

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE E HISTOLÓGICA EN
RATAS LONG EVANS INFECTADAS CON *Trichinella spiralis* Y TRATADAS CON
ALBENDAZOL E IVERMECTINA**

Por

M.V.Z. FRANCISCA CHÁVEZ RUVALCABA

Como requisito para obtener el grado de **Maestría en Ciencias** con acentuación en
Microbiología.

Julio 2012

APROBACIÓN POR EL COMITÉ DE TESIS

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE E HISTOLÓGICA EN
RATAS LONG EVANS INFECTADAS CON *Trichinella spiralis* Y TRATADAS CON
ALBENDAZOL E IVERMECTINA**

Comité de Tesis

Dr. en C. Mario Rodolfo Morales Vallarta

Director

Dra. en C. María Alejandra Moreno García

Director Externo

Dra. en C. María Porfiria Barrón

Secretario

Dra. en C. Licet Villarreal Treviño

Vocal

Dra. en C. María Luisa Cárdenas Ávila

Vocal

I.- AGRADECIMIENTOS

Principalmente a Dios por permitirme estar aquí.

A mi familia que es el motor de mi vida.

A la Facultad de Ciencias Biológicas por la formación para la obtención del grado.

Al Dr. Mario Morales Vallarta por su guía.

II.- DEDICATORIA

A Bertha Ruvalcaba Rivera y Rito Chávez Parga, porque sin ellos nada de esto hubiera sido posible. Gracias

III.- TABLA DE CONTENIDO

Tema	Página
I.- AGRADECIMIENTOS _____	iii
II.- DEDICATORIA _____	iv
III.- TABLA DE CONTENIDO _____	v
IV.- LISTA DE FIGURAS _____	vii
V.- NOMENCLATURA _____	xii
1. RESUMEN _____	1
1.1. ABSTRACT _____	2
2. INTRODUCCIÓN _____	3
2.1. Planteamiento del Problema _____	5
2.2. Impacto de la Investigación _____	6
3. ANTECEDENTES _____	7
3.1. Epidemiología de la trichinellosis _____	8
3.2. Morfología de la trichinellosis _____	9
3.3. Ciclo vital _____	10
3.4. Cuadro clínico _____	12
3.5. Respuesta inmune _____	13
3.6. Diagnóstico _____	18
3.7. Tratamiento _____	19

3.7.1. Ivermectina	20
3.7.2. Albendazol	21
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	
5.1. Objetivo General	24
5.2. Objetivo particulares	24
6. METODOLOGÍA	
6.1. Diseño Experimental	25
6.2. Material y Métodos	25
6.2.1. Sangrado de Animales	25
6.2.2. Infección, tratamiento y sacrificio de animales	25
6.2.3. Técnica de Bólas Fernandez	26
6.2.4. Técnica de Compresión de Tejido	26
6.2.5. Técnica de Digestión Artificial	26
6.2.6. Obtención de Antígeno Soluble Total	27
6.2.7. Extracción con nitrógeno líquido del Antígeno total de <i>T. spiralis</i>	27
6.2.8. Determinación de proteínas	28
6.2.9. Tinción con Hematoxilina-Eosina	28
6.2.10. Microinmunodifusión doble	29
6.2.11. Corrimiento electroforético en geles	

de Poliacrilamida (EGPA) _____	29
6.2.12. Inmunoelectrotransferencia (IET) _____	30
6.2.13. Intradermorreacción (IDR) _____	31
6.2.14. Triple respuesta de Lewis _____	31
6.2.15. Biopsia _____	31
6.2.16. Modelo estadístico _____	31
7. RESULTADOS _____	33
8. DISCUSIÓN _____	57
9. CONCLUSIÓN _____	61
10. LITERATURA CITADA _____	62

IV.- LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Gráfica de aumento de talla	33
2. Gráfica de aumento de peso	34
3. Larvas infectantes por técnica Bólas Fernandez	35
4. Larvas infectantes por técnica Bólas Fernandez	35
5. Músculo masetero de grupo control hembra	36
6. Músculo tratado con 1 dosis de IVM en fase digestiva en murino hembra	36
7. Músculo tratado con 2 dosis de IVM en fase digestiva en murino hembra	36
8. Corte masetero de rata hembra, tratada con 7.5mg de ABZ en fase digestiva	36
9. Corte masetero de rata hembra, tratada con 15mg de ABZ en fase digestiva	36
10. Músculo de rata hembra tratada con 1 dosis de IVM en fase muscular	36
11. Músculo de rata hembra tratada con 2 dosis de IVM en fase muscular	36
12. Corte músculo rata hembra tratada con 7.5mg de ABZ	

fase muscular	37
13. Corte músculo rata hembra tratada con 15mg de ABZ	
fase muscular	37
14. Muestra por técnica de compresión de tejido control	
Infectado en machos	38
15. Músculo de rata infectada con <i>T. spiralis</i> y tratada con	
1 dosis de IVM en fase digestiva en machos	38
16. Músculo de rata infectada con <i>T. spiralis</i> y tratada con	
2 dosis de IVM en fase digestiva en machos	38
17. Corte de masetero de rata infectada y tratada con 7.5mg	
de ABZ en fase digestiva en machos	38
18. Corte de masetero de rata infectada y tratada con 15mg	
de ABZ en fase digestiva en machos	38
19. Músculo de rata tratadas infectadas y tratadas 1 dosis de	
IVM en fase muscular, machos	39
20. Músculo de rata tratadas infectadas y tratadas 2 dosis de	
IVM en fase muscular, machos	39
21. Músculo rata macho, tratada con 7.5mg de ABZ en	
fase muscular	39
22. Músculo rata macho, tratada con 15mg de ABZ en	
fase muscular	39
23. Gráfica de total de larvas obtenidas por el método de	
digestión artificial	40
24. Larvas infectadas de <i>T. spiralis</i> en grupo control infectado	

en fase muscular en hembras	41
25. Larvas infectadas de <i>T. spiralis</i> en grupo control infectado en fase muscular en machos	41
26. Larva infectante obtenida por Digestión artificial de machos tratados con 1 dosis de IVM en fase digestiva	41
27. Larva infectante obtenida por Digestión artificial de machos tratados con 2 dosis de IVM en fase digestiva	41
28. Larva infectante obtenida por Digestión artificial en murinos tratados con 7.5mg de ABZ en fase digestiva	41
29. Larva infectante obtenida por Digestión artificial en murinos tratados con 15mg de ABZ en fase digestiva	41
30. Larva infectante obtenida de murino tratado con 1 dosis de IVM en fase muscular	42
31. Larva infectante obtenida de murino tratado con 2 dosis de IVM en fase muscular	42
32. Larva infectante de rata hembra tratada con 7.5mg de ABZ en fase muscular	42
33. Larva infectante de rata macho tratada con 15mg de ABZ en fase muscular	42
34. Tabla de induración en la aplicación de Ag en cada uno de los grupos	43
35. IDR en grupo control sano a las 4hrs	43
36. IDR en grupo control infectado a las 24hr	43
37. IDR en rata macho tratada con 1 dosis de IVM en fase	

Digestiva	44
38. IDR en rata hembra tratada con 2 dosis de IVM en fase	
Digestiva	44
39. IDR en murino tratado con 7.5mg de ABZ en fase digestiva	44
40. IDR en murino tratado con 15mg de ABZ en fase digestiva	44
41. IDR de murino tratado con 1 dosis de IVM en fase muscular	44
42. IDR de murino tratado con 2 dosis de IVM en fase muscular	44
43. IDR en murino tratada con 7.5mg de ABZ en fase muscular	45
44. IDR en murino tratada con 15mg de ABZ en fase muscular	45
45. Tabla de resultados obtenidos por la técnica de Hematoxilina-	
Eosina	46
46. MIID realizada a grupo control sano	46
47. MIID realizada a control infectado	47
48. MIID realizada a grupo infectado y tratado con 1 y 2	
dosis de IVM en fase digestiva	47
49. MIID realizada a grupo tratado con 7.5 y 15mg de ABZ en	
fase digestiva	47
50. MIID realizada a grupo tratado con 7.5 y 15mg de ABZ en	
fase muscular	47
51. Inmunoelctrotransferencia en grupos control sano y control	
Infectado	47
52. Inmunoelctrotransferencia en hembras en fase digestiva	49
53. Inmunoelctrotransferencia en hembras en fase muscular	49
54. Inmunoelctrotransferencia en machos en fase digestiva	50

55. Inmunoelectrotransferencia en machos en fase muscular	50
56. Corte histológico de murino CI por técnica H-E	51
57. Corte histológico de murino tratado con 2 dosis de IVM	51
58. Corte histológico de murino tratado con 7.5mg ABZ	52
59. Corte histológico de murino tratado con 15mg de ABZ	52
60. Tabla ANOVA para larvas por grupo	53
61. Estadístico por medio de Tukey para larvas por grupo	53
62. Resumen estadístico	54
63. Tabla ANOVA entre grupos	54
64. Prueba múltiple de rangos	55
65. Prueba de contraste	55
66. Tabla de medias con intervalo de confianza de 95%	55
67. Tabla ANOVA entre grupos	56
68. Gráfica de medias por medio de Tukey	56

V.- NOMENCLATURA

ABZ	Albendazol
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
Ag-Ac	Antígeno-Anticuerpo
AST	Antígeno soluble total
ATP	Adenintrifosfato
C	Vía alterna del complemento
CCDA	Reacción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
CI	Control infectado
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CS	Control sano
DAB	Diaminobenzidina ^{3w}
EDTA	Etilendiamin tetra acético
EGPA	Corrimiento electroforético en Geles de Poliacrilamida
ELISA	Técnica de ensayo inmuno absorbente con enzima unida
ES	Escretorios/Secretorios
FD	Fase digestiva
FI	Fase Intestinal
FM	Fase muscular
GI	gastrointestinal
HCL	Ácido clorhídrico

HE	Hematoxilina-Eosina
hrs	horas
IDD	Inmunodifusión doble
IDR	Intradermorreacción
IET	Inmunoelectrotransferencia
IFI	Inmunofluorescencia
IFN γ	Interferón gama
IVM	Ivermectina
kDa	Kilodaltons
kg	kilogramos
LI	Larva infectante
LM	Larva muscular
LRN	Larva recién nacida
mg	miligramos
MIID	Microinmunodifusión doble
mm	milímetros
nm	nanometro
NC	Nitrocelulosa
PC	fosforilcolina
PBS	Solución básica de fosfatos
rpm	revoluciones por minuto
SDS	Dodesil sulfato de sodio
Th	T cooperador
T. spiralis	Trichinella spiralis
Tx	Tratamiento

T. spiralis Trichinella spiralis

1. RESUMEN

Trichinella spiralis es un parásito cosmopolita que infecta a mamíferos susceptibles y se trasmite al hombre cuando consume carne infectada deficientemente cocida. Hasta el momento los bencimidazoles son los fármacos que mayor acción antiparasitaria han presentado, el objetivo del presente trabajo es caracterizar la respuesta inmune e histológica de ratas Long Evans infectadas con *T. spiralis* y tratadas con 2 antiparasitarios, el modelo experimental consistirá en: 120 de ratas cepa Long Evans, hembras y machos, incluido control sano (CS) y control infectado (CI) serán tratados con Albendazol a dosis de 7.5 mg/Kg y 15 mg/Kg e Ivermectina con una y dos dosis, todos en fase digestiva y muscular.

A todos los animales se les realizaron técnicas de compresión de tejido, digestión artificial, tinción con hematoxilina-eosina, Inmunodifusión doble, Inmunoelectrotransferencia, intro dermorreacción y triple respuesta de Lewis además de que se obtendrán biopsias las cuales serán analizadas por medio de Microscopia óptica.

Se observo una diferencia significativa en el tratamiento con ABZ, tanto en fase digestiva como en fase muscular, a sus diferentes dosis, mostrando una respuesta inmunitaria eficaz que sigue reconociendo el parásito, mostrándose mayor eficacia que los murinos tratados con IVM, mostrándose que las diferentes técnicas de diagnostico, son de suma importancia, presentándose en cada una de ellas, diferencias entre los tratamientos. El análisis estadístico arrojó un resultado altamente significativo.

1.1 ABSTRACT

Trichinella spiralis is a parasite that infects mammals cosmopolitan susceptible and is transmitted to humans when they eat poorly cooked infected meat. So far, the benzimidazoles are the major antiparasitic drugs that have been presented, the objective of this study is to characterize the immune response and histological Long Evans rats infected with *T. spiralis* and treated with 2 antiparasitic, the experimental model consists of: 120 Long Evans murine, females and males, including healthy control (CS) and infected control (CI) will be treated with albendazole at a dose of 7.5 mg / kg and 15 mg / kg and ivermectin with one and two doses, all muscle and digestive phase.

All animals underwent tissue compression techniques, artificial digestion, hematoxylin-eosin, double immunodiffusion, Immunoelectrotransfer, intro dermorreación and triple response of Lewis as well biopsy to be obtained which will be analyzed by optical microscopy.

Significant difference was observed in treatment with ABZ in both phase and phase digestive muscle at different doses, showing an effective immune response that continues to recognize the parasite, showing that the murine more effectively treated with IVM, showing that different diagnostic techniques are of paramount importance, occurring in each, differences between treatments. Statistical analysis showed a highly significant result.

2. INTRODUCCIÓN

La trichinellosis es una enfermedad parasitaria cosmopolita de distribución mundial causada principalmente por *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 (Moreno and Muñoz, 1993). 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., 1996). La trichinellosis humana presenta una prevalencia alta en Europa y Asia. Ahora es considerada endémica en China y Japón. Este parásito no es tan común en las regiones tropicales (Dupouy, 2000).

El resurgimiento del ciclo doméstico se ha debido a una mayor prevalencia de *T. spiralis*, que ha sido relacionada principalmente con un desglose de los servicios veterinarios gubernamentales y las granjas estatales (por ejemplo, en los países de la ex URSS, Bulgaria, Rumania), los problemas económicos y la guerra (por ejemplo, en los países de la ex Yugoslavia), resultando en un fuerte aumento en la incidencia de esta infección en la explotación porcina en la década de 1990, con una prevalencia de hasta el 50% en las aldeas de Bielorrusia, Croacia, Letonia, Lituania, Rumania, Rusia, Serbia y Ucrania, entre otros países. La prevalencia también se ha incrementado a raíz de un aumento en el número de pequeñas explotaciones agrícolas (Argentina, China y México) y debido a la creencia general de que la triquinosis era un problema sólo hasta la década de 1960. El ciclo selvático se ha estudiado en profundidad, tanto a nivel epidemiológicos como biológicos, mostrando la existencia de diferentes agentes etiológicos (La detección de *Triquinas* nativa, *britovi*, *murrelli*, *nelsoni*), en las diferentes regiones y la existencia de "nuevos" patrones de transmisión. Además, el papel de animales de caza como una fuente de infección para los seres humanos ha aumentado considerablemente tanto en los países desarrollados y en desarrollo (Pozio, 2001).

El predominio global de la enfermedad es difícil de evaluar pero no menos de 11 millones de personas pueden ser infectados. Más de 10,000 casos de trichinellosis humana fueron reportados por la Comisión Internacional sobre Trichinellosis de 1995 a junio de

1997 y aproximadamente 10,000 infecciones porcinas fueron reportadas por la Oficina Internacional de Epizootias en 1998 (Dupouy, 2000).

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 (Medina et al., 2006).

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.

2.1. Planteamiento del Problema

Las enfermedades parasitarias han existido a lo largo de la vida tanto en animales como humanos, y teniéndose un extenso conocimiento acerca de los múltiples parásitos que afectan a estos y siendo uno de ellos la infección por *T. spiralis*, causante de una enfermedad zoonótica endémica y ya que frecuentemente se producen modificaciones en los hábitos del consumidor, además de la exportación de carne de países donde la trichinellosis es endémico y el fracaso de control veterinario debido al error humano o a agitaciones sociales causando con esto se magnifique el problema, ya que en muchos de los casos pasa desapercibida la enfermedad, y confundida con padecimientos de tipo respiratorio o gastrointestinal con un sin número de etiologías, dándole paso al desarrollo de la infección en el paciente. Por lo cual resulta de mayor importancia un adecuado diagnóstico además de alertar a los médicos sobre esta parasitosis para que se tenga en cuenta a la hora de manifestaciones febriles.

El trabajo es de suma importancia en virtud de la alta incidencia mundial, y ya que aunque se conocen algunos tratamientos que resultan efectivos en las diferentes etapas de la infección aún no se conoce cual es la respuesta humoral de animales infectados con *T. spiralis* y tratados con antiparasitarios como Albendazol e Ivermectina, además de conocer los la respuesta celular y los cambios en la función hepática, inducida por ABZ e IVM.

2.2. Impacto de la Investigación

La contribución de este estudio es con el fin de conocer tanto en la fase digestiva como en la muscular los cambios estructurales de las células que son infectadas y tratadas con IVM y ABZ, además de las diferencias en la respuesta humoral de estos, así como los cambios que sufre el hospedador tanto con la infección por *T. spiralis* así como con los diferentes tratamientos, esto permitirá tener un amplio conocimiento en el desarrollo general de la enfermedad.

3. ANTECEDENTES

Las asociaciones biológicas entre los seres vivos se iniciaron con la aparición de la vida misma sobre el planeta tierra al competir éstos por el espacio y ponerse en contacto íntimo. Algunos autores señalan asociaciones parasitarias encontradas en restos fósiles de foraminíferos (protozoos con concha calcárea) y algas marinas con más de 530 millones de años de antigüedad (Ríos, 1997).

