos quedando listas para su observación en el microscopio óptico (Armed Forces, 1957). El resto del intestino delgado, el cual fue fraccionado, incubado a 37 °C por dos horas (técnica de Bolas Fernández) y el sobrenadante se observó al microscopio óptico de luz a intervalos de 2 horas x 24 horas (Alcantara y Correa, 1993).

RESULTADOS

IDENTIFICACIÓN DE ADULTOS HEMBRAS Y MACHOS

La obtención de intestinos de ratas del sexto día nos dio la oportunidad de identificar a los adultos hembras y machos (Fig. 1).



Figura 1. Fotografía donde se observa hembra y macho de *T. spiralis* al microscopio de luz con el objetivo de 100X, obtenidos por la técnica de Bolas Fernández (la hembra mayor que el macho).

Así mismo se observó el apareamiento de los adultos (hembra y macho), el órgano copulatorio del macho y sus espermatozoides no ciliados (Fig. 2).

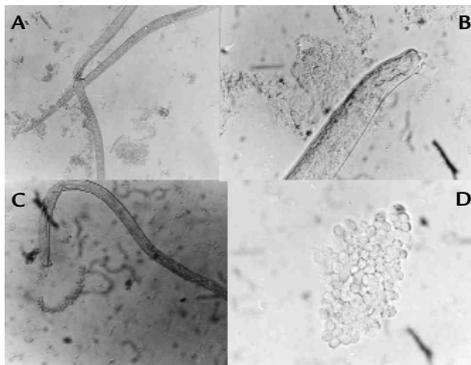


Figura 2. Fotografía de adultos obtenidos de la técnica de Bolas Fernández y observados al microscopio de luz con el objetivo de 40X. A. Apareamiento de macho y hembra de *T. spiralis*; B. Macho de *T. spiralis*; C. El macho expulsión de espermatozoides; D. Espermatozoides de *T. spiralis* no ciliados observados al microscopio de luz 100 X.

A partir de los días 5, 6 y 7 se observa que hay adultas hembras ya fecundadas y su desarrollo embrionario (Fig. 3) y restos de adultos que se interpreta son los machos.

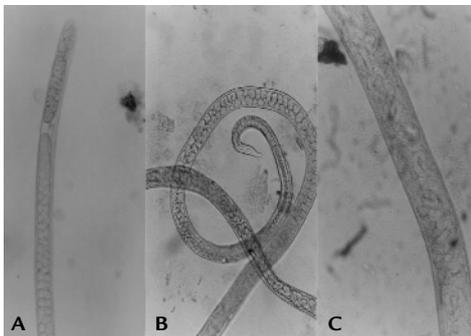


Figura 3. Fotografía de embriogenesis de *T. spiralis*, hembras adultas obtenidas de la técnica de Bolas Fernández en A. Desarrollo embrionario de *T. spiralis*; B. Proceso de diferenciación de embrión a larvas; C. Larvas en útero de *T. spiralis*.

Así como de observar el nacimiento de las LRN, por un conducto propio de las hembras, en el tercio distal, siendo el parto vivíparo (Fig. 4). El número de LRN que se observó fue un promedio 60-80 LRN por hembra. Los cortes de intestino delgado por la técnica de hematoxilina-eosina en sus porciones de duodeno, yeyuno e íleon

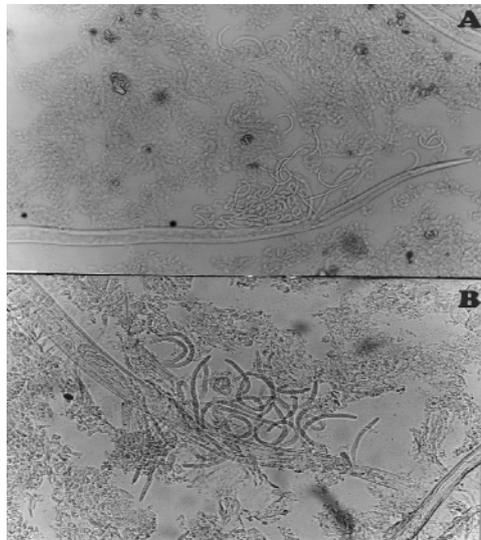


Figura 4. Fotografía de hembras de *T. spiralis* obtenidas por la técnica de Bolas Fernández observadas al microscopio de luz. A. con el objetivo de 40X parto vivíparo de *T. spiralis* el número de LRN de 60 a 80; B. Observado con el objetivo de 100 X parto vivíparo de *T. spiralis* y en el interior de la hembra todavía algunas larvas.

nos permitieron detectar la presencia de adultos tanto hembras como machos, durante los días 2, 3 y 4 en mayor cantidad en yeyuno, en número intermedio en duodeno y menor cantidad en íleon, estas larvas se introdujeron desde la mucosa hasta la adventicia (Fig. 5).

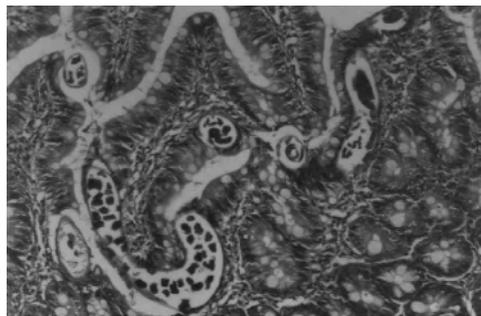


Figura 5. Fotografía donde se muestra la Técnica de hematoxilina-eosina al microscopio óptico de luz con el objetivo de 40X, corte de Intestino delgado de epitelio hacia los acines se observan algunas hembras fecundadas.

