

***Syphacia obvelata*, SUSCEPTIBILIDAD DE RATONES CONSANGUÍNEOS BALB/C//BIOU Y C57BL/6//BIOU Y NO CONSANGUÍNEOS BIOU: NMRI.**

***Syphacia obvelata*, susceptibility of BALB/c//BIOU and C57BL/6//BIOU inbred mice and BIOU: NMRI outbred mice**

Adriana Barrento¹, Yepsys Montero¹, James O'Callaghan¹ y Rosa De Jesús^{1,2*}

¹Bioterio. Universidad de Los Andes. ²Laboratorio Fisiología Animal. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. 02742403128. Email: rosadej@ula.ve

RESUMEN

Entre los parásitos intestinales de mayor incidencia en los ratones de laboratorio producidos en bioterios convencionales, se encuentra *Syphacia obvelata*. La respuesta de estos animales a la presencia del parásito depende de las características genéticas de los mismos. Por tanto, es conveniente que el investigador conozca cuál es la posible respuesta de los animales utilizados en sus investigaciones, frente a esta parasitosis de manera que pueda realizar un análisis acertado de sus resultados. En este estudio se evaluó el periodo de prepatencia del parásito, se evaluaron los niveles de IgG y se evaluó la histología del ciego (órgano blanco). Para el desarrollo del estudio se indujo la parasitosis a un grupo de ratones sanos consanguíneos: BALB/c//BIOU y C57BL/6//BIOU, y no consanguíneos: BIOU:NMRI, para comparar la susceptibilidad de la infección en cada grupo genético. Los valores de titulación de IgG mediante ELISA, en microplacas sensibilizadas con el antígeno crudo (parásito *S. obvelata*), fueron mayores en los sueros de los ratones BALB/c//BIOU parasitados. En relación a los resultados histopatológicos, se observó alteración de la arquitectura histológica del ciego en los tres tipos genéticos de ratones estudiados. La respuesta de los tipos genéticos de ratones ante el parásito *S. obvelata* son conducentes a presentar a los ratones consanguíneos BALB/c//BIOU como los que presentaron mayor susceptibilidad al parásito estudiado, los resultados obtenidos deben ser considerados por los investigadores cuando trabajan con animales que presentan este tipo de parasitosis.

Palabras clave: BALB/c//BIOU; C57BL/6//BIOU; ratones consanguíneos; BIOU: NMRI; ratones no consanguíneos; parasitosis; *Syphacia obvelata*.

ABSTRACT

Syphacia obvelata are the parasites of major incidence in the mice of laboratory within of animal conventional facilities. The animal genetic can influence the response to the studied microorganism. The researcher may have precision of the results analysis of your investigations, when he has understanding of the infections natural of the animals. In this assay, the susceptibility was compared between BIOU:NMRI outbred mice and BALB/c//BIOU and C57BL/6//BIOU inbred mice, those were parasited and measured: prepatent period, IgG title and cecum histology. The worm and eggs first were observed in BALB/c//BIOU mice, the higher concentrations of IgG were observed in the micro plates sensibilized with crude antigen (parasite *S. obvelata*). In relation to histological assay, the three genetic type presented alteration of the cecum histological architecture. The behavior of the organisms to situations environmental different are genetically determined, between this the response to parasites. In this study the response of the different genetic types mice parasited with *S. obvelata* are conduce to consider that the BALB/c//BIOU mice inbred have more susceptibility to these. The researcher in their investigations should consider that the results obtained can be altered when different genetic type's mice are used and these are parasited by naturally intestinal parasites.

Key words: *Syphacia obvelata*; BALB/c//BIOU; C57BL/6//BIOU; inbred mice; BIOU: NMRI; outbred mice; parasited.

INTRODUCCIÓN

Las respuestas de los ratones (*Mus musculus domesticus*) de laboratorio, en las distintas experiencias que se les utilizan pueden estar influenciadas, por sus características genéticas y la condición sanitaria de los mismos [10]. Los tipos genéticos de los ratones producidos en los bioterios son esencialmente dos: los consanguíneos y los no consanguíneos. Los primeros son obtenidos de una pareja única y reproducidos hermanos con hermanas por veinte generaciones, de manera que los caracteres genéticos adquiridos son fijados en un linaje estable a través del tiempo. Los segundos, pertenecientes al grupo no consanguíneo, son ratones pertenecientes a una misma colonia entre los cuales existen variaciones genéticas. Éstos son reproducidos usualmente de forma de minimizar la consanguinidad, que solo debería aumentar 1% cada cuatro generaciones, lo que puede ser logrado usando diferentes esquemas de reproducción [3, 9].