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 que como consecuencia de estas, el mismo hombre se infesta, por lo cual representa un problema de salud pública. La importancia de la parasitología experimental se ha puesto de manifiesto en muchos trabajos de investigación en los cuales se han utilizado modelos parasitarios para luego aplicarlos a problemas especiales del hombre (Quiroz, 1991).

La información generada en los laboratorios de diagnóstico ayuda en el conocimiento de las parasitosis y permite diseñar programas de prevención, control y/o erradicación (Rodríguez et al., 2001).

Se pueden considerar tres ciclos epidemiológicos: el silvestre, doméstico y sinantropico. En el silvestre la infección ocurre entre carnívoros que se alimentan de presas vivas o de cadáveres de animales infectados, en este ciclo, el hombre aparece involucrado como huésped accidental y se le ha descrito en zonas geográficas tórridas o muy frías (Martínez, 1998). El ciclo doméstico esta fundamentalmente relacionado con las condiciones en que se crían cerdos y principales vías de transmisión son la ingestión de restos de cerdos, ratas o animales salvajes infectados, canibalismo y coprofagia. Entre los ciclos domésticos y salvaje, se encuentra el sinantropico, en el que intervienen animales como gatos, perros, zorros, mustélidos, etc. que actúan como vehículo de los distintos genotipos de *Trichinella* involucrados en cualquiera de los dos ciclos mencionados (Steffan, 2006).

3.1 Epidemiología de la Trichinellosis

Las primeras observaciones de quistes de *Trichinella* fueron realizadas en músculos procedentes de autopsias de cadáveres humanos en el hospital Guy de Londres por Reacok en 1828 y por Hilton en 1833 sin que llegaran a establecer la naturaleza del agente. El crédito del descubrimiento de la *Trichinella* se debe a James Paget, estudiante del primer año de medicina, que, en el hospital San Bartolomé de Londres, observó en los músculos de un hombre que había muerto de tuberculosis “el gusano en su cápsula”. El zoólogo británico Richard Owen estudió porciones de músculo del caso de Paget y descubrió el parásito al cual denominó *Trichina spiralis* en 1835 (Ramírez, 1981).

Stoll calculó que había 27.8 millones de personas infectadas con *Trichinella spiralis* en el mundo, de las cuales tres cuartas partes se encontraban en Estados Unidos.

En México la triquinosis humana ha sido poco estudiada, en estudios epidemiológicos obtenidos por histopatología post mortem de diafragmas humanos, se han observado frecuencias que varían del 4% al 15%. Fue reportada, por primera vez, en 1891 por Zúñiga, En 1893 Barragán reportó cuatro casos probables en cadáveres disecados. En 1974, Martínez reportó un brote epidémico (40 casos). Se ha informado, en otros estudios, una prevalencia del 2 al 6%, pero su promedio, en diafragmas humanos, es aproximadamente del 8% (Moreno and Muñoz, 1993).

Para el decenio de 1976 a 1985 se registraron brotes en Zacatecas, Durango, Estado de México, Guanajuato y Ciudad de México (Barbosa et. al., 2001). Recientemente, se documentó un brote de trichinellosis en ciudad Delicias, Chihuahua, que involucró a 166 personas y se originó por consumo de chorizo mal cocido (Yépez, 1996). Se reportaron casos esporádicos en pacientes con afiliación al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) entre 1976 y 1985, especialmente en algunos estados como Zacatecas, Durango, Estado de México, Guanajuato y Distrito Federal. Estos casos fueron ocasionados por la ingestión de carne de cerdo cruda o mal cocida y salchichas (Carrada, 1992). Posteriormente en 1981 se presentaron 131 casos, en 1986-175 y en 1987-380, en el estado de Chihuahua en octubre de 1987-50 personas fueron hospitalizadas por esta enfermedad (Meza et al., 1996).

Se ha reportado una incidencia de alrededor del 2.5% de la población general, por lo que se sigue considerando un problema de salud pública (Latín salud, 2001). Se han identificado las regiones geográficas donde la enfermedad aparece más frecuentemente, con

un incremento en el número de casos; Se ha reportado al valle de Toluca como zona endémica, principalmente por sus brotes en porcinos (Monroy et al., 2001). En San Luis Potosí se realizó un estudio seroepidemiológico en 1998 con población abierta en una localidad de Cerritos, encontrando una seropositividad de 1.0 a 1.9% dependiendo del antígeno utilizado, sugiriendo la presencia de endemia en México (De la Rosa et al., 1998). Del 2001-2002 se han reportado casos en Aguascalientes (3), Baja California (6), Chiapas (3), Durango (2), Distrito Federal (1), Guanajuato (1), Hidalgo (4), México (3), Nuevo León (1), Sinaloa (5), Sonora (3) y Tabasco (1), con un total de 37 casos (SSA, 2002).

3.2. Morfología de la *Trichinella*

La *Trichinella* pertenece a la Familia Nematelminthos de la Clase Nemátoda, Orden Enoplida, del género *Trichinella* y existen 8 especies con presencia de cápsula: *spiralis*, nativa, T6, *britovi*, T8, T9, *murelli*, y *nelsoni*, y 2 especies sin cápsula de colágena en músculo: *pseudoespiralis*, y *papuae*, (Pozio et al., 1992; Pozio et al., 2000, y Arnold, 2001). Lloyd en el 2000 considera 7 entidades de *Trichinella* a nivel de especies mientras considera que T6, T8 y T9 en un nivel taxonómico incierto.

La *T. spiralis* es un metazoario, el cual en etapa adulta, tiene las siguientes características: el macho mide 1.5 x 0.04 mm, y la hembra 3.5 x 0.06 mm (Moreno and Muñoz, 1993), de forma cilíndrica y vela delgada, se pueden identificar tres estadios; estado adulto (hembras y machos), larva recién nacida (LRN) y larva de músculo enquistada o larva infectante (LI) (Moreno et al., 2009).

Los adultos son blanquecinos y filiformes. La hembra mide de 3 a 4 mm y su diámetro es de 35 a 70 μm . Monovárica y vivípara con capacidad de parir entre 200 y 1500 larvas, dependiendo de la especie y del hospedador implicados. El macho mide de 1.4 a 1.6 mm, es monórquido, no posee espículas pero presenta un par de apéndices copuladores cónicos en el extremo posterior del cuerpo. La larva recién nacida (LRN) mide 100 μm x 6 μm , presenta un pequeño espolón cefálico, un estilete bucal y un esticosoma formado por 30 a 40 esticocitos que contienen gránulos de distinto tamaño cuya importancia radica en su poder antigénico al ser excretados. La larva muscular (LM) miden 1 mm x 30 μm de diámetro pudiendo crecer en el quiste hasta 900- 1280 μm de longitud y 35-40 μm en

diámetro. No tiene estilete bucal. El esticosoma presente en este estadio posee distinto tipo de gránulos en comparación a los de la LRN (Riva, 1990).

3.3. Ciclo vital de la *Trichinella*

La infección ocurre entre carnívoros que se alimentan de presas vivas o cadáveres de animales, cuyos tejidos están infectados con larvas de *Trichinella spiralis*, o en omnívoros que consuman pastura que contenga trozos de carne infectada. Las aves adultas pueden albergar transitoriamente al parásito adulto, pero las larvas no se enquistan en sus músculos (Chávez, 2006).

El ciclo vital del parásito se presentan tres etapas o fases: entérica, sistémica y muscular.

Fase enteral. El hospedador que consume carne contaminada que contiene larvas infectantes (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 (Moreno et al., 2009).

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. 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 larvas recién nacidas (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 (Moreno et al., 2009).

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 toraxico 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 (Barbosa et al., 2001).

Fase muscular. En las células musculares las LRN inician un período de desarrollo postembrionario creciendo exponencialmente y desarrollándose sin mudas; la máxima diferenciación se alcanza entre los días 4 y 20 después de la penetración (Moreno et al., 2009).

Una característica detectable de *T. spiralis* es el metabolismo anaerobio que desarrolla la larva L1. En el tejido muscular la larva induce la formación de una célula nodriza y de un sistema de vascularización periférica a modo de red de vénulas que le permite el intercambio de nutrientes y desechos por largos periodos mientras el hospedador continúe vivo. Cuando el hospedador muere, la capsula de colágeno generada permite que en el tejido en descomposición la larva sobreviva por largos periodos manteniendo su capacidad para ciclar en un nuevo hospedado (Riva et. Al. 2011).

3.4. Cuadro clínico

Clínicamente la Trichinellosis se confunde muy a menudo con otros síndromes clínicos y frecuentemente es mal diagnosticada, en algunos casos pasa desapercibida pues se comporta de manera asintomática (Rojas et al., 1989; Lloyd, 2000). La magnitud del cuadro clínico depende del grado de invasión muscular y del estado inmunológico del hospedero (Barbosa et al., 2001).

Existen síntomas clínicos característicos para cada fase de la infección por *Trichinella spiralis*:

Fase entérica. La mayoría de los individuos que han sido infectado por ingestión de carne contaminada con trichinella no presentan síntomas, la mayoría presentan náusea moderada y diarrea estas se deben a la penetración de la mucosa intestinal. La primera semana de la fase entérica en pacientes con infecciones moderadas o severas va acompañada de un dolor abdominal, diarrea, estreñimiento, vómito, malestar general y fiebre leve. Estos síntomas varían en severidad y solo durarán algunos días. Estas manifestaciones clínicas son similares a aquellas causadas por otros desórdenes entéricos como la intoxicación por alimento o la indigestión, hecho que hace más difícil realizar un diagnóstico correcto. La mayoría de los pacientes no busca atención médica durante esta fase debido a que los síntomas todavía no son tan severos como los de la fase parenteral (Capo and Despommier, 1996), la etapa de incubación se le conoce como silenciosa con aproximadamente 48 hrs de duración (tiempo de transformación de las larvas ingeridas en adultos). La fase entérica suele confundirse con una infección por virus o bacterias (Arnold, 2001).

Fase parenteral. Desde la semana 2 a la semana 6 después de la infección, la fase entérica sigue presente pero los síntomas correlacionados con la fase intestinal disminuyen. En esta etapa, se desarrollan las larvas recién nacidas. En las infecciones moderadas, los síntomas de las fases parenteral y migratorias son los primeros en presentarse ya que en estas infecciones hay ausencia de síntomas relacionados con la fase entérica. Las infecciones moderadas a severas producen mialgia difusa en 30% -100 % de los pacientes; un estado de tipo paralítico (10 – 35%); edema periorbital o facial (15 – 90%); conjuntivitis (55%); fiebre (30- 90%); dolor de cabeza (75%); salpullido cutáneo (15 – 65%); disfagia

(35%) dificultades para abrir la boca; insomnio; pérdida de peso; sensaciones de nervios periféricos; flacheos de calor; voz rasposa (5 – 20%); bronquitis (5- 40%); hemorragias en astilla en los surcos de las uñas y en la retina así como problemas visuales y la parálisis de los músculos oculares. Estos datos provienen de casos clínicos citados (Capo and Despommier, 1996).

La mayoría de los síntomas están asociados directa e indirectamente con la penetración indiscriminada de tejidos realizada por las larvas migratorias recién nacidas. Después de la segunda semana de esta fase, la mayoría de los pacientes han desarrollado anticuerpos séricos contra los antígenos secretados por las larvas en el tejido muscular. Los pacientes que sufren de una infección severa son considerados como posibles signos de una epidemia. Ellos son los primeros en ser diagnosticados debido a que presentan una sintomatología más avanzada de la enfermedad. Fiebre alta y niveles elevados de eosinófilos circulantes (30 – 60% o más), dolor muscular severo, salpullido y dolores de cabeza así como hinchazón de los párpados, cara o las extremidades, son características de estos casos. También pueden manifestarse síntomas neurológicos que raramente ocurren antes del término segunda semana de infección y que provocan un estado generalizado de ansiedad (Capo and Despommier, 1996).

La patogenicidad de *T. spiralis* es superior a la de otras especies debido al mayor número de larvas recién nacidas producidas por las hembras y la reacción inmune inducida más intensa en los seres humanos (Makedonka and Douglas, 2006).

3.5. Respuesta inmune

Las infecciones parasitarias desencadenan una serie de mecanismos de defensa inmunitarias característicos, unos mediados por anticuerpos y otros por células. La eficacia de cada uno de estos tipos de respuesta depende del parásito implicado y de la fase de la infección (Makedonka and Douglas, 2006).

Numerosos estudios han demostrado que la infección con *T. spiralis* produce una protección poderosa y duradera contra una nueva infección. Esta protección es la culminación de una secuencia de respuestas del hospedero en las cuales el anticuerpo juega

un papel principal (Takahashi et al., 1990). Como lo menciona Dupouy and Murrell en el 2007, el inmunodiagnóstico humano tiene tres objetivos principales:

- a. Reconocer la infección aguda para permitir un temprano tratamiento antihelmíntico.
- b. La elaboración de un diagnóstico retrospectivo.
- c. Adición de información a la epidemiología de la infección.

En la respuesta inmune humoral contra *Trichinella spiralis* se producen inmunoglobulinas IgM, IgG, IgE e IgA. Existe en forma temprana la presencia de IgG1, seguida de IgG3 e IgG4 (Martínez et al., 2000).

Se ha demostrado que la presencia de *T. spiralis* en los tejidos desencadena una reacción de hipersensibilidad retardada y de producción de anticuerpos, ambos mecanismos contienen, en ocasiones, una protección específica. La cutícula y los elementos del tubo digestivo del parásito son capaces de desencadenar una respuesta inmune, específicamente los esticocitos y los elementos del espacio pseudo-celómico contienen los antígenos más importantes que varían de acuerdo con la etapa de su ciclo vital (Moreno, 1995).

La respuesta inmune inespecífica y específica a trichinellosis, está regulada tanto en su naturaleza como en su intensidad y duración por una serie de factores: carga parasitaria, estadio del parásito, y de las características del huésped (edad, sexo, estado nutricional, hormonal e inmunológico). *T. spiralis* de acuerdo al estadio en que se encuentre en el huésped (LI, adulto o LRN) va a desencadenar la producción de anticuerpos (Acs), los cuales están dirigidos a los diferentes sitios anatómicos del parásito (cutícula, esticocitos, etc.)

Los antígenos (Ags) que desencadenan la producción de Acs se encuentran en su mayoría caracterizados en dos grupos: el primer grupo de Ags (detectados en las capas internas de la cutícula, hemolinfa, saco embrionario, glándula hipodermal y gránulos exocrinos en el tracto reproductor del macho), se detectan dos semanas después de la infección (grupo de respuesta rápida), que soportan Ags relacionados con fosforilcolina (PC). Otro grupo de Ags encontrados en la superficie de la larva y en los gránulos de sus esticosomas, se detectan sólo hasta pasadas cuatro semanas de la infección (grupo de respuesta lenta) que cargan antígenos de productos excretorios y secretorios (ES) de la larva, el más estudiado es la tyvelosa. Varios autores (Despomier and Laccetti, 1981; Wakelin, 1996; Pozio et al., 2001 y Moreno et al., 2001), describen como antígenos

inmunodominantes de la LI el triplete de 42, 45 y 48 kDa, que es conocido en diferentes modelos experimentales (ratón, rata, conejo, cerdo y el hombre).

Moreno et al., en el 2001 reportan que la parte posterior del esófago de la larva *T. spiralis* es glandular y está constituida por esticosomas, los que corresponden a glándulas exocrinas constituidas por 45/55 esticocitos. Estos son células discoideas que poseen gránulos citoplasmáticos: α_0 , α_1 , α_2 , β y γ , secretan material antigénico en las primeras 30 horas pos-infección y son capaces de inducir una respuesta inmune. Makenzie et al. en 1980 describen el efecto de complemento de varios estadios del ciclo de vida del nemátodo *T. spiralis*, los Acs de ratas infectadas con este parásito y diferentes tipos de células, la cutícula de la larva infectante y la forma adulta en intestino activa la vía alterna del complemento (C), pero la cutícula de la LRN de *T. spiralis* no presenta esta propiedad inicial. No obstante, la reciente formación de la cutícula en la región media de su cuerpo, es capaz de activar el complemento. Ratas infectadas con cualquier especie de nemátodo producen Acs contra la cutícula en todos los estadios del ciclo de vida, condicionando que *T. spiralis* desencadene uniformemente la vía alterna del complemento con receptor a Fc y la adherencia de granulocitos incluyendo células cebadas. *T. spiralis* es un patógeno intracelular que provoca una respuesta celular, si el parásito no logra ser eliminado, puede aparecer la patología, cuando el antígeno (Ag) es eliminado, las células T y B vuelven a reposo, por lo que el sistema inmune va disminuyendo la intensidad de su respuesta (Iañes, 1999).

La expulsión del nemátodo *T. spiralis* a nivel gastrointestinal es asociada con una pronunciada mastocitosis mediada por una respuesta de tipo T-cooperador 2 (Th2) involucrando IL-4, IL-10, y IL-13. La IL-18 tiene un efecto de protección contra este parásito in vivo, ratones knockout son muy resistentes a infecciones por *T. spiralis*, expulsando a los adultos rápidamente y subsecuentemente desarrollando bajos niveles de enquistamiento de LI.