Así como de observar el nacimiento de las LRN, por un conducto propio de las hembras, en el tercio distal, siendo el parto vivíparo (Fig. 6 y Fig. 7).

DISCUSIÓN

Nuestros resultados demostraron en fase intestinal que *T. spiralis* lleva a cabo una evolución de LI a adulto y da origen a LRN, que siguen un trayecto desde la capa mucosa hasta la adventicia implantándose en yeyuno. Los resultados en fase intestinal mostraron que en el sexto día hay recuperación de adultos, que las hembras tienen un parto vivíparo en su tercio distal, dando origen a un promedio entre 60 y 80 LRN. En la literatura tradicionalmente se ha reportado que el implante de *T. spiralis* se efectúa en duodeno (Alcantara y Correa, 1993). En 1997, se mencionó que éste se lleva a cabo en yeyuno e íleon (Ching-Huan-Wang, 1997). En este estudio, se ratifica que el implante

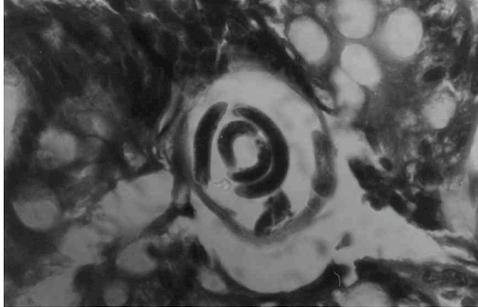


Figura 6. Fotografía donde se muestra la Técnica de hematoxilina-eosina al microscopio óptico con el objetivo de 100X, corte trasversal de una hembra adulta y en su interior el desarrollo de una larva.

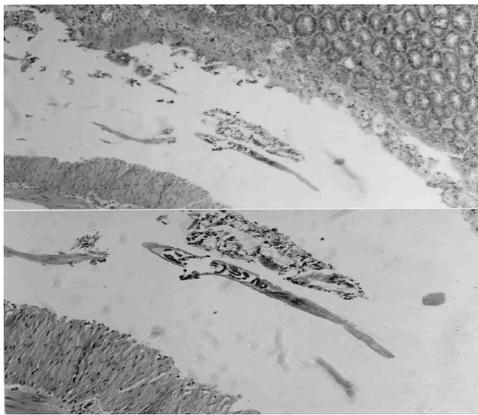


Figura 7. Fotografía donde se muestra la Técnica de hematoxilina-eosina al microscopio óptico de luz, en la parte superior parto vivíparo de *T. spiralis* observado con el objetivo de 40X, en la parte inferior con el objetivo de 100X.

de *T. spiralis* se lleva a cabo a nivel de yeyuno e ileon, que el parto es vivíparo, y además, encontramos que cada hembra adulta da origen a un promedio de 60-80 LRN. Se observaron los espermatozoides del adulto y son no ciliados. El conocer las características de la fase intestinal de *T. spiralis* nos facilita el estudio de medicamentos en modelos experimentales y nos facilita el estudio de la biología del parásito.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Zacatecas, México.

BIBLIOGRAFÍA

- ALCANTARA P, CORREA D. Triquinelosis: Una parasitosis fuera de serie. *INDRE*. 1993;1-11.
- ARMED FORCES. Institute of Pathology. Manual of Histologic and special staining technics. Washington, D.C; 1957. p. 1-36.
- BERUMEN DE LA TV, MUÑOZ EJJ, MORENO GMA. Trichinellosis en Perros callejeros de la Ciudad de Zacatecas. *México. Parasitología Latinoamericana*. 2002;57(1):72-74.
- CANONG WF. El tejido excitable, el músculo. *Manual de Fisiología Médica*. Ed. El Manual Moderno. México; 1974. p. 37-53.

CHING-HUAN-WANG. Study of Biological properties of *Trichinella spiralis* newborn larvae and the anti-parasitic mucoral immunity of the host. Bioscience org. 1997. p. 1-20.

MORENO GMA, AVALOS DE, MUÑOZ EJJ, HERRERA ER. Detección de antígenos inmunodominantes de *Trichinella spiralis* en conejo. Rev Cient. 1996;9(1):3-8.

MORENO GMA, MUÑOZ EJJ. Características de la respuesta inmune en *Trichinella spiralis*. Rev Cient. 1993;5(1):17-28.

MORENO GMA, MUÑOZ EJJ, REVELES HRG, SALDIVAR ES, VACIO DE LA T MR. Utilización de técnicas directas e indirectas en el Dx de *Trichinellosis* en cerdo. Vet Uy Vol 2007;4.6:1-8.

MORENO GMA, RIVAS GJ, BERUMEN DE LA TV, MUÑOZ EJJ. Detección de *Trichinella spiralis* en rata doméstica del basurero Municipal de Zacatecas. 2007;VIII(5). p. 1-8.

MERCK SHARP. Infección por parásitos. Capítulo 184; 2005.

OWEN R. Description of a microscopic antigen infesting the muscle of human body. Trans Zool Sci. 1835;1:315-324.

REVELES RG, VILLALOBOS R, SALDÍVAR S, MORENO A. Histologic experimental implant of *T. spiralis*. *Trichinellosis*. ICT9. Ed. Ortega-Pierres, Gamble HR, Knapen F. Van and Wakelin D. 1996. p. 79-85.

VERA C, GAUDENCIO G, PARDINI S, SEQUEIRA V, BAIGORRI E. Triquinosis presentación de 60 casos. Rev Méd Rosario. 2001;67:73-75.