En relación a la condición sanitaria de los animales de laboratorio producidos en bioterios convencionales, el parásito intestinal *Syphacia obvelata* tiene una alta incidencia [23, 25 - 27]. La susceptibilidad del hospedador al parásito depende de factores intrínsecos, tales como: sexo, edad y condición genética [3, 18]. *S. obvelata*, pertenece a la clase *Nematoda*, a la superfamilia *Oxyuroidea*, familia *Oxyuridae*. Este parásito, habita el ciego del hospedador y tiene un ciclo de vida directo, de aproximadamente 11 a 15 días; las hembras grávidas depositan sus huevos en la región perianal en un promedio de 350 huevos, éstos se vuelven infectivos entre las cuatro y seis horas (h); la vía de infección, generalmente, es oral [4, 7]. Se piensa que no es patógeno [8], sin embargo, las infecciones con nematodos han sido asociadas con prolapso rectales, enteritis mucoide e impacción intestinal [24]. Más recientemente, ratones infectados con nematodos demostraron una auto-tolerancia y la importancia en la inducción neonatal de la respuesta a enfermedades autoinmune asociadas a Th2 y células T de memoria [1, 26].

Ha sido reportada la existencia de diferentes respuestas a parásitos dependiendo del tipo genético de los ratones usados en la investigación. Algunos trabajos han reportado que los ratones *BALB/c*, del tipo genético consanguíneo presentan mayor susceptibilidad a la *Leishmania major*, que los *C57BL/6*, los cuales son también del tipo genético consanguíneo [12], y a *Trypanosoma cruzi* [6]. Esta diferencia de susceptibilidad tiene su origen en el contraste genético relacionado con la capacidad de los ratones *C57BL/6* de producir interleucina 4 (IL-4), la cual dirige la diferenciación de las células Th2, esta diferenciación genética es propuesta como determinante en la susceptibilidad de los ratones *BALB/c* [5]. Más recientemente ha sido reportado que, los ratones *BALB/c* producen una respuesta inmunológica contra *Trichuris muris* similar a la respuesta Th2, la cual permite al ratón ser capaz de modificar la respuesta al parásito, en contraste con el ratón *AKR*, que produce una respuesta Th1 siendo éste severamente afectado [22]. En el caso de las infecciones por *Taenia crassiceps* se ha postulado que,

la diferencia en susceptibilidad para cisticercoides múrido está asociado con factores genéticos y sexuales, encontrando que el ratón hembra es más susceptible en los estados iniciales de la infección, mientras en infecciones avanzadas la susceptibilidad de ambos sexos es similar [13], identificándose como relevante el papel directo de la respuesta inmunológica del hospedador, en la diferencia de la susceptibilidad entre ambos sexos. Se reporta también la presencia de la respuesta inmune Th2 en ensayos experimentales con *BALB/c* infectados con *S. obvelata*, identificando la respuesta inmunológica con la producción de Ig G (IgG1) parásito específica, con elevada producción transitoria de interleucinas 4 (IL-4), IL-5, e IL-13[20].

El objetivo del presente trabajo fue comparar la susceptibilidad de los ratones consanguíneos *BALB/c/BIOU* y *C57BL/6/BIOU* y no consanguíneos *BIOU:NMRI* producidos en el bioterio de la Universidad de Los Andes - Venezuela, a infecciones experimentales por *S. obvelata*, usando como variables dependientes la prepatencia de la parasitosis, la medición de las concentraciones séricas de Ig G contra antígenos de *S. obvelata* y la valoración del posible daño histológico a nivel del intestino grueso, órgano blanco del parásito. La finalidad del trabajo es ofrecer a los usuarios información con respecto a la influencia que tienen las parasitosis comunes a los ratones que son usados como modelos experimentales, sobre distintos parámetros que son medidos en los experimentos en que estos participan.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones consanguíneos *C57BL/6*, *BALB/c* y no consanguíneos *NMRI*, los cuales en este trabajo son nombrados como: *BALB/c/BIOU*, *C57BL/6/BIOU* y *BIOU:NMRI* por ser producidos en el bioterio de la Universidad de Los Andes (BIOULA) y caracterizados en las condiciones de este bioterio: a) producidos en aisladores (*AlyTec*®, CENPALAB, Cuba), a $23 \pm 2^\circ\text{C}$, b) alimentados a voluntad con alimento pasteurizado a $121^\circ\text{C} / 1$ minuto (min), c) agua de bebida esterilizada a $121^\circ\text{C} / 2$ min.; y d) material de encamado cáscara de arroz (*Oryza sativa*), esterilizada a $121^\circ\text{C} / 15$ min, en autoclave a vapor de doble puerta, marca BAUMER modelo HI VAC MX II, fabricada en Brasil; e) temperatura de la habitación y humedad de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ y $65 \pm 10\%$, respectivamente; f) ciclos de iluminación de 12 h luz: 12 h oscuridad y con una intensidad de luz de 180 Luxes.