El incremento de la expulsión está correlacionado con un alto número de células en la mucosa y el incremento de la secreción de IL-13 e IL-10. El tratamiento no tiene efecto en la eosinofilia intestinal o hiperplasia en la capa celular pero si inhibiendo específicamente el desarrollo de mastocitosis. Además IL-18 en cultivos in vitro de células derivadas de la médula ósea, resulta una significativa reducción en la producción de

células secretoras de IL4. El tratamiento con Interferón gama ($IFN\gamma$) en ratones knockout in vivo infectados con *T. spiralis* con IL-18 demostró que el efecto inhibitorio de IL-18 en mastocitosis y en secreción de citocina Th2 es independiente de $IFN\gamma$, ahora, IL-18 juega un importante papel biológico en la retroalimentación de la respuesta celular intestinal y puede promover la supervivencia de parasitosis intestinal in vivo (Helmby and Grencis, 2002).

Grandes cantidades de Ags por vía oral, puede provocar tolerancia inmunológica o una desviación de respuesta, en función de las sub-poblaciones de linfocitos T-cooperadores (Th) que se activan o inhiben.

El complejo antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) surge durante la respuesta inmune pueden mejorar o suprimirse según el estímulo. La capacidad de respuesta inmune depende del fondo genético de cada individuo, en algunos experimentos se ha determinado la existencia de genes que condicionan o modulan la respuesta inmune. Algunos de ellos están ligados al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), mientras que otros residen fuera de esa zona.

El polimorfismo de secuencias del CMH de cada individuo se hereda de sus padres y tiene una profunda influencia sobre la capacidad de unirse a péptidos, y como consecuencia sobre la activación de los linfocitos T. En ratones la susceptibilidad o resistencia a *T. spiralis* y *Leishmania donovani* está condicionada por los alelos del locus H-2 (Iañez, 1999).

El papel de IgG en la expulsión de *T. spiralis* en ratas adultas se analizó en un modelo experimental, en donde las ratas se infectaron con el nemátodo *Heligmosomoides polygyrus*, posteriormente se obtuvo el suero del día 5 y 14 el cual fue purificado para obtener un anticuerpo monoclonal de IgG. Las ratas fueron retadas con LI de *T. spiralis*, 24 horas después del reto los anticuerpos monoclonales se transfirieron para la cuantificación de los adultos, en varios tiempos encontrando que en las ratas a las que se les aplicó el monoclonal fueron capaces de llevar a cabo la expulsión de los adultos, la protección varió de un 40 a 90% de eliminación de *T. spiralis* siendo dependientes de la dosis. Ningún linfocito Th de células transferidas de la forma *H. polygyrus*, confiere protección en reparación intestinal, ese dato sugiere que la rápida expulsión es predominante en procesos mediados por anticuerpos de tipo (IgE e IgG), aunque son elementos intestinales

necesarios. Finalmente estos resultados muestran que varios isotipos de IgG y IgE tienen un rol funcional en la expresión de la inmunidad intestinal (Bell et al., 1992).

Peters en 1999, describe la respuesta de un Ac de clase IgG2c en intestino de ratas infectadas con *T. spiralis*, el cual tiene una respuesta inmunológica a las glicoproteínas de fosforilcolina en el primer estadio de la larva siendo diferente a la respuesta característica para la anti-tyvelosa que es inducida por el estadio de LI.

Las actividades biológicas en ratas por IgG2c no se conocen, mientras que la presencia de IgG2c manifiesta dos distintas respuestas relacionadas directamente con anticuerpos contra LI de *T. spiralis* en esto se basa la conclusión de que la presencia de IgG2c es una respuesta directa de Ac contra LI de *T. spiralis* siendo un isotipo de la célula que la produce (Peters, 1999).

En otros estudios de la inmunidad de trichinellosis que están basados en la inflamación y en la respuesta celular, mediada contra los adultos de *T. spiralis* localizándose en intestino de hospederos. Li y Ko en el 2001 indica que se despierta una respuesta a Th2 durante la fase muscular en desarrollo. En las pruebas de fluorescencia indirecta y en estudios con microscopio laser confocal para detectar anticuerpos, demuestran la presencia de células CD4 y CD8 en la región citoplasmática de la célula nodriza de *T. spiralis* (Moreno et al., 1996).

Las investigaciones de Despomier ha demostrado que los esticositos son de dos tipos, un grupo contiene gránulos alfa y el otro gránulos beta, al aislar antígenos de estos e inocularlos en animales experimentales obtuvieron altos niveles de producción. Varios autores han reportado que antígenos inmunodominantes de *T. spiralis* tienen un peso molecular dentro del rango de 28-120 kDa con el predominio de una banda de 45 kDa (Moreno et al., 1996).

En resumen los mecanismos inmunológicos básicos en la relación hospedador-parásito muestran a nivel de los mecanismos inmunológicos efectores y de escape parasitario: Existen Acs citotóxicos específicos contra la LRN de *T. spiralis* en fase temprana de la enfermedad a diferencia de la fase crónica donde se detectan Acs contra LRN sin actividad citotóxica contra el parásito. Los isotipos de Acs contra dicho estadio difieren en la fase tardía y temprana de la enfermedad. En la reacción de citotoxicidad celular dependiente de Acs (CCDA) la edad de maduración de las LRN y el estado de

activación de las células efectoras son parámetros de importancia en esta reacción. La presencia de las inmunoglobulinas IgG, IgE y el complemento son fundamentales en la reacción de CCDA. La actividad citotóxica del eosinófilo no está relacionada con su número (hipereosinofilia) sino con su estado de activación, cuando los eosinófilos están activados la presencia del complemento no es esencial para la muerte del parásito. (Venturiello, 1998).

3.6. Diagnóstico

El diagnóstico de la triquinosis humana se basa fundamentalmente en la consideración de antecedentes epidemiológicos y clínicos, junto con algunos exámenes de laboratorio, entre los cuales destacan el recuento de eosinófilos y las reacciones inmunobiológicas (Contreras et al., 1999).

T. spiralis es la especie más importante en los cerdos domésticos para la transmisión de zoonosis. Hay dos métodos principales que se utilizan para probar a los cerdos de esta infección. El método preferido para el diagnóstico de la especie porcina infectada es mediante la digestión de muestras de carne con HCL. Aunque algo engorroso, la sensibilidad de este método es relativamente uniforme a lo largo de una infección. El ligado a enzimas pruebas de inmunoensayo (ELISA) son un método alternativo que proporciona para la detección relativamente rápida de *T. spiralis* la infección por serología. Una ventaja es que la prueba ELISA puede detectar la infección antes de la matanza. Sin embargo, la sensibilidad de la prueba de ELISA puede ser menor a principios de la infección.

Hay varias pruebas disponibles para diagnosticar trichichinellosis en seres humanos. La biopsia muscular se utiliza para observar directamente las larvas del músculo para el diagnóstico inequívoco. Las biopsias pueden ser evaluadas por varios métodos de microscopía participación de:

1. Las muestras de tejido presionando entre 2 diapositivas, para la detección de larvas en el tejido muscular.

2. Digerir una porción finamente picada de la muestra de la biopsia en HCl-pepsina y la detección de larvas en libertad a partir de tejido muscular.
3. El examen histológico de secciones teñidas de una biopsia muscular. Alternativamente, varias pruebas serológicas se han utilizado para el diagnóstico de infecciones en seres humanos, incluidos los ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA.

El diagnóstico serológico durante la infección temprana y la fase aguda es más problemático, con reacciones débiles que complica la interpretación de estas pruebas (Makedonka and Douglas, 2006).

3.7. Tratamiento

En humanos no existen medicamentos totalmente eficaces. Se usan benzimidazoles (albendazol, mebendazol) tanto para la fase intestinal como para la fase parental, siendo más efectivos los administrados en forma temprana. Conjuntamente se utilizan corticoesteroides ya que la acción larvicida de los antihelmínticos puede generar una brusca liberación de antígenos parasitarios. La administración de drogas inmunomoduladoras se aplican a pacientes con enfermedad severa o signos de inmunosupresión. Si bien el tratamiento farmacológico no es aplicado en animales, numerosos estudios en ratones y cerdos infectados con *T. spiralis* han testeado la eficacia de ivermectina y flubendazole contra las larvas enquistadas y otros estadios, hallando signos de prevención y tratamiento pero con insuficiente consistencia aún. También se realizaron estudios de vacunaciones contra *Trichinella* donde observaron una importante respuesta inmune en inmunizaciones realizadas con antígenos solubles de adultos de *T. spiralis*. Estudiaron el nivel de protección inducida por vacunación con antígenos de LM de *T. spiralis* en ratones de alta y baja respuesta inmune resultando altamente eficaz sólo en los primeros. De igual forma encuentran promisorio la vacunación contra *T. spiralis* utilizando el mismo tipo de antígenos (Riva et al, 1990).

3.7.1. Ivermectina

Medicamento de elección para el tratamiento de helmintos. Derivado del actinomiceto *Streptomyces avermitilis*. El medicamento se absorbe rápido alcanzando concentraciones plasmáticas máximas 4h después de la administración de una dosis de 12mg. Su vida media es de casi 16h. La excreción del medicamento y de sus metabolito es casi exclusivamente en las heces (Katzung, 2005).

Farmacodinamia. El fármaco inmoviliza a los organismos afectados al inducir parálisis tónica de sus músculos (Goodman et al., 2002), la parálisis era mediada por la potenciación y activación directa de los canales de Cl^- sensibles a IVM, controlados por el glutamato. Esos canales están solamente presentes en nervios y células musculares de los invertebrados y una vez potencializados ocasionan un aumento de permeabilidad en la membrana a los iones de cloro, con hiperpolarización de los nervios y las células musculares, resultando la parálisis y muerte del parásito, como lo demostraba Arena et al., 1995. Los canales de Cl^- controlados por el glutamato probablemente sirven como dos lugares de acción de la IVM también en insectos y crustáceos. A falta de receptores con alta afinidad para avermectina en céstodos y tremátodos se puede explicar porque estos helmintos son sensibles a la IVM (Flóres, 2003). Las avermectinas actúan con los receptores de GABA en el cerebro de vertebrados (mamíferos), pero su afinidad por receptores de invertebrados es 100 veces mayor (Colin, 1998).

Farmacocinética. La preparación parenteral en humanos es para pacientes que presenten parálisis espástica a dosis de 0.2- 1.6 mg / kg por vía subcutánea (Lancet, 2000). Se administra solo por vía oral en el humano (Katzung, 2005), se absorbe bien en un tiempo máximo de 4 horas y es metabolizada ampliamente, su vida media es de 27 horas, se une el 93% a proteínas plasmáticas, la depuración plasmática es lenta (cerca de 1.2 litros/por hora) en un volumen aparente de distribución de aproximadamente 47 litros.

Efectos adversos. Algunos de los síntomas son principalmente: ataxia, midriasis, depresión, temblores, estupor, hemesis, salivación y muerte (Colin, 1998).

3.7.2. Albendazol

Antihelmítico de amplio espectro de administración por vía oral es un benzimidazol carbamato. Después de la administración por vía oral se absorbe erráticamente (hay incremento con alimento con alto contenido de grasa). Alcanza concentraciones máximas en el plasma variables cerca de 3 h después de la administración de una dosis de 400 mg por VO y su vida media plasmática es de 8 a 12 h. Los metabolitos de albendazol se excretan en la orina. Se cree que los benzimidazoles actúan contra los nematodos inhibiendo la síntesis de microtúbulos (Katzung, 2005), el más nuevo que se ha utilizado para la erradicación a nivel mundial de los helmintos (Goodman et al., 2002).

Farmacodinamia. Los benzimidazoles ocasionan muchos cambios bioquímicos en nemátodos sensibles, por ejemplo, inhibición de la fumarato reductasa en las mitocondrias, disminución del transporte de glucosa y desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Goodman et al., 2002), hay pruebas de peso que demuestran que la acción primaria entraña la inhibición de la polimerización de microtúbulos al unirse a la β -tubulina (Goodman et al., 2002 y Katzung, 2005). El ABZ bloquea la captación de glucosa de los parásitos susceptibles en la etapa larvaria y adulta, abatiendo sus reservas de glucógeno y disminuyendo la formación de trifosfato de adenosina (ATP). Como resultado el parásito se inmoviliza y muere (Katzung, 2005).

Farmacocinética. Su administración es por vía oral a dosis aproximada de 400 mg en dosis única en personas desde los 2 años de edad hasta edad adulta, dependiendo del parásito será la repetición de la dosis. En cerdos se administra por vía oral pero de forma líquida, es decir, en suspensión (Colin, 1998). La absorción del ABZ es variable e irregular después de haber sido ingerido, se administra con mejores resultados en el estómago vacío cuando se usa contra parásitos intraluminales; su absorción es mejor si se administra en compañía de alimentos grasos y posiblemente también por acción de las sales biliares ocasionando que se ejerza efecto contra parásitos tisulares. Es metabolizado rápidamente en el hígado, hasta la forma de sulfóxido de albendazol (es el que mantiene la actividad antihelmíntica) se liga aproximadamente en un 70% a proteínas plasmáticas, su vida media en el plasma es de 8 a 9 horas (Goodman et al., 2002).

La formación de sulfóxido de albendazol es catalizada por la flavina monooxigenasa microsómica y en menor magnitud por algunas formas del citocromo P450 (Gottschall, 1990). Parte del sulfóxido es todavía oxidado más hasta generar el metabolito sulfona que es farmacológicamente inactivo (Katzung, 2005). Los metabolitos se excretan principalmente por la orina (Goodman et al., 2002, Katzung, 2005).

Aunque se absorbe como el mebendazol por tracto gastrointestinal y su actividad antihelmíntica es ejercida principalmente en dicho tracto, llega a alcanzar concentraciones plasmáticas 15-50 veces superiores, y por consiguiente, en el líquido quístico de una hidátide; por esta razón puede ejercer mayor acción letal en hidatidosis (Flóres, 2002).

Efectos adversos: A diferencia de los otros benzimidazoles, el ABZ tiene pocos efectos adversos si se utiliza por poco tiempo (1 a 3 días), en tratamiento a largo plazo en ocasiones hay malestar abdominal, diarrea, náusea, mareos y cefalea transitorios e incremento en las enzimas hepáticas (Katzung, 2005).

Cuando los efectos son graves se puede presentar: dolor GI, cefaleas intensas, fiebre, fatiga, alopecia, leucopenia, trombocitopenia, salpullido, llagas en la garganta.

Debido a que el fármaco es teratógeno y embriotóxico en algunas especies animales no se recomienda a mujeres embarazadas, ni a niños menores de 2 años (Goodman et al., 2002). Es importante efectuar en forma seriada estudios de función hepática durante su administración por largo tiempo, no se recomienda administrarse en pacientes con cirrosis hepática (Davis et al., 1989).

Dosis: contra triquinosis (400 mg dos veces al día por 1 o 2 semanas) (Katzung, 2005).

4. HIPOTESIS

“El patrón característico en la respuesta inmune e histológica muestra diferencias en animales infectados con *T. spiralis* y tratados con 2 fármacos antiparasitarios”.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Caracterizar la respuesta inmune e histológica de ratas Long Evans infectadas con *T. spiralis* y tratadas con 2 antiparasitarios.

5.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar la respuesta inmune e histológica de animales infectados con *T. spiralis*
- Caracterizar la respuesta inmune e histológica de animales infectados con *T. spiralis* y tratados con Albendazol e Ivermectina.
- Evaluar comparativamente el efecto del Albendazol e Ivermectina en animales infectados con *T. spiralis*.
- Evaluar la morfología por medio de microscopía óptica, de animales infectados con *T. spiralis* y tratados con Albendazol e Ivermectina.

6. METODOLOGIA

6.1. Diseño experimental

El trabajo experimental se llevo a cabo en el Laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León en conjunto con el departamento de Biología Celular y Microbiología de la Unidad Académica de Biología Experimental de la Universidad Autónoma de Zacatecas

6.2. Material y Métodos

Se utilizaron 120 murinos (ratas) hembras y machos de la cepa Long Evans de peso de 250 ± 20 gr, teniendo 4 grupos de trabajo, tomando el peso y talla cada 2 semanas.

Modelo	Subgrupos	Número de ratas por subgrupo	Sexo	Fase de	Tratamiento	Sangrados
Experimental				Infección	Dosis	
Control sano	2	5	♀ ♂	Intestinal Muscular		1. Preinfección 2. Post infección 3. Cada 2 semanas después de la infección 4. Al completar el ciclo vital de <i>T. spiralis</i>
Control infectado	4	5	♀ ♂	Intestinal Muscular		
Tx. Albendazol	8	5	♀ ♂	Intestinal Muscular	15mg/kg 7.5mg/kg	
Tx. Ivermectina	8	5	♀ ♂	Intestinal Muscular	1 dosis de 200µg/kg 2 dosis de 200µg/kg	

Tx- tratamiento, ♀-hembra, ♂-macho, mg- miligramo, µg-microgramo, kg-kilogramo.

6.2.1. Sangrado de los animales

Los animales fueron sangrados antes de infectarlos, posterior a la infección, así como cada 2 semanas después de la infección además de al sacrificio, y realización de frotis

para evaluación de eosinófilos, se usaron vapores de halotano para anestésarlos y se obtuvieron los sueros para la realización de las técnicas inmunológicas.

6.2.2. Infección, tratamiento y sacrificio de animales

Los murinos fueron pesados y se tomó su talla, además de que se tomaron muestras sanguíneas, se administró carne infectada con 500 LI, para la fase digestiva pasaron 6 días desde el día de la infección, para comenzar los tratamientos de 7.5mg y 15mg por kilogramo de peso al día de ABZ y 1 y dos dosis de IVM de 200 µg/kg, se sacrificaron a los 28 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.

6.2.3. Técnica de Bólas Fernandez

Al séptimo día de infección se extrae el Intestino delgado de cada rata para recolectar hembras y machos adultos. El intestino delgado se corta desde el píloro hasta el ciego, abriendo longitudinalmente en su totalidad. Se cortaron porciones de 7-10 cm, aproximadamente, colocando trozos en una gasa y depositando el envoltorio en un tubo cónico con solución de PBS, la solución está siempre cubriendo los trozos perfectamente y se incuban a 37° centígrados durante 3 horas, posteriormente se decanta el sedimento, se coloca en una caja de petri y se observa a 1 microscopio óptico analizando los diferentes campos para identificar hembras y machos adultos (Bólas-Fernandez, 2002).

6.2.4. Técnica de Compresión de placa

Se utilizaron aproximadamente 50mg de tejido de masetero, diafragma y pierna, cada muestra se colocó entre dos laminillas y se comprimieron, ocupando un área de 1x5mm, se observó al microscopio óptico, con el lente de 10x, para poder observar los cambios morfológicos de la larva (Fragoso et. al., 1981).

6.2.5. Técnica de digestión artificial

Se utilizaron muestras de 30gr de tejido (masetero, lengua, intercostales, diafragma y pierna), se incubaron a 37°C en un tamiz de tile m forma de saco, suspendido en una solución al 0.3% de pepsina y HCL al 37% en 500ml de agua destilada, dentro de un embudo de separación; transcurridas 24h se procedió a separar el paquete larvario con las LI, que se depositaron en el fondo del embudo, se observaron en cámara de newbawer al microscopio óptico con lente 10x, y se cuantificó el paquete (Del Río et. al., 1986).

6.2.6. Obtención de Antígeno soluble Total

Se obtuvieron los diferentes músculos de 2 ratas infectadas, las cuales se incubaron a 37° C por 24 horas según el método descrito por Del Río et al en 1986, en donde se colocaron (aproximadamente) 60g. de tejido en un tamiz de tul, en forma de saco; en suspensión de una solución al 0.03 % de pepsina (10,000 U) y HCl al 37 % (0.2M) en un litro de agua destilada en un embudo de separación; después de 24 horas se procedió a separar las LI que se depositaron en el fondo del embudo, las cuales, después de varios lavados con solución básica de fosfatos (PBS), se desengrasaron con acetona absoluta a evaporación y se mantuvieron en PBS, luego se sonicaron con la finalidad de romper cutícula y vaciar el contenido antigénico de las LI, se centrifugaron a 3500 rpm por 1.5 horas, el sobrenadante fue el antígeno soluble total (AST) mismo que se usó como antígeno para las diferentes pruebas en el modelo experimental con los sueros problema.

6.2.7. Extracción con nitrógeno líquido del antígeno total de T. spiralis

Este se obtiene por medio de la extracción con nitrógeno líquido, según Andiva et al 2000, modificada se extrajeron las larvas por medio de la técnica de digestión artificial (Del Río et al., 1986), las LI depositadas en el embudo de separación se lavaran con PBS para retirar excesos de la solución artificial de jugos gástricos, se añadió el Nitrógeno líquido en cantidad suficiente para cubrir las LI y por estallamiento se permitió la salida de

los componentes antigénicos, se centrifugó a 3500 rpm por 1.5 hrs. El sobrenadante fue el antígeno y se usó en diferentes pruebas.

6.2.8. Determinación de proteínas

Se obtuvo una curva estándar usando albúmina sérica bovina, ajustando la concentración de proteínas obtenidas a una densidad óptica de 610 nm mediante azul de Coomassie al 0.06 % preparado en HCl al 2.2 %. Se interpoló el valor de la densidad óptica del antígeno, a la de la curva estándar de albúmina, se obtuvo la concentración de proteínas contenidas en los dos tipos de extracto antigénico (Bradford, 1976).

6.2.9. Tinción con Hematoxilina-Eosina

El tejido se conservó en formol al 10% para cortes histológicos, con el fin de determinar las características por una tinción de Hematoxilina-Eosina (HE) (Manual of Histology, 1957). Los tejidos se deshidrataron para procesarlos en parafina, esto se llevó a cabo en un procesador de tejidos (Lipshaw Automatic Tissue Processor) de la siguiente manera:

El tejido permaneció en formol al 10 % por 12 horas y en alcohol etílico al 80% por 1 hora, luego alcohol etílico del 96%, realizando 3 cambios de 30 min. y alcohol etílico absoluto, 3 cambios cada hora y media, luego Xileno, 2 cambios cada 1.5 horas y, finalmente, parafina a 60 °C, en 2 cambios cada hora y media y al final fueron colocados los tejidos en moldes cúbicos hasta enfriar.

Después de 24 horas, se colocaron en cama de hielo para efectuar los cortes, con un espesor de 4 μ (Micrótomo modelo 820 Rotary, American Optical), posteriormente se colocaron en un portaobjetos, cubriéndolos luego con un gel a base de clara de huevo y glicerol en dilución 1:1, más unos granos de Tibol como conservador, los cortes se colocaron en placa caliente para fundir la parafina y continuar con la tinción con H-E como se describe en el Manual of Histology, 1957.

El proceso de tinción se llevó a cabo en un tren de tinción: los portaobjetos se colocaron en una canastilla que fue introducida en las siguientes soluciones: Xileno, 5 min;

alcohol etílico absoluto, 3 min.; alcohol etílico al 96%, 3 min.; alcohol etílico del 96% 3 min.; agua destilada (de manera rápida); Hematoxilina de Harris (por unos segundos) agua potable, alcohol ácido al 1 % (de manera rápida) agua potable; solución saturada de carbonato de litio, 2 min.; agua potable-Eosina (por unos segundos); agua potable, dos cambios en alcohol etílico al 96 %; 3 cambios en alcohol etílico absoluto, Xileno (todos los pasos anteriores son de 1min.) fueron montados con resina sintética Sigma ® y se cubrirán con un portaobjetos quedando listas para su observación al microscopio óptico a 40 y 100X.

6.2.10. Microinmunodifusión doble (MIDD)

Para la microinmunodifusión doble se elaboro un gel de agar al 1 % en agua destilada con azida de sodio, para evitar contaminación; se coloco en una cantidad de 4.5 mL a 55°C sobre una laminilla de vidrio, una vez en forma sólida, se procedió a formar la roseta con un horador, procurando una equidistancia de 0.5 cm entre pozo y pozo; la confrontación se realizo colocando siempre el antígeno en una cantidad de 20 µL (18 µg) en el centro y, en torno a éste, un suero de reactividad conocida, (en la misma proporción en volumen sin diluir), se dejo a temperatura ambiente en cámara húmeda de 24 a 48 horas, hasta observar líneas de precipitación entre el suero positivo y el antígeno; luego se procedio a teñir el gel con azul brillante de Coomassie G 250, en un 25 % en volumen (Ouchterlony, 1958).

6.2.11. Corrimiento electroforético en Geles de Poliacrilamida (EGPA)

Se realizó el corrimiento electroforetico, para esta técnica se usaron geles de 8x 10 cm, preparados con dodesil sulfato de sodio (SDS), en condiciones reductoras según lo propuesto por Laemmil en 1970, con una concentración al 11% del gel separador y del 4% en el concentrador.

A cada carril se le colocaron 40 µL del antígeno, equivalente a una concentración de 36 µg de proteína; la cual fue preparada por ebullición por 5 min. en una solución reductora

de Tris - HCl 1 M pH de 6.8; glicerol; DSS al 2%; azul de bromofenol al 0.5%, etilen diamin tetra acético (EDTA); agua (H₂O); di- tiotreitól 5 Mm y 2-β -mercaptoetanol al 5%.

El corrimiento se realizó en una cámara de Protean II xi Cell (Bio- Rad), por espacio de dos horas, usando 100 miliamperes por gel. Se continuó con la tinción de uno de los geles con el colorante azul de Coomassie G- 250 y su secado en membranas de celofán.

Se usaron los siguientes marcadores de pesos moleculares: Fosforilasa (97 kDa), Albúmina sérica bovina (68 kDa), Ovo albúmina (43 kDa), Anhidrasa carbónica (24 kDa) y Lisosima (14 kDa); el gel restante se usó para transferencia a papel de nitrocelulosa (NC) (Towbin, 1979).

6.2.12. Inmunoelectrotransferencia (IET)

El producto que se obtuvo del corrimiento en gel de poliacrilamida se transfirió a papel de NC, de acuerdo a lo descrito por (Towbin and Sthanlin, 1979), utilizando la cámara de Transblot- Cell (Bio-Rad)® a 35 voltios, durante toda la noche a 4°C.

El papel de NC fue teñido con fast green (verde rápido) por 5 min. con agitación constante, se retiró el colorante y se decoloró en agua destilada, para verificar transferencia de las proteínas, se dejó secar y se cortaron las tiras del ancho aproximado de cada carril (0.5 cm).

Transcurrido lo anterior, se procedió a cubrir cada tira con una solución de PBS- leche en polvo al 3% y azida de sodio al 0.15% a 4°C, con agitación constante por toda la noche. Enseguida se lavó 3 veces por 10 min. con PBS, se continuó con la incubación por 1.5 h. con los sueros de las ratas en una dilución de 1:100 en PBS- leche en polvo al 3% a 37°C con agitación constante, posteriormente se lavó en dos ocasiones con PBS- Tween 20 al 0.3% por 10 min. y tres más con PBS otros 10 min. A continuación se incubó con el segundo anticuerpo Anti-IgG de ratón, conjugado con peroxidasa 1: 2000 PBS- leche en polvo al 3% por 1 h., a temperatura ambiente, con agitación, después se lavó 2 veces con PBS- Tween 20 al 3% y se enjuagó con PBS, por 10 min.

El patrón de Bando de cada tira se reveló con 3,3´ di amino – benzidina (DAB), 50 mg en 100 mL de PBS, usando, como sustrato, peróxido de hidrógeno al 37 %.

6.2.13. Intro dermorreacción (IDR)

Se aplicó la sustancia a evaluar intradérmica con jeringa de insulina de 100 unidades, 10 µg de proteína y se analizó la zona de observación a las 2, 24 y 48 horas y se evaluó la triple respuesta de Lewis Crubor, calor e induración (Moreno, 1994).

6.2.14. Triple respuesta de Lewis

Donde se evalúa:

- Eritema central
- Hinchazón
- Eritema periférico

6.2.15. Biopsia

Extracción de una muestra de tejido obtenida por medio de métodos cruentos para examinarla al microscopio.

6.2.16. Modelo Estadístico

El modelo lineal estadístico fue un diseño experimental completamente al azar, los factores bajo estudio serán: Factor A: técnica, que tendrá 2 niveles (1)- Digestión artificial (2)- Observación en Compresión de tejido, Y el factor B: infección con 12 niveles a ensayar : a)- ratas control sano (CS), b)-ratas control infectado (CI), c) ratas infectadas y tratadas (Tx) con ABZ a 7.5 mg/kg (FI), d) ratas infectadas y tratadas (Tx) a 15mg/kg (FI) e)- ratas infectadas y Tx IVM a 1 dosis de 200 µg/kg (FI), f)- ratas infectadas y Tx IVM 2 dosis de 200 µg/kg (FI), h) ratas infectadas y tratadas (Tx) con ABZ a 7.5 mg/kg (FM), i) ratas infectadas y tratadas (Tx) con ABZ a 15mg/kg (FM) j)- ratas infectadas y Tx IVM a 1 dosis de 200 µg/kg (FM), k)- ratas infectadas y Tx IVM 2 dosis de 200 µg/kg (FM), l)- ratas infectadas, resultando 24 tratamientos por ensayar.

El modelo lineal asociado al diseño de tratamientos expuesto, será de la siguiente forma:

$$Y_{ijk} = M + \Delta_i(\gamma_k) + \beta_j(\gamma_k) + \Delta_i\beta_j(\gamma_k) + \xi_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Valor observado en la k-esima repetición, del j-ésimo nivel del factor B (infección) para el i-ésimo nivel del factor A (técnica).

M = Media general de todo experimento.

Δ_i = Efecto del i-ésimo nivel del factor A

β_j = Efecto del j-ésimo nivel del factor B

γ_k = Efecto de la k-ésima especie

$\Delta_i\beta_j$ = Efecto de la interacción entre el j-ésimo nivel del factor B con el i-ésimo nivel del factor A.

ξ_{ijk} = Error aleatorio asociado a la k-ésima repetición del j-ésimo nivel del factor B con el i-ésimo nivel del factor A

7. RESULTADOS

En el presente estudio se analizaron un total de 120 murinos de la raza Long Evans, tanto hembras como machos, de los cuales se dividieron en grupos, para control sano, control infectado, infectados y tratados con dos dosis Ivermectina e infectados y tratados con diferentes dosis de Albendazol.

Talla y Peso

Todos los grupos de animales fueron pesados: antes de la infección, durante el tratamiento y antes del sacrificio, para ver las diferencias que estos presentaban en el proceso.

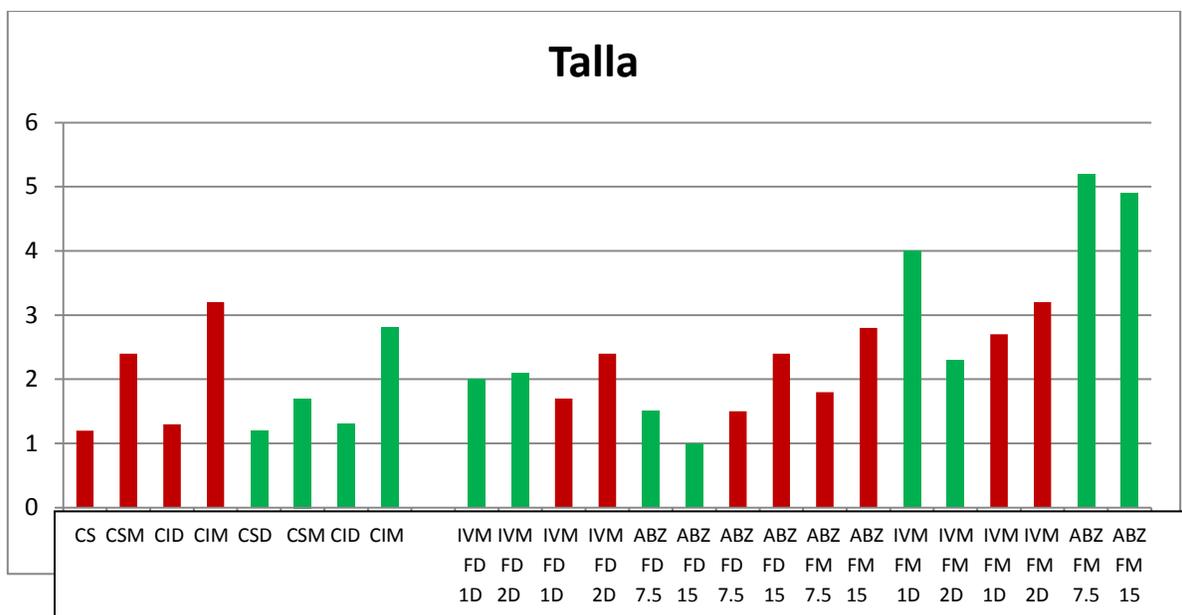


Figura No. 1.- Gráfica de aumento de talla, a lo largo del experimento, de cada uno de los grupos.

Como se puede observar en la figura No. 1, los grupos de control sano y control infectado en fase digestiva tanto en hembras como machos, hubo un aumento de talla proporcional ya que el tiempo al sacrificio fue el mismo (6 días) tiempo que dura la fase digestiva en el cuadro clínico. En los grupos con tratamientos, tanto con una dosis y dos dosis de ivermectina en fase digestiva hembras y machos no se observó un aumento de talla significativa, mientras que en las tratadas en fase muscular hubo un incremento ligeramente mayor en los machos con una dosis. Los murinos infectados y tratados con Albendazol en fase digestiva presentaron un mayor crecimiento las hembras tratadas con 7.5mg y aún más las tratadas con 25mg, los que fueron tratados en fase muscular presentaron los machos un mayor incremento tanto en las tratadas con 7.5 y 15mg.

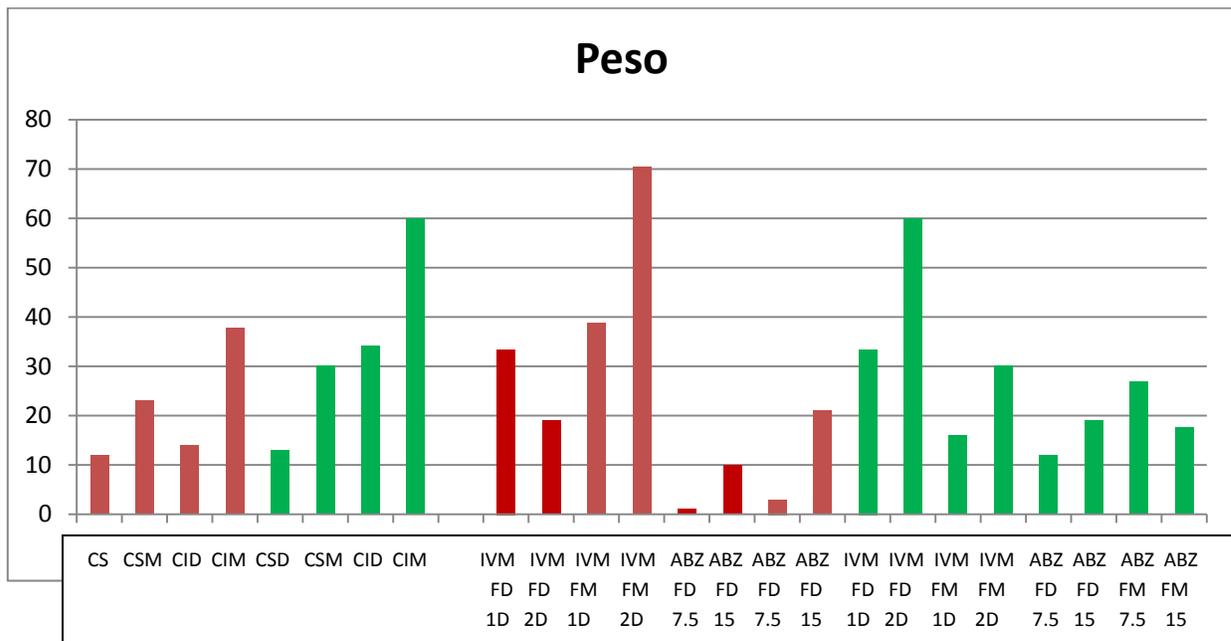


Figura No. 2.- Gráfica de aumento de peso, a lo largo del experimento, de cada uno de los grupos.