Después del destete, los animales fueron distribuidos por sexo en cajas piso sólido, tipo T2 (40 centímetros (cm), altura x 25 cm, ancho x 25 cm, largo, en donde se alojaron cinco animales por caja.

Diseño experimental

Se establecieron tres grupos experimentales. El primero (grupo parasitado experimentalmente) consistió de 60 animales, veinte pertenecientes a cada tipo genético (10 machos y 10 hembras).

Cada ratón fue parasitado con 10 huevos maduros (infectivos) de *S. obvelata*, que fueron recolectados mediante el método del hisopo húmedo de la región perianal de los ratones infectados, éstos se colocaron en 200 µL de solución fisiológica mediante sonda gástrica de acero inoxidable (cánula pájaros 1.2 mm curva 5 cm, España), después del destete. Antes de la inoculación, los ratones fueron diagnosticados libres de parásitos, mediante la prueba convencional del método de Graham [15], la misma se realizó diariamente durante 1 semana (sem) para comprobar que estaban negativos a *S. obvelata*. Además que en el bioterio semestralmente (Procedimientos Normalizados de Trabajo), los ratones alojados en los aisladores son monitoreados para parásitos y bacterias. El segundo grupo (grupo control) igualmente contentivo de 60 animales, fue establecido de la misma forma que el grupo experimental pero sin parasitar.

El tercer grupo consistió de 20 ratones parasitados naturalmente, pertenecientes a la colonia no consanguínea, este grupo se utilizó para: a) obtener los huevos con los que se realizó la infección de los animales experimentales, b) obtener los gusanos que se prepararían como antígeno para sensibilizar las microplacas de titulación, y c) para obtener el suero positivo para el análisis serológico.

Los animales se alojaron en el aislador a periodos diferentes, iniciando con el grupo control de los tres tipos genéticos, posteriormente se continuó con los animales del grupo experimental. El tercer grupo se alojó en un cubículo sin barreras sanitarias, con agua, alimento y material de cama sin esterilizar, con la finalidad de que se parasitaran naturalmente [1].

Diagnóstico de parasitosis

Los ratones de los grupos experimentales se monitorearon semanalmente a partir de la primera semana de parasitados con los huevos de *S. obvelata*, usando el método convencional o método de Graham, el cual consiste en colocar un corte de cinta adhesiva transparente en la apertura del ano del ratón haciéndole presión, luego ésta se coloca sobre un porta objeto y se observa en un microscopio, marca Nikon, modelo Eclipse LVision, EUA; con el objetivo de 10X. A la par, se usó el procedimiento del hisopo húmedo (limpieza perianal), la cual consiste en frotar un hisopo húmedo con solución fisiológica el área perianal del ratón y luego se coloca en una gota gruesa de esta misma solución sobre un portaobjeto, se coloca un cubre objeto sobre la muestra y se observa al microscopio, observando la apariencia del parásito y realizando el conteo.

A la sexta sem los animales fueron sacrificados usando la cámara de anestesia con Euforano 100% [19], verificando el estado de inconsciencia mediante el pinchazo podal. Una vez que el animal se encontraba inconsciente se realizó la extracción de aproximadamente 1 mL de sangre vía intracardíaca, con cavidad torácica abierta. La sangre fue colectada en tubos de ensayo sin anticoagulante, para obtener el suero y realizar un Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA: acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), [15], posteriormente

se realizó la necropsia con la finalidad de extraer fragmentos del intestino grueso, los cuales fueron fijados en formaldehído neutro, para su posterior procesamiento mediante técnica convencional y tinción mediante hematoxilina - eosina (H - E), para su estudio histológico.

Ensayo inmunoenzimático

Para el análisis serológico, los parásitos fueron obtenidos desde el tracto digestivo de la estructura anatómica denominada: ciego, de los ratones del grupo parasitado naturalmente [15]. Estos fueron lavados 5 veces con 30 mL de Buffer Fosfato Salino (del inglés: Phosphate-Buffered Saline; PBS), pH 8,1 y gentamicina (80 mg / 2mL), obteniendo un conjunto de parásitos libres de bacterias corroborado por observación al microscopio, los cuales fueron congelados (Thermo Scientific™ Ultracongeladores verticales de -40°C Forma™ serie 7000, España), a -40°C.

Posteriormente descongelados y centrifugados en una centrifuga refrigerada modelo OPR 6000, Thermo Scientific Sorvall ST 8, España), a 448 G x 5 Min. Se recolectó el sedimento contentivo de los parásitos en un solo tubo y se le adicionó formalina neutra y 10 mL de PBS 7,2 de pH. El sedimento fue resuspendido en 2 mL de PBS más 2 µL de mezcla de inhibidores de proteasas (TLCK, Tosyl-L-Lysine-chloromethylketone 62 µg/mL, TPCK, Tosyl-L-Phenylalanine-chloromethylketone 62 µg/mL y PMSF, Phenylmethylsulfonyl fluoride 219 µg/mL) para evitar la degradación de las proteínas. Luego se congelaron los parásitos durante 12 h hasta su uso.