En cuanto al aumento de peso en los grupos de control sano en hembras y machos en fase digestiva se observó un aumento similar, característico del tiempo de infección, mientras que en la fase muscular solo en los machos se presentó un aumento de más de 20 gramos a diferencia de las hembras. 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 pudimos observar que solo el grupo de hembras tratadas con 7.5mg de ABZ no presentaron diferencia en el aumento de peso. En los grupos tratados en fase muscular con IVM de una y dos dosis, el grupo de hembras fueron las que presentaron un mayor aumento de peso, hasta 30 gramos más que en los diferentes grupos tratados. Mientras los tratados con ABZ tanto con 7.5mg como con 15 mg en fase muscular también presentaron un aumento estable.

Bólas Fernandez

En el análisis realizado a los animales de los grupos de control infectado en fase digestiva por medio de la técnica de bolas Fernández, se pudo observar la presencia de parásitos en fase adulta, tanto hembras como machos, lo que comprueba el desarrollo ciclo de la enfermedad.



Figura No. 3 y 4.- Larvas infectantes hembras, obtenidas de fase digestiva por la técnica de Bólas Fernandez

Técnica de Compresión de Tejido:

Mediante esta técnica pudimos observar a través de los tejidos de diafragma, pierna y masetero si las muestras sufrieron alguna aparente alteración.

Hembras:



Figura No. 5.- Músculo masetero de grupo control
Infectado, objetivo 10x



Figura No. 6.- Músculo masetero de murino infectado y tratado con 1 dosis de IVM en fase digestiva. Objetivo 10x.



Figura No. 7.- Músculo de murino infectado y tratado con 2 dosis de IVM en fase digestiva. Objetivo 10x



Figura No. 8.- Corte de masetero de rata infectada y tratada con 7.5mg de ABZ en fase digestiva, objetivo 10x.



Figura No.9.- Corte masetero de rata infectada y tratada con 15mg de ABZ en fase digestiva, objetivo 10x.



Figura No. 10.- Músculo de ratas tratadas con 1 dosis de IVM tratadas en fase muscular, objetivo 10x.



Figura No. 11.- Músculo de ratas tratadas con 2 dosis de IVM tratadas en fase muscular, objetivo 10x.



Figura No.12.- Corte de músculo de rata hembra tratada con 7.5mg de ABZ en fase muscular, objetivo 10x.



Figura 13.- Corte de músculo de rata hembra tratada con 15mg de de ABZ en fase muscular, objetivo 10x.

En la figura No. 5, podemos observar como la larva de nuestra muestra infectada sin tratamiento presenta su forma típica en espiral, con su capsula de colágena bien definida, a diferencia de la imagen no. 7, en la cual se puede observar una larva más alargada y con la presencia de puntilleo en la colágena, lo cual se podría presumir de alteración por el fármaco.

Podemos observar en los grupos tratados con 7.5mg de ABZ en fase digestiva tanto en hembras como machos como se puede observar el aspecto negruzco tanto en la célula nodriza como en la larva (figura no. 8 y 17). Mientras que en los tratados con 15mg de ABZ se puede observar un puntilleo negruzco en la colágena que envuelve la larva de *T. spiralis*.

Los grupos tratados con Albendazol en fase muscular también muestran una marcada afección en la colágena de la larva, como se puede observar en la figura no. 11, que la colágena no está bien delimitada, además que se puede observar un puntilleo negruzco en uno de los polos, mientras que en la figura no. 12, tratada con 15mg de ABZ se puede observar la larva con el aspecto negruzco y la colágena sin su forma fenotípicamente característica.

En los animales tratados con IVM en fase muscular, también se logra apreciar una alteración en la larva, así como en la colágena, presumiéndose una posible necrosis.

Gracias a esta técnica podemos deducir como en las muestras control infectado se puede observar la larva, junto con su colágena bien formada, para así poder compararla con los diferentes grupos tratados, en los cuales pudimos observar que las ratas tratadas con una y dos dosis de ivermectina tanto hembras como machos, presentaron un menor cambio en la colágena, solo un pequeño puntilleo, mientras que en las demás muestras tratadas con ABZ en fase digestiva y muscular, así como las tratadas con IVM en fase muscular, si presentaron grandes cambios en la estructura.

Machos:

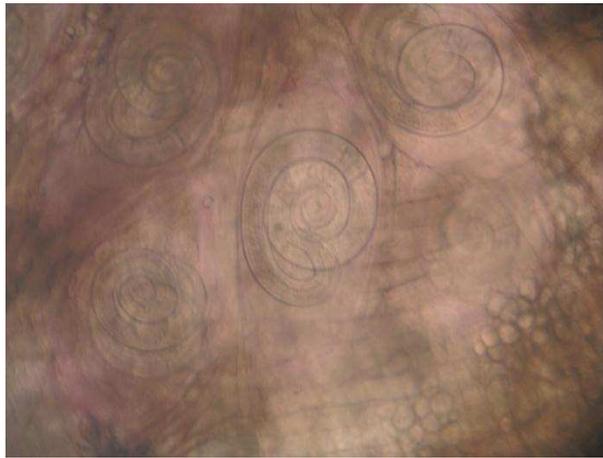


Figura No. 14.- Muestra por la técnica de compresión de tejido en ratas machos Control infectado. Objetivo 10x



Figura No. 15.- Músculo de rata macho infectada con *T. spiralis* y tratada con 1 dosis de IVM en fase digestiva. Objetivo 10x.



Figura No. 16.- Músculo de rata macho infectada con *T. spiralis* y tratada con 2 dosis de IVM en fase digestiva. objetivo 10x.



Figura No. 17.- Corte de masetero de rata macho infectada



Figura No.18.- Corte masetero de rata macho infectada y

y tratada con 7.5mg de ABZ en fase digestiva, objetivo 10x.



Figura No. 19.- Músculo de ratas tratadas con 1 dosis de IVM tratadas en fase muscular, objetivo 10x.

tratada con 15mg de ABZ en fase digestiva, objetivo 10x.

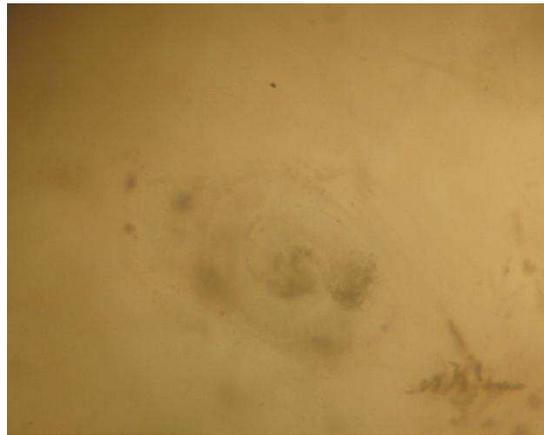


Figura No. 20.- Músculo de ratas tratadas con 2 dosis de IVM tratadas en fase muscular, objetivo 10x.



Figura No. 21.- Músculo de rata macho infectada con T. spiralis y tratada con 7.5mg de ABZ en fase muscular objetivo 10x.

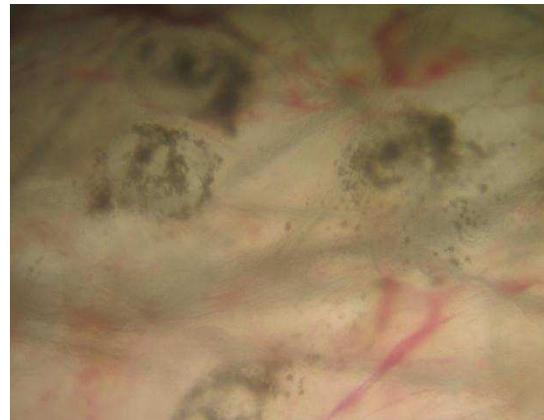


Figura No. 22.- Músculo de rata macho infectada con T. spiralis y tratadas con 15mg de ABZ en fase muscular objetivo 10x.

Técnica de Digestión Artificial:

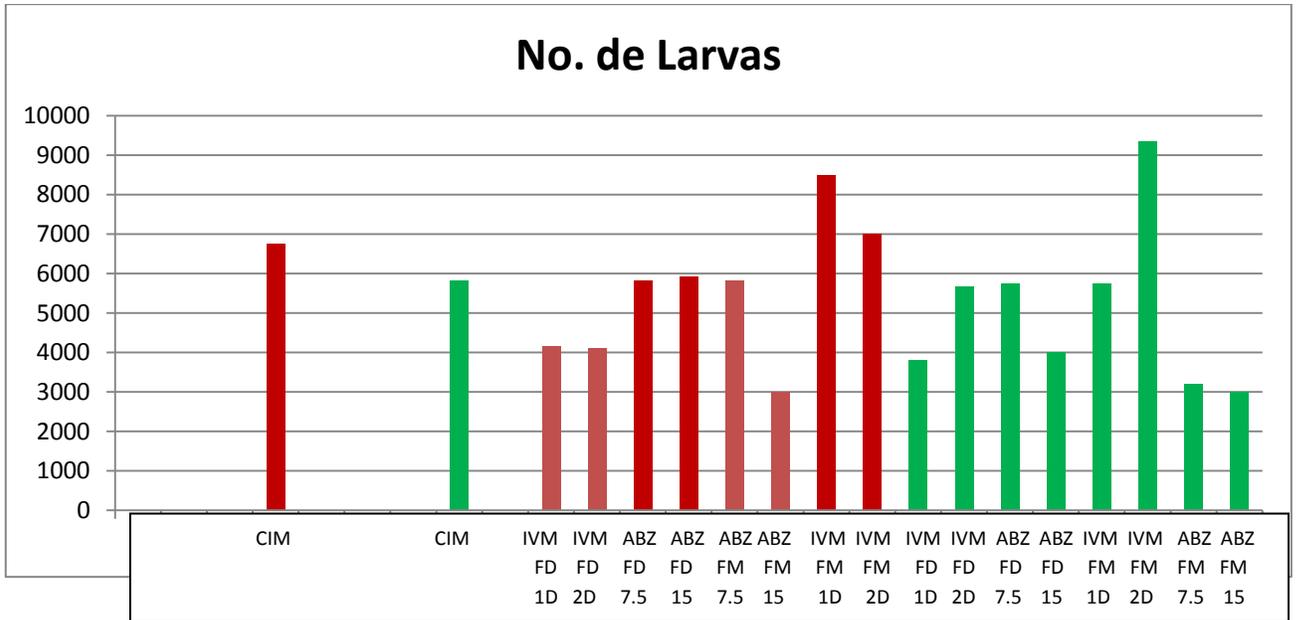


Figura No. 23.- Gráfica de total de larvas obtenidas por el método de digestión artificial, de cada uno de los grupos.

Por medio de la técnica de digestión artificial se pudieron obtener las larvas infectantes de cada grupo, con el objetivo de obtener el número de estas y la gravedad de infestación de las ratas, para observar así la efectividad de cada uno de los tratamientos dados. En los grupos control infectados se observó un contenido promedio de larvas infectantes de 6800 larvas en hembras, mientras que en los machos 5900 siendo una carga alta. En los grupos tratados con 2 dosis de IVM en fase digestiva machos, 7.5mg de ABZ en machos en fase digestiva, las hembras tratadas con 7.5mg y 15mg de ABZ en fase digestiva, 7.5mg en fase muscular en el grupo de hembras y 1 dosis de IVM en fase muscular no hubo cambio alguno respecto al control infectado, teniéndose en estos grupos un promedio de 5800 larvas infectantes. Presentándose una disminución del número de larvas solo en los grupos tratados con 15mg de ABZ en fase muscular en hembras, y los machos tratados con 7.5 mg y 15 mg de ABZ en fase muscular.

En las figuras no. 24 y 25 podemos observar la gran cantidad de larvas infectantes de los grupos controles en fase muscular así como su estructura bien definida y en su forma fenotípica, en espiral, características de la larva.



Figura No. 24.- Larvas infectantes de *T. spiralis* de control infectado gpo. 4, hembras, fase muscular. Objetivo 10x.

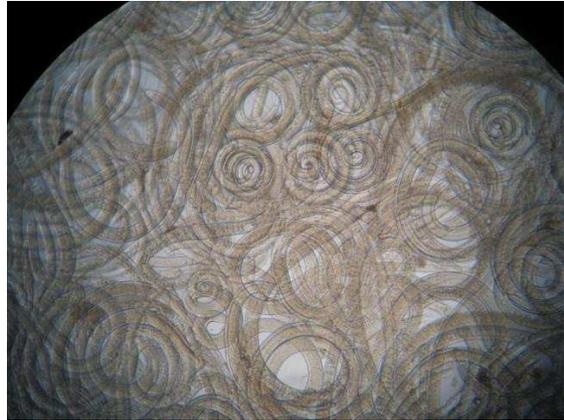


Figura No. 25.- Larvas infectantes de *T. spiralis* de control infectado gpo. 8, macho, fase muscular. objetivo 10x.



Figura No. 26.- Larva infectante obtenida por DA de murino macho infectado con *T. spiralis* y tratadas con 1 dosis de IVM en fase digestiva. Objetivo 10x.



Figura No. 27.- Larva infectante obtenida por DA de murino hembra infectado con *T. spiralis* y tratadas con 2 dosis de IVM en fase digestiva. Objetivo 10x



Figura No. 28.- Larva infectante obtenida por DA de murinos tratados con 7.5mg de ABZ en fase digestiva. Objetivo 10x.



Figura No. 29.- Larva infectante obtenida por DA de murinos tratados con 15mg de ABZ en fase digestiva. objetivo 10x.

En las figuras no. 28 y 29, se puede observar como larvas obtenidas por medio de la técnica de digestión artificial, tienen una apariencia desenrolladla, afectada y fragmentada, a pesar de que este grupo tratado con 7.5mg de ABZ en fase digestiva muestra un alto número de larvas (en promedio 5800 larvas), y podría pensarse que no hubo algún efecto, vemos lar larvas con daño. Así como las tratadas con 15mg de ABZ en fase digestiva, machos donde si hubo una disminución de larvas (4000), además de presentarse al igual que en las tratadas con 7.5mg de ABZ, daño en la composición de la larva, presentándose fragmentadas y sin la forma característica (enrollada).



Figura No. 30.- Larvas infectantes de murinos tratados con 1 dosis de IVM en fase muscular. Objetivo 10x.



Figura No. 31.- Larvas infectantes de murinos tratados con 2 dosis de IVM en fase muscular. Objetivo 10x.



Figura No.32.- Larvas infectantes de *T. spiralis* de rata hembra tratadas con 7.5mg de ABZ, en fase muscular. Objetivo 10x.



Figura No.33.- Larvas de *T. spiralis* de rata macho tratadas con 15mg de ABZ, en fase muscular. objetivo 10x.

En la figura no. 32, de ratas hembras tratadas con 7.5mg de ABZ en fase muscular se puede observar cómo se encuentra dañada desde el área esticosomal, así como parte del intestino y el primordio genital, fragmentada y en proceso de una presumible degradación, sin alterar la cutícula del parásito.

Intradermorreacción:

Se realizó la técnica de intradermorreacción con el fin de evaluar la hipersensibilidad de cada uno de los grupos, tanto control sano, control infectado y los tratados con diferentes fármacos y dosis.

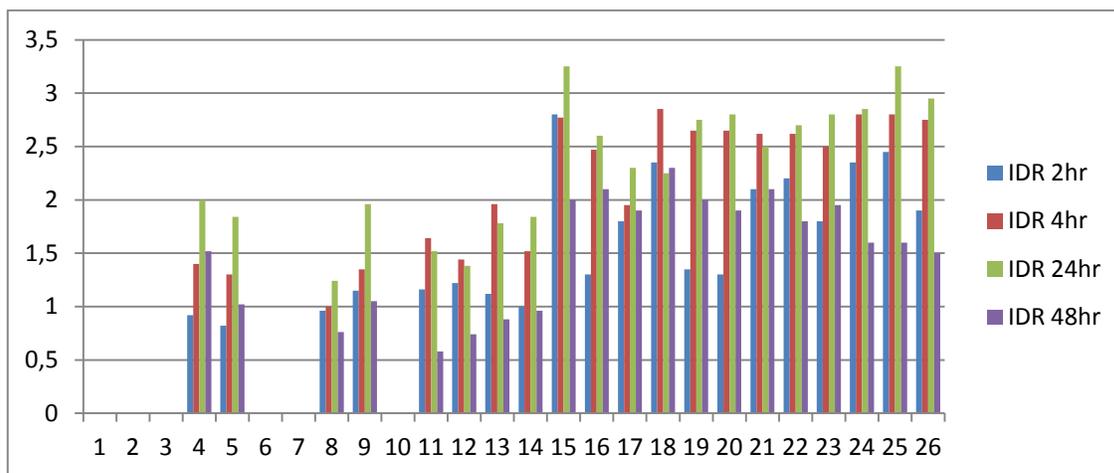


Figura No. 34.- Tabla induración en la aplicación del antígeno, presentado en cada uno de los grupos a las 2, 4, 24 y 48hr.

Podemos observar en las reacciones que se presentaron en los grupos controles infectados como en la fase digestiva y muscular en hembras, que hubo un mayor crecimiento del edema a las 24 horas, siendo menos presente a las 2hr, a diferencia de los machos que disminuyeron su reacción a las 49 horas.

En los grupos experimentales se pudo observar una menor reacción de hipersensibilidad a los diferentes tiempos, en los tratados con 1 y 2 dosis de IVM en fase digestiva, mostrando el mismo patrón tanto en hembras como machos, presentando el mayor pico a las 4hr, mostrando un edema promedio de 1.5cm y disminuyendo notablemente a las 48 hr, hasta un promedio de 0.8cm.



Figura No. 35.- IDR realizada a un murino del grupo control Sano a las 24hr sin ninguna reacción aparente.



Figura No. 36.- IDR en murino control infectado en fase muscular a las 24hr.



Figura No. 37.- IDR en rata infectada macho con *T. spiralis* y tratada con 1 dosis IVM en fase digestiva, a las 2hr de administrarse el Ag.



Figura No.38.- IDR realizada en hembra, infectada con *T. spiralis* y tratada con 2 dosis IVM en fase digestiva, a las 4hr de administrarse el Ag.



Figura No. 39.- IDR en murino tratado con 7.5mg de ABZ en fase digestiva a las 4hr de administrarse el AG.



Figura No. 40.- IDR a las 24 hr de murino hembra tratada con 15mg de ABZ en fase digestiva.



Figura No. 41.- IDR a las 24hr de murino tratado con 1 dosis de IVM en fase muscular.



Figura No. 42.- IDR en murino tratado con 2 dosis de IVM a las 24hr en fase muscular.

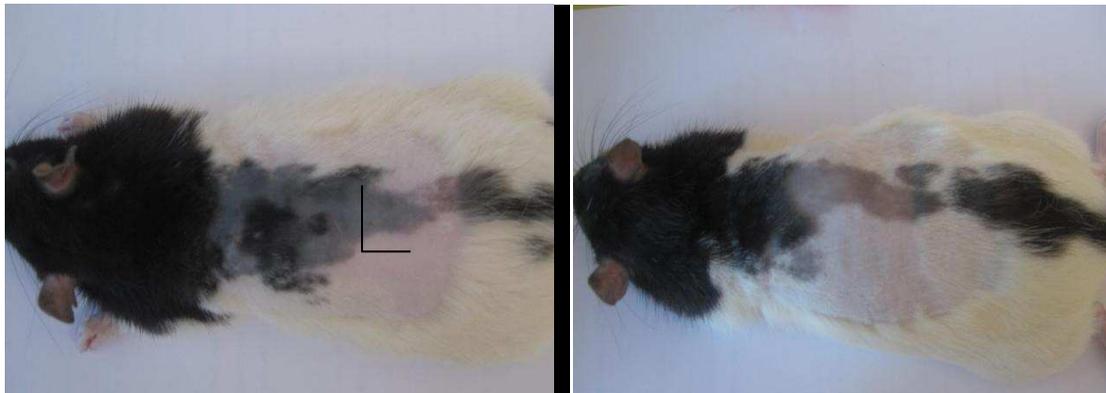


Figura No. 43.- IDR rata 2 hembra, tratada con 7.5mg de ABZ en fase muscular, a las 48hr de haber aplicado el antígeno

Figura No. 44.- IDR rata macho, tratada con 25mg de ABZ en fase muscular, a las 24hr de aplicación del Ag.

En la figura No. 35, podemos observar en la IDR realizada en una rata dentro del grupo control sano, la administración de los 10 μ g de la proteína de *T. spiralis* no causo ninguna reacción de la triple respuesta de Lewis, a comparación de la figura No. 36, IDR a un murino del grupo control infectado donde podemos observar a las 24hr de la administración del antígeno, se produjo un edema de 2cm.

Los murinos machos tratados con 7.5mg de ABZ en fase digestiva (figura No. 39), es uno de los grupos que presenta mayor respuesta inmunológica, al presentar un edema de hasta 3.2cm a las 24hr, al igual que los tratados con la misma dosis pero en fase muscular. En los grupos tratados con ABZ en fase digestiva se puede observar un patrón característico, donde la reacción mínima se da ya a las 48 hrs, presentándose a las 2hr un promedio de 2.5cm en el tamaño del edema, no presentando rubor en el área.

Los grupos que presentaron una mayor reacción en sus diferentes tiempos, fueron los tratados con IVM de una y dos dosis en fase muscular (figura No. 41 de una dosis de IVM y figura No. 42 de dos dosis de IVM), presentando en promedio a las 2hr un edema de 2.1, no aumentando mucho a las 4hr a 2.6 y manteniéndose a las 24h, siendo el menor tamaño a las 48h de 1.8cm.

Microinmunodifusión:

Por medio de esta técnica inmunológica pudimos observar la interacción antígeno-anticuerpo de las muestras de los diferentes grupos, controles sanos, controles infectados y los diferentes tratamientos utilizados, con las diferentes dosis, administrados tanto en fase digestiva como muscular.

Grupo	Tratamiento	Interacción Ag-Ac
1	Control sano, FD, ♀	-
2	Control sano, FM, ♀	-
3	Control infectado, FD, ♀	+
4	Control infectado, FM, ♀	+
5	Control sano, FD, ♂	-
6	Control sano, FM, ♂	-
7	Control infectado, FM, ♂	+
8	Control infectado, FM, ♂	+
10	1 dosis IVM, FD, ♂	+
11	2 dosis IVM, FD, ♂	+
12	1 dosis IVM, FD, ♀	+
13	2 dosis IVM, FD, ♀	+
14	7.5mg ABZ, FD, ♂	+
15	15mg ABZ, FD, ♂	+
16	7.5mg ABZ, FD, ♀	+
17	15mg ABZ, FD, ♀	+
18	7.5mg ABZ, FM, ♀	+
19	15mg ABZ, FM, ♀	+
20	1 dosis IVM, FM, ♂	+
21	2 dosis IVM, FM, ♂	+
22	1 dosis IVM, FM, ♀	+
23	2 dosis IVM, FM, ♀	+
24	7.5mg ABZ, FM, ♂	+
25	15mg ABZ, FM, ♂	+

Figura No.45.- Tabla de resultados obtenidos por la técnica de Microinmunodifusión doble, de cada uno de los grupos analizados.



Figura No. 46.- MIID realizada a los grupos Control sano, en fase digestiva (1) y fase muscular (2).<<a

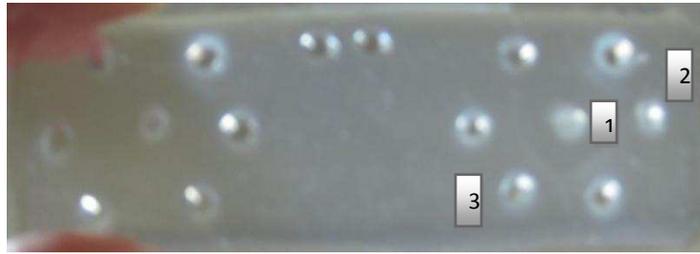


Figura No. 47.- MIID realizada a control sano (1) y control infectado (2) en fase Digestiva y (3) en fase muscular.

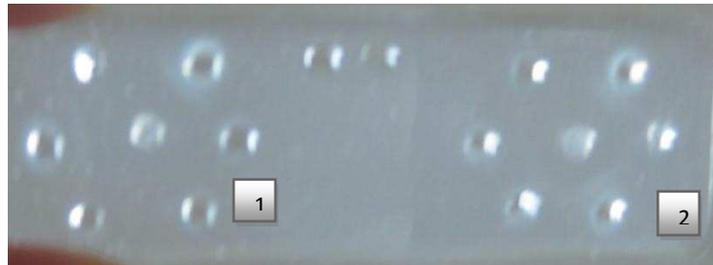


Figura No. 48.- MIID realizada en murinos infectados con *T. spiralis* y tratadas Con 1(1) y 2 (2) dosis de IVM en fase digestiva.

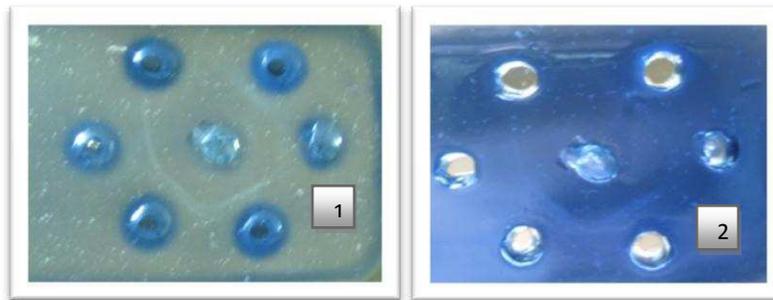


Figura No. 49 y 50.- MIID realizada de suero de murinos infectados con *T. spiralis* y tratados con 7.5 (1) y 15mg (2) de ABZ en fase digestiva.

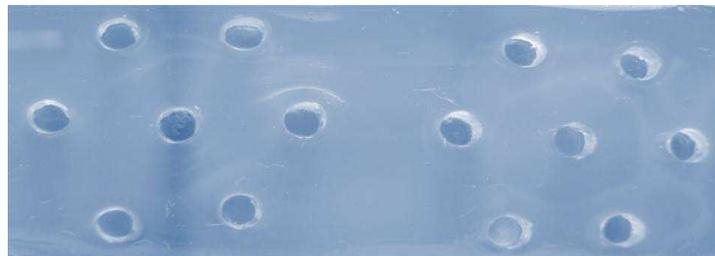


Figura No. 51.- MIID realizada en sueros de murinos infectados con *T. spiralis* y tratados con 7.5 y 15mg de ABZ en fase muscular.

Como podemos observar en la figura No. 46, se muestra que no hay interacción entre los pozos utilizados, siendo los del centro utilizado para el antígeno y los de la circunferencia para los diferentes grupos control, mientras que en la figura No. 47 se muestra una banda de interacción entre el antígeno que está en el pozo marcado con la numeración 1 y el suero problema del grupo control infectado en el pozo 2 para fase digestiva y el pozo 3 de fase muscular.

Al igual que en nuestros grupos infectados con *T. spiralis* y tratados con los diferentes tratamientos se muestra la interacción Ag-Ac, en los infectados y tratados con 1 dosis de IVM en fase digestiva (pozo 1 de la figura No. 48), 2 dosis IVM en fase digestiva (pozo 2 de la figura No. 48), tratados con 7.5mg de ABZ (pozo 1 figura No.49), con 15mg de ABZ (pozo 2 de la figura No. 50) en fase digestiva, al igual que nuestros grupos tratados en fase muscular, presentan la banda de precipitación en la interacción de Ag-Ac.

Inmunoelectrotransferencia:

En la figura No. 51 se pueden observar los carriles de papel de nitrocelulosa obtenidos por medio de nuestra técnica de inmunoelectrotransferencia, realizadas en los diferentes grupos, en el carril 20 se pudo observar que el grupo control infectado muestra el triplete característico de 42, 45 y 48 kDa, donde se puede observar claramente; así como en nuestros grupos controles mostrados en los carriles uno, tres y cuatro se observa el papel sin tinte que corresponde a nuestros controles sanos, hembras y machos, a los 6 días que correspondería a la fase digestiva en los controles infectados, así como a los 30 días que corresponde a la fase muscular.



Figura No.51.- Resultados obtenidos por la técnica de inmunoelectrotransferencia, Carriles 1,3 y 4 correspondientes a control sano, carril 20 correspondiente a control infectado.

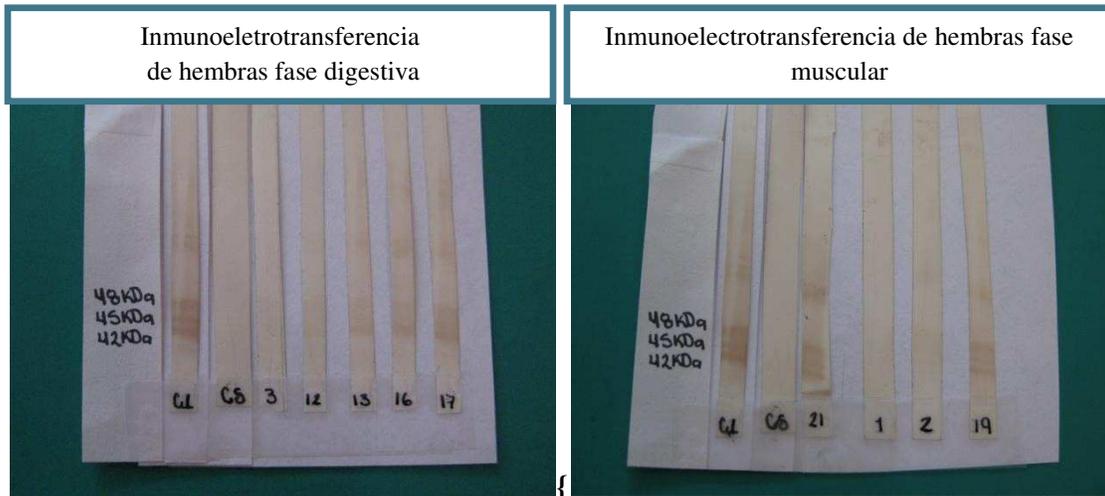


Figura No.52 y 53.- Resultados obtenidos por la técnica de inmunoelectrotransferencia en hembras tratadas con 7.5 y 15mg de ABZ, y 1 y dos dosis de IVM.

En la figura No. 52, se observa en la inmunoelectrotransferencia realizada a los grupos de hembras, en fase digestiva el triplete característico de 42, 45 y 48 kDa, más marcada la banda de control infectado (CI), no mostrándose en la banda de control sano

(CS), presentándose también en la banda número 12 (tratadas con 7.5 ABZ), 13 (tratadas con 15mg de ABZ), 16 (1 dosis de IVM) y 17 (2 dosis de IVM). En la figura No. 53 la inmunoelectrotransferencia realizada al grupo de hembras, tratadas con fase muscular, podemos observar el triplete en la banda 21 (tratados con 1 dosis de IVM), banda 1 (2 dosis de IVM), 2 (tratados con 7.5mg de ABZ) 19 (tratados con 15mg de ABZ).

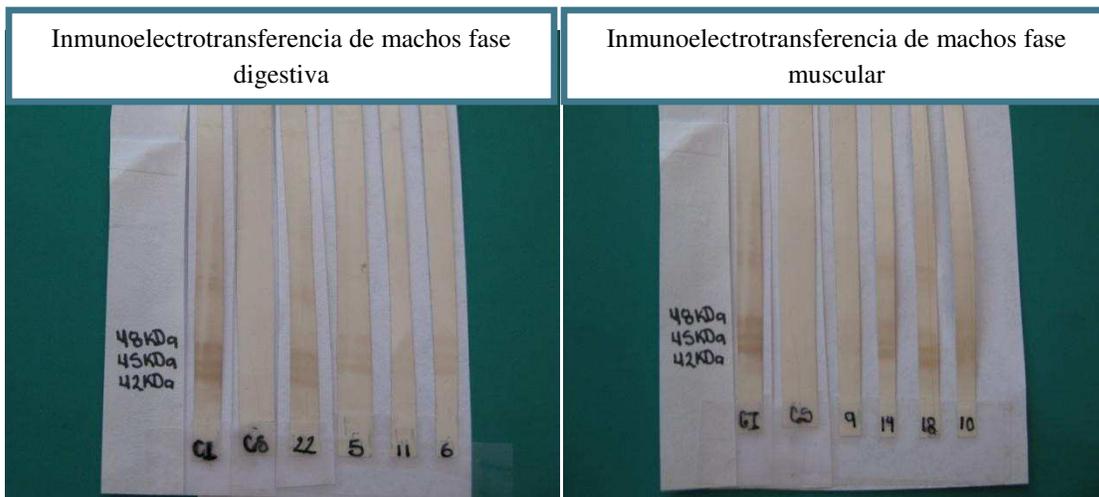


Figura No.54 y 55.- Resultados obtenidos por la técnica de inmunoelectrotransferencia en machos tratadas con 7.5 y 15mg de ABZ, y 1 y dos dosis de IVM.

En la figura No. 54, podemos observar la inmunoelectrotransferencia realizada a los machos infectados con *T. spiralis* y tratados en fase digestiva, en la banda 22 tratados con 1 dosis de IVM, la banda 5 tratados con 2 dosis de IVM, la banda 11 tratados con 7.5mg de ABZ y la 6 tratados con 15mg de ABZ, todos mostrando el triplete característico del parásito.

La inmunoelectrotransferencia realizada a machos tratados en fase muscular con 7.5mg de ABZ (banda 9), 15mg de ABZ (banda 14), 1 dosis de IVM (banda) y 2 dosis de IVM (banda 10) de la figura No. 55, muestra el triple de 42, 45 y 48 kDa.

Tinción con Hematoxilina-Eosina:

Por medio de la técnica de tinción de Hematoxilina-Eosina se pudo observar los cambios en la morfología del parásito implantado en tejido de murinos, tanto controles sanos así como los tratados con las diferentes dosis tanto de Albendazol como Ivermectina, podemos observar en nuestra muestra de control infectado (figura No. como no hay ninguna alteración del parásito, además de que tiene una buena implantación en las células musculares.

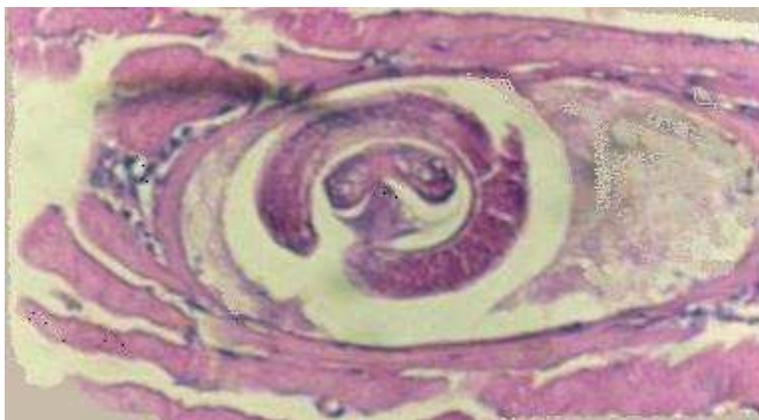


Figura No. 56.- Corte histológico de murino del grupo CI, por la técnica de Hematoxilina- Eosina, por microscopio óptico, objetivo 20x

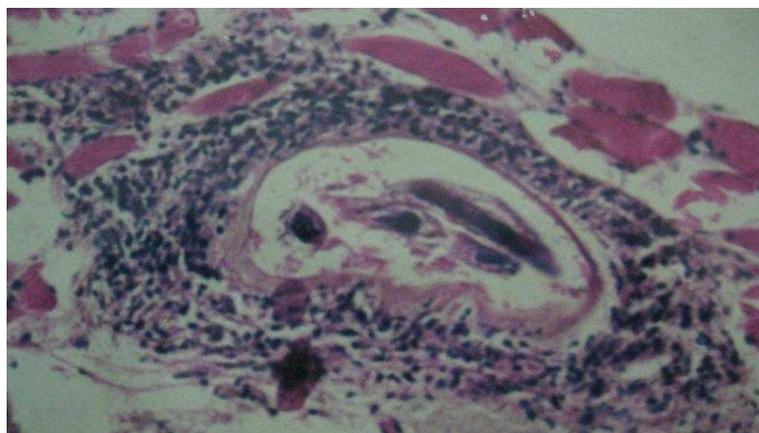


Figura No. 57.- Corte histológico de murino tratado con 2 dosis de IVM de 200µg/kg por medio de técnica Hematoxilina-Eosina, por Microscopio óptico, 20x

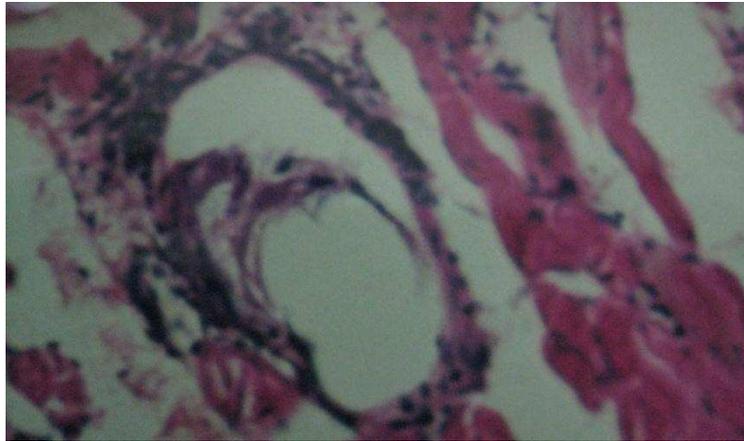


Figura No. 58.- Corte histológico de murino tratado con 7.5mg de ABZ, objetivo 20x

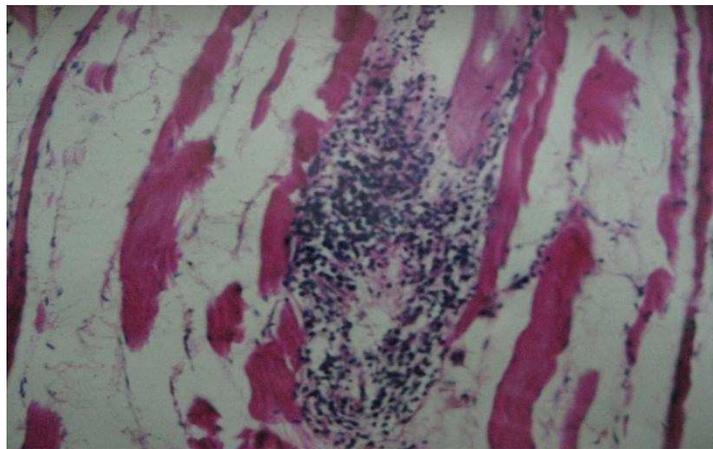


Figura No. 59.- Corte histológico de murino, tratado con 15mg de ABZ en fase muscular por la técnica de hematoxilina-eosina.

Los diferentes tratamientos a los que fueron sometidos nuestros murinos presentaron diferencias, como se puede observar en la figura no. 57, se puede observar un infiltrado polimorfonuclear en el sitio de implantación de la larva infectante más marcado que en la figura no. 56 de nuestro grupo control infectado.

Así como en la figura No. 58 del grupo tratado con ABZ en fase digestiva como hay al igual que en la figura no. 57 un gran infiltrado, pero en este se puede apreciar una posible necrosis del parásito, la figura no. 59, muestra a la célula en rearreglo de las fibras musculares.

Se realizó un análisis de varianza de los datos con el programa Stargraphics Centurion.

En el ANOVA simple teniendo como variable dependiente larvas y como factor, los grupos de tratamiento se realizaron 120 observaciones en 24 niveles.

En la figura No. 60, se puede observar que al analizar la recuperación de larvas que se realizó en cada grupo de tratamiento, presenta un valor de p menor a 0.05 mostrando que es estadísticamente significativo, con un nivel del 95.0% de confianza.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	8.63968E8	23	3.75638E7	13.66	0.0000
Intra grupos	2.63909E8	96	2.74906E6		
Total (Corr.)	1.12788E9	119			

Figura No. 60.- Tabla ANOVA para larvas por grupo

En la figura No.61.- Se puede observar la media o promedio de larvas recuperadas de los 24 tratamientos aplicados, puesto que el valor-P es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95.0% de confianza.

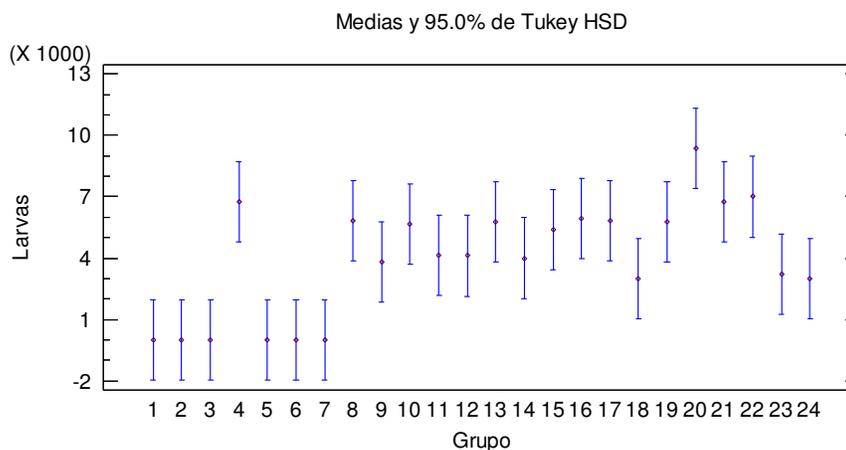


Figura No. 61.- Estadístico por medio Tukey de larvas y grupo

Se observa como los grupos 1 (♀CSFD), 2 (♀CSFM), 3(♀CIFD), 5(♂CSFD), 6(♂CSFM) y 7(♂CIFD), no presenta recuperación de larvas despues de la digestión artificial, destacan los grupos 24 (♂ABZ 15mg FM) y 18(♀ABZ 15mg FM) que

presentaron menor número de larvas recuperadas. El grupo que presentó mayor número de larvas, por tanto menor efecto farmacológico fueron las ratas del grupo 20 (♂IVM2DFM).

En la observación de la respuesta inmunológica de las intradermorreacciones que presentaron las ratas de los diferentes grupos de tratamiento, el ANOVA presenta un p -valor <0.05 , destacando que es estadísticamente significativo, se muestra un resumen estadístico a continuación. Se realizaron 120 observaciones para cada intradermorreacción por tiempo.

	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
IDR 2	120	1.33333	0.828011	62.1008%	0.0	3.1	3.1
IDR 4	120	1.78917	1.00827	56.3541%	0.0	3.1	3.1
IDR 24	120	1.93833	1.04906	54.122%	0.0	3.4	3.4
IDR 48	120	1.24917	0.76356	61.1256%	0.0	2.4	2.4
Total	480	1.5775	0.962769	61.0313%	0.0	3.4	3.4

Figura No. 62.- Resumen Estadístico

En la figura No. 62.- muestra varios estadísticos para cada una de las 4 columnas de datos. Para probar diferencias significativas entre las medias de las columnas.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	41.0908	3	13.6969	16.18	0.0000
Intra grupos	402.906	476	0.846442		
Total (Corr.)	443.997	479			

Figura No.63.- Tabla ANOVA entre grupos

En la figura No. 63.- se puede observar la tabla ANOVA que descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 16.1818, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 variables con un nivel del 95.0% de confianza.

La Prueba de Múltiple Rangos (Figura No.64) determina cuáles medias son significativamente diferentes de otras y muestra que las intradermorreacciones realizadas a

las 2 y 48 horas muestran respuestas similares considerándose como grupos homogéneos y las realizadas a las 4 y 24 horas son consideradas como grupos homogéneos.

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
IDR 48	120	1.24917	x
IDR 2	120	1.33333	x
IDR 4	120	1.78917	x
IDR 24	120	1.93833	x

Figura No. 64.- Prueba múltiple de rangos

Se realizó una prueba de contraste para determinar la diferencia estadística entre los grupos, según los tiempos en que se observó la respuesta de las intradermorreacciones, el signo (*), indica una diferencia significativa en el contraste de la respuesta.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
IDR 2 – IDR 4	*	-0.455833	0.306197
IDR 2 – IDR 24	*	-0.605	0.306197
IDR 2 – IDR 48		0.0841667	0.306197
IDR 4 – IDR 24		-0.149167	0.306197
IDR 4 - IDR 48	*	0.54	0.306197
IDR 24 - IDR 48	*	0.689167	0.306197

Figura No. 65.- Prueba de contraste

			Error Estandar.		
	Casos	Media	(s agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior
IDR 2	120	1.33333	0.0839862	1.18023	1.48643
IDR 4	120	1.78917	0.0839862	1.63607	1.94227
IDR 24	120	1.93833	0.0839862	1.78523	2.09143
IDR 48	120	1.24917	0.0839862	1.09607	1.40227
Total	480	1.5775			

Figura No. 66.- Tabla de Medias con intervalos de confianza del 95.0%

La figura No. 66, muestra la media para cada columna de datos, así como el error estándar de cada media, que es una medida de la variabilidad de su muestreo. El error estándar es el resultado de dividir la desviación estándar mancomunada entre el número de observaciones en cada nivel. También muestra un intervalo alrededor de cada media que están basados en la diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	8.13023E6	3	2.71008E6	1262.73	0.0000
Intra grupos	957209.	446	2146.21		
Total (Corr.)	9.08744E6	449			

Figura No. 67.-Tabla ANOVA entre grupos

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 1262.73, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 variables con un nivel del 95.0% de confianza.

En la figura no. 68, se observa la grafica de talla inicial y final en la cual nos demuestra que no tuvo mucha variabilidad, sin embargo el peso si hubo incremento significativo.

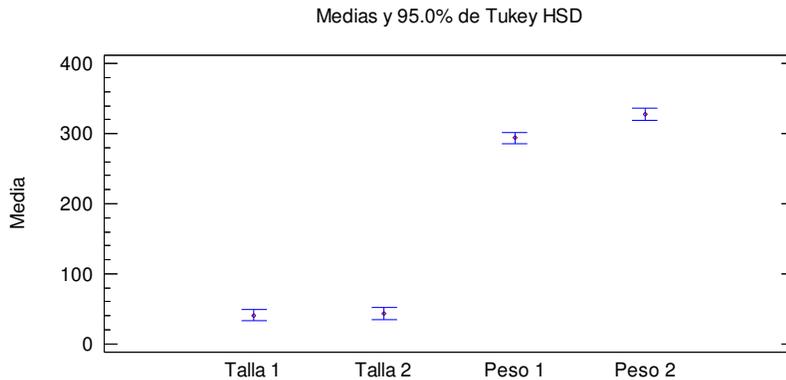


Figura No. 68.- Gráfica de medias por medio de Tukey

8. DISCUSIÓN

Las enfermedades parasitarias son causa de una significativa morbimortalidad y son principalmente asociadas a países o comunidades con bajo desarrollo socioeconómico. Los nematodos de tipo intestinal son de las parasitosis más extendidas en el mundo y están presentes también en el medio ambiente, pueden cursar de manera asintomática o producir síntomas gastrointestinales (Pérez-Molina, 2010).

A lo largo de gran parte del mundo como lo menciona Gottstein et. al., 2009, la trichinellosis es una enfermedad que no solo representa un peligro para salud pública, sino que también representa un problema económico en la producción animal porcina y en la seguridad alimentaria, por ello la importancia de seguir buscando una alternativa para la disminución y/o erradicación de la parasitosis, en especial de la especie *T. spiralis*, la cual podemos encontrar en la mayor parte del mundo, y en nuestro país.

La trichinellosis sigue siendo una enfermedad presente en el mundo, siendo en la mayoría de ellos una enfermedad que no se diagnostica de rutina, y que se ha presentado a lo largo del tiempo. Mientras en lugares como la Unión Europea donde se ha llegado a manejar reglamentos en la detección de triquinas, en los cuales se siguen aprobando métodos para un mejor diagnóstico (Diario de la Unión Europea, 2011), la enfermedad se sigue presentando indiscriminadamente; hay casos clínicos como el de una niña de 12 años presentado en Ganges, India, la cual presentó signos característicos de la enfermedad como: fiebre, mialgias generalizadas, restricción de movimiento de rodilla, además de ser dolorosos, la cual provenía de un nivel socioeconómico baja y había consumido un mes antes hamburguesa hecha con carne de cerdo de procedimiento dudoso, en el cual el examen histopatológico de la biopsia muscular reveló la infección parasitaria (Pebam et. al. 2012).

En Argentina se informaron más de 5000 casos clínicos de trichinellosis en un periodo de 1990-1999 de los cuales el 90% ocurrieron en provincias de Buenos Aires, para 2011 fueron notificados casos sospechosos en la provincia de Tierra de Fuego, Buenos Aires, los organismos regentes de sanidad recomienda la cocción de la carne de cerdo y caballo hasta que su temperatura interna alcance los 71°C o bien su congelación a -15°C durante 3 semanas, mientras que estudios realizados en la Universidad Nacional del Sur,

podieron demostrar que las larvas pueden llegar a alcanzar una mayor resistencia, por lo cual recomiendan la cocción a una temperatura mínima de 87°C durante al menos 15 minutos o una congelación de -20°C por cuatro semanas (Randazzo et. al. 2011).

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 y 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 unos de los fármacos, tanto en fase digestiva como en la muscular, por medio de la técnica de compresión de tejido, así como en digestión artificial hubo mayor afección en hembras en comparación con murinos machos.

La mayoría de los expertos recomiendan el uso combinado de antihelmínticos y glucocorticoides (Dupouy-Camet et al., 2007). El albendazol ha sido utilizado en diferentes patogenias animales, como por ejemplo se han hecho estudios para tratar el cestodo *Thysanosoma actinoides* en ovinos para evitar pérdidas económicas, donde se puede observar una efectividad del 45% de los animales tratados (Olivares et. al., 2010), así como contra la infestación de *Otodectes cynotis* en perros, donde la ivermectina fue 100% efectiva a una concentración del 0.01% usando como vehículo de aplicación glicerina carbonatada y dosificada a 1ml por conducto auditivo al día, debido a que no se encontraron parásitos hasta el día 28 de evaluación (Ruíz et. al., 2010).

Pérez-Molina et. al., en el 2010 menciona que los tratamientos de elección para la trichinellosis, dependen de la presencia de clínica, muscular, neurológica o cardíaca y consiste en el uso de albendazol (400mg/12h de 8-14 días) o mebendazol (200-400mg/8h por 3 días y luego de 400-500mg/8h por 10 días), a los que se asocian corticoides (prednisona de 30-60mg/día) para los casos más graves y como medicamento alternativo el

Pamoato de pirantel (10-20mg/kg de 2-3 días), mientras que Gottstein et. al. 2009 Menciona que el pirantel no es un fármaco muy confiable, ya que sólo puede utilizarse en el estado digestivo de la enfermedad, siendo más óptimo a los tres días después de la infección, pero por ser una enfermedad principalmente asintomática y no diagnosticada de rutina pasa desapercibida.

El albendazol ha sido utilizado en diferentes regímenes experimentales: se evaluaron 117 personas infectadas en un brote de *T. spiralis* relacionado con el consumo de carne de caballo, se evaluó al 1, 7, 15 y 45 días post infección, no hubo diferencia entre los diferentes grupos en cuando a la evolución clínica, a los 16 meses post infección, 30 personas tratadas con ABZ y 29 con tiabendazol y flubendazol fueron reevaluadas. La serología fue negativa para 70 % del grupo de ABZ y 34.5 de tiabendazol-flubendazol. Además 4 de las biopsias musculares hechas al grupo tratado con ABZ solo una fue positiva y con bajo número de larvas (Dupouy-Camet et. al., 2007), a diferencia este de nuestro estudio, donde pudimos observar que las ratas infectadas y tratadas con los diferentes tratamientos utilizados a base de 7.5 y 15mg/kg y 1 y 2 dosis de 200µg/kg de IVM en las diferentes 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 negrozco tanto en la célula nodriza como en la larva, por la técnica de digestión artificial observamos la larva infectante fragmentada y algunas con el contenido interno de la larva desintegrado.

Aunque no se observó diferencia entre los dos regímenes en la respuesta temprana a la terapia, el albendazol podría ser más eficaz contra la presencia de larvas residuales (Dupouy-Camet et. al., 2007).

En la piel, como barrera principal contra el medio externo, se lleva a cabo un gran número de eventos de naturaleza inmunológica; por ello, en este órgano se pueden manifestar diferentes enfermedades sistémicas, en las que mediante pruebas cutáneas específicas, se puede valorar el estado de hipersensibilidad retardada, cuya respuesta puede ser de utilidad para la clasificación, el diagnóstico o el pronóstico (Rodríguez et. al., 2008).

Las intradermorreacciones tienen gran importancia diagnóstica y pronostica, 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 diagnosticas de la trichinellosis es la IDR y menciona que se distinguen dos reacciones: una precoz (a los

treinta minutos), esta se hace positiva entre los diez y treinta días de la infección y una tardía (que se presenta a las 24hr), reconociendo de mayor diagnostico la reacción precoz positiva; en contraste con los analizados en el presente estudio, donde se evaluaron 4 diferentes momentos, siendo a las 2, 4, 24 y 48hr, observamos que tanto en la fase intestinal como en la muscular la reacción predominante en los sueros positivos al parásito, fue a las 24hr, sin importar el estado clínico, ni la fase en la que se encontraba el hospedero. Mientras que Rodríguez et. al., 2008, menciona que la lectura debe realizarse a las 48hr, cuando la reacción inmunitaria es menos marcada que a las 24hr.

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. valúe <0.05.

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

Los parásitos alteran la fisiología y/o morfología del hospedero con el fin de sobrevivir en un entorno nuevo, después de la lesión inducida por la invasión del parásito, las células musculares comienzan el proceso de reparación al igual que en cualquier trauma (Wu et. al. 2008), se observo por medio de la técnica de tinción con hematoxilina-eosina como la larva modifica las células musculares para adaptar el lugar donde se incrusta y así obtener los recursos nutricionales necesarios para su estancia en el musculo, los cual lo podemos observar, por medio de la compresión de tejido en nuestros controles infectados, así como por medio de la técnica de tinción de hematoxilina-eosina

9. CONCLUSIÓN

Se acepta nuestra hipótesis: “El patrón característico en la respuesta inmune e histológica muestra diferencias en animales infectados con *T. spiralis* y tratados con 2 fármacos antiparasitarios”, en las siguientes pruebas:

1. 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 la hembras tratadas con IVM en fase muscular se muestra un mayor aumento de peso y en los machos en fase digestiva.
2. La compresión de tejido muestra en control infectado una larva en su forma típica en espiral, y su colagena bien definida, mientras que en todos los tratamientos se presenta una afección de la larva, que va desde la pérdida de la su forma típica con alargamiento (1 y 2 dosis IVM-FD), puntilleo negrozco en la colagena (7.5 y 15mg de ABZ-FD), hasta una posible necrosis del parásito (15mg ABZ-FM)
3. En la digestión artificial, en el control infectado se observa la larva en su estado característico, mientras que en los tratados con IVM, hay desintegración del interior de la larva infectante y en tratados con ABZ fragmentación de la misma.

Se rechaza: 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. Así como por la prueba de IDR donde pudimos observar una reacción más marcada a las 24hr.

10. LITERATURA CITADA

- Arnold L. K., 2001, Trichinellosis. Boston University School of Medicine, editor: Tehodoro Gaeta. n. 3-16
- Barbosa I., Vázquez O., Romero R., Gutierrez M., Garcia Y., Fernandez A. y Campos T. 2001. Búsqueda de *Trichinella spiralis* en carne de cerdo que se expende en carnicerías del Distrito Federal. Revista Veterinaria México. v. 32. n. 141-144.
- Bell R. G., Appleton J.A., Negrao-Correa D. A. y Adams L. S. 1992. Rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in adult rats mediated by monoclonal antibodies of distinct IgG isotypes. Immunology Mar. 75:520-527.
- Berumen V., Muñoz J., Moreno M. 2002. Trichinellosis en perros callejeros de la Ciudad de Zacatecas, México. Parasitol latinoamerica vol. 57 pp 72-74.
- Bólas-Fernandez F. 2002. Total Anaerobiosis During In Vitro in Conventional Cell Culture Media is Required for Retaining Infectivity of *Trichinella spiralis* L1 Larvae, Department of Parasitology, J. Parasitol, 88 (4). Pp. 794-796.
- Capo V. y Despommier D. 1996. Clinical Aspects of Infection with *Trichinella* spp. Clinical Microbiology Reviews. 9:47-54.
- Chávez I. 2006. Utilización de Técnicas Directas e Indirectas en el Diagnostico de Trichinellosis en Cerdo. www.veterinaria.org/revistas/red/vet/n0505071050713
- 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 ping model. Red Vet. Vol. VII. No. 06. México. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060606.htm>
- Colin J., 1998. Parasites and parasitic diseases of domestic animals, Copyring© Pennsylvania State University.
- Contreras M. C., Acevedo E., Aguilera S., Dandoval L. y Salinas P. 1999. Estandarización de ELISA IgM e IgA para el inmunodiagnóstico de la triquinosis human. Boletín chileno de parasitología. v. 54 n.3-4.

- Chuaqui J. y González S. Técnicas diagnósticas de histopatología. Manual de Patología General. P. Universidad de Chile.
http://escuela.med.puc.cl/publ/patologiageneral.Patol_124.html (13-10-2009).
- Davies A., Dixon H. y Pawlowwsy Z. 1998. Multicentre clinical trials of benzimidazole-carbamates in human cystis echinococcosis (phase 2). *Bull* 67:503-508.
- Del Rio A. y Herrera D. R. 1986. Triquinosis experimental: Extracción de antígenos y procedimientos para detectar anticuerpos. *Archivos de Investigación Médica, México* n. 359-367.
- Despommier D. y Laccetti A. 1981. *Trichinella spiralis*: Proteins and Antigens Isolate from a Large Particle Fraction Derived from the Muscle Larvae. *Experimental Parasitology*. 51:279-295.
- Diario de la Unión Europea. 2011. Reglamento de Ejecución (UE) no 1109/2011 de la comisión, de 3 de noviembre de 2011, que modifica el anexo 1 del Reglamento (CE) no 2075/2005 en lo relativo a los métodos equivalentes de detección de triquinas. Texto pertinente a efectos del EEE <http://diarioeuropeo.com>
- Dupouy C. J. 2000. Trichinellosis a worldwide zoonosis. *Veterinary Parasitology*. v. 93, n. 191-200
- Dupouy C. J. y Murrell K. D. 2007. Guidelines for the surveillance, management, prevention and control of Trichinellosis. FAO/WHO/OIE
- Fragoso R., Tavizón P. y Villacaña H. 1981. Un brote de triquinosis (triquinelosis) en laguna de carretero, Zacatecas. *Salud Pública. Méx.* XXIII n. 24-41.
- Goodman A., Hardman J., Limbird L., Molinoff P. y Ruddon R. 2002. Las bases farmacológicas de la terapéutica, v. II 10ª edición, Editorial McGraw-Hill Interamericana. n. 1138-1149.
- Gottstein B., Pozio E., Nöckler K. 2009. Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control of Trichinellosis, *Clinical Microbiology Reviews*, p. 127–145
- Helmbj H. y Grecis R. K. 2002. IL-18 regulates Intestinal Mastocytosis and Th2 Cytokine Production Independently of IFN- γ During *Trichinella spiralis* infection. *The journal of Immunology* 169:2553-2560.

- Iáñez P. E. 1999. Curso de Inmunología general 15 regulación y tolerancia, Departamento de microbiología. Universidad de Granada España.
- Katzung G. B. 2005. Farmacología básica y clínica. Manual Moderno, 9º edición, n. 747-790.
- Latin Salud. 2001. Triquinosis 2001. V. 355 pp. 43 <http://www.latinsalud.com/temas/triquinosis.htm> (17-03-2002).
- Limdi. J. K. y Hyde G. M. 2003. Evaluación de pruebas de funcionamiento hepático anormales. Postgraduate Medical Journal 79:307-312.
- Lloyd J. R. 2000. Bibliografía Epidemiológica. Triquinosis. Universidad de Comahué <http://www.apuntesuniversitarios.com/Triquinosis/triquine.htm> (13-08-2003).
- Makedonka M. y Douglas P. 2006. Biology and genome of *Trichinella spiralis*. Wormbook the online review of elean Biology. http://www.wormbook.org/chapters/www_genomesTrichinella/genomesTrichinella.html (11-10-2009).
- Mackenzie C. D., Jurger M., Taylor P. y Ogilviz B. 1980. Activation of complement, the induction of antibodies to the surface of nematodes and the effect of these factor and cell on wom survival In vitro. Eur J. Immunol. 10:594.
- Manual of Histology and special staining technique. 1957. Armed Forces. Institute of Pathology. Washington, D.C. Chapter 2. n. 57-16
- Martínez R. 1998. Revisión Bibliografica: Situación de la Triquinosis en Chile. Departamento de Epidemiología. Ministerio de Salud. <http://www.chilemedcl/xxi/articulos/feb99/>
- Martínez B. I., Gutiérrez Q. M., Romero C., Fernández A., Vázquez T. O., Pérez L. y Gutiérrez C. 2000. Inmunoepidemiología de la Truquinosis en niños de la Ciudad de México. Revista Mexicana de Patología Clínica. v. 47 n. 156-161
- Medina L., Ramírez A., Ochoa M., Montes A., Franco C. y Martín R. 2006. Determinación de la presencia de anticuerpos anti-*Trichinella spiralis* en cerdos por la prueba de ELISA. Avances de Investigación Científica en la CUCBA. n. 771-775.

- 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.
- Meza L. E., García M. E., Alvarado R. M., Letechepía M y Moreno G. A. 1996. Evaluation of the effectiveness of temperatura on the viability of *T. spiralis* infective larvae. 9 International conference trichinellosis (ICT) Edit. Ortega P., Wakelin. 93-98.
- Monroy H., Flores-Trujillo M., Benítez E. y Arriaga C. 2001. Swine trichinellosis in slaughterhouses of the metropolitana rea of Toluca, State of Mexico. *Parasite* 8:249-251.
- Moreno A. y Muñoz J. 1993. Características de la Respuesta Inmune en *Trichinella spiralis*, *Investigación Científica* 5. Universidad Autónoma de Zacatecas. v.1, n. 17-27.
- Moreno A., Ávalos E., Muñoz J. y Herrera R., 1996. Detención de Antígenos Inmunodominantes de *Trichinella spiralis* en conejo como modelo experimental, *Investigación Científica* 9, v. 1, n. 5-8
- Moreno A., Ramos M. A. y Muñoz E. J. 2001. Utilización de la autoradiografía para la detección de antígenos predominantes de *Trichinella spiralis* en tres modelos experimentales. *Parasitol al día FLAP*. 25:8-11.
- Moreno A., Maldonado C., Reveles G., Gutierrez J., Muñoz J., 2008, Detección y Permanencia de Anticuerpos anti-trichinella en ratas Long Evans productos de madres infectadas con *Trichinella spiralis*, *RECVET*, v. III, n.10.
- Moreno A., Maldonado H., García E., Reveles R. y Muñoz J. 2009. Fase Intestinal de *Trichinella spiralis* en modelo murino. *Acta biol. Columb* v. 14. n. 205-212.
- Olivares J., Rodríguez D., Escobedo A., Camacho J., Herrera F., Montiel D., Fierro A., Ruiz D., Evaluación del Albendazol y Prazicuantel contra *Thysanosoma actinooides* (Cestoda: Anaplocephalidae), en *Ovinos, Rev. Salud Anim* vol.32 No.1:54-56.

- Ouchterlony O. 1958. Difusion in Gel Methods for Immunological Analysis in: Progress Allergy. Vol. V. Ed. Gallio, P., Basel and New York, Krager, New York. USA. 1 – 78.
- Pebam S., Goni V., Pantel S., Kumal V., Rawall S., Bali K., 2012. A 12-year-old child with trichinellosis, pyomyositis and secondary osteomyelitis. Journal of Global Infectious Diseases. Vol. 3. Pp. 84-88.
- Pérez-Molina J. A., Menéndez M., Ayala A., Ferrere F., Monje B., Norman F., López R. 2010. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Enferm Infecc Microbiol Clin, Elsevier, 28 (1): 44:59.
- Pozio E., 2001, New patterns of Trichinella infection, Laboratorio of Parasitology, Instituto Superiore di Sanita, Viote Regina Elena, V. 98, n. 1-3.
- Pozio E., Sachchini D., Sacchi L., Tamburrini A. y Alberici F. 2001. Failure of mebendazole in the treatment of humans with Trichinella spiralis Infection at the stage of Encapsulating; Brief reports, CID 32:638-642.
- Pozio E., Murrell K. 2006. Systematics and Epidemiology of Trichinella. Advances in Parasitology. 63: 367-439.
- Quiroz H., 1991, Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos, Editorial Limusa, pp. 120-263.
- Ramírez I. M. 1981. Epidemiología de la Triquinelosis. Departamento de Medicina Preventiva. FMVZ-UNAM. n. 278-334.
- Randazzo V., La Sala L., Costamagna S. 2011. Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de larvas de Trichinella spiralis. Revista Argentina de Microbiología 43: 256-262.
- Ríos S. A. Parasitología. Parasitología de Tay-Lara. 1997. Villahermosa, Tabasco, México. <http://www.monografias.com/trabajo12/paras/paras.shtml>
- Riva E., Steffan P. E. y Fiel C. A. 1990. Trichinellosis: Aspectos múltiples de una zoonosis global. n. 94-109.
- Ruíz J., Orozco J., Quintero G., 2010. Evaluación de eficiencia de la ivermectina al 0.01% aplicada dentro del oído, contra infestaciones naturales de Octodectes cynotis

en perros, REDVET, revista electrónica veterinaria, vol.II, Número 02
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> -<http://revista.veterinaria.org>

- Steffan P., 2006, Trichinellosis en el cono sur de América: Situación actual y prospectiva de una zoonosis parasitaria ancestral. Área de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Dep. Sanidad Animal y Medicina Preventiva, Fac. de Ciencias Veterinarias, UNICEN, Tandil, Argentina. Red de Helmintología de FAO para América Latina y el Caribe. www.produccion-animal.com.ar
- Riva E., Steffan P. y Fiel C. 2011. Muscular de Ratones cadavéricos y el rol potencial de larvas de *Dermetstes maculatu*. Área de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Revista Veterinaria. Pp 1-9
- Rodríguez R., Cob-Galera L. y Domínguez J. 2001. Frecuencia de Parásitos Gastrointestinales en Animales Domésticos Diagnosticados en Yucatán, México, Revista Biomed 12:19-25.
- Rojas O. S., Reyes G. E. y Ponce de León R. S., 1989, Triquinosis Esporádica, Salud Pública de México, 31: 685-663 SSA 2002. http://www.ssa.gob.mx/unidades/csg/cuads_bas_cat2002/medicamentos/descomp/Enf_Infecciosas_Gpo6._Mic...
- Takahashi Y., Uno T., Mizuno N., Suzuki H., Shimazu K. y Araki T. 1990. *Trichinella spiralis*: The in Situ Localization of Muscle Larva Antigens Recognized by Humans. Experimental Parasitology 70:107-110.
- Towbin H. T. y Sthanlin T. G. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocelulosa sheets, procedure an some application. Proct. Nathl. Acado Sci. USA 76:4350.
- Venturiello S., Ben G., Malmassaris., Nunez G., Veeroni R., Traversa M. 1998. Diagnosis of porcine trichinellosis parasitological and inmunoserological test in pigs from endemic areas of Argentina. Veterinary Parasitology. Vol. 74 No. 2 pp. 215-228

- Wakelin D. 1996. Experimental immunoparasitology, In: Immunity to parasites. How parasitic infections are controlled. Derek Wakelin (ed). University Cambridge. Great Britain. 36-41
- Yépez L., 1996, Nueva herramientas en el diagnóstico y en la identificación de parásitos del género *Trichinella*, Temas de Zoonosis, UIMEIP-Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, v. 132 (5): 513-517
- Wu Z., Sofronc-Milosarljevic Lj., Nagao I., Takahashi Y. 2008. *Trichinella spiralis*: nurse cell formation with emphasis on analogy to muscle cell repair. Parasites & Vectors. <http://www.parasitesandvectors.com/content/1/1/27>