La disrupción de los parásitos fue logrado usando un sonicador (Brason sonifier modelo 150, EUA) a una frecuencia de 7 Hertz y 5 ciclos por 20 seg., alternando con un minuto (min) de descanso en hielo, luego se procedió a colocar una gota sobre un portaobjeto para observar al microscopio el rompimiento de los parásitos.

La cuantificación de proteínas fue realizada por el método colorimétrico de Bradford [21], usando una reacción colorimétrica visible del colorante (Comassie G- 250), leída en un espectrofotómetro (Dynatech MR5000, Microplate reader, EUA) a una longitud de onda de 595 nm, de las proteínas crudas obtenidas después de la disrupción de los parásitos. Para obtener la concentración de proteínas presente en cada una de las muestras, se dividió el valor de la absorbancia obtenido de cada muestra entre 0,06 relacionado a los microlitros utilizados de la muestra analizada.

Para obtener el suero positivo se obtuvo la sangre sin anticoagulante, aproximadamente 1,0 mL, mediante punción cardíaca del grupo de ratones parasitados naturalmente; para lo cual se centrifugó a 3360 G durante 5 min en una centrifuga marca FaNem modelo 206, Brasil; éste se conservó una vez obtenido en una nevera ejecutiva marca Frigilux modelo Nvr 276, Venezuela, a 4°C hasta su uso. El suero negativo fue obtenido de la sangre sin anticoagulante de los ratones alojados en los aisladores, antes del sangrado los ratones fueron diagnosticados

como libres de parásitos, mediante el método convencional de Graham y mediante examen del contenido del ciego; la garantía de que estos ratones se encuentran libres de parásitos se fundamenta en que semestralmente los ratones alojados en los aisladores son monitoreados bacteriana y parasitológicamente. Ambos sueros se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 mL y fueron guardados a 4°C, en una nevera ejecutiva marca Frigilux modelo Nvr 276, Venezuela, hasta su uso.

La cuantificación de IgG se realizó mediante un ELISA indirecto, siguiendo lo propuesto por Huapayai y col. [16], la prueba se hizo por duplicado, los pocillos de las placas microtituladoras (Nunc Maxi-SorpImmuno Plate) fueron sensibilizadas con extracto crudo de *S. obvelata*, a una concentración de 1 µg diluido en 100 µL de buffer de unión o buffer carbonato. Las placas fueron incubadas a 4 °C por 8 h, tapadas para evitar la evaporación, en una nevera ejecutiva marca Frigilux modelo Nvr 276, Venezuela. Luego fueron lavadas tres veces con PBS al 0,005% de Tween 20 (PBS-T) por 10 min cada lavado, sacudiéndola vigorosamente sobre un papel absorbente, para eliminar el antígeno no absorbido a la placa. Posteriormente fueron bloqueadas con 200 µL/pozo con PBS más caseína 2% e incubada por 60 min a temperatura ambiente, con el fin de bloquear los sitios libres de proteínas en el plástico, luego las placas fueron lavadas tres veces más con PBS al 0,005% de Tween 20. Se adicionó en cada pozo 100 µL del suero diluido con caseína 2% colocando en los pocillos las siguientes diluciones: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 y 1:800 volúmenes. Las placas fueron incubadas durante una hora (h) a temperatura ambiente y se realizaron tres lavados de 10 min cada uno, con PBS al 0,005% de Tween 20. Luego se le adicionó el conjugado IgG (anti-ratón de Sigma A9044 – 2 mL) peroxidasa a una dilución de 1:7500 con PBS caseína 2% en un volumen de 100 µL por pocillo e incubado por una h, se volvieron a realizar tres lavados con PBS al 0,005% de Tween 20, y luego se adicionó el ortofenil dietanolamina (OPD 0,02%) con peróxido de hidrógeno al 30% y buffer citrato pH5, incubándose posteriormente en la oscuridad

por 45 min. La reacción fue detenida al adicionar solución de H₂SO₄ al 20%, y leída utilizando un filtro de lectura a 490 nm, en un lector de ELISA Marca BioTek, Modelo ELx808, EUA. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Análisis estadístico

Los valores obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico de correlación utilizando un “software” estadístico especializado (SPSS) versión 12.0 año 2002, con un 95% de confiabilidad.

De acuerdo al objetivo del trabajo, se planteó como hipótesis nula (Ho) la ausencia de diferencias significativas en los parámetros medidos entre los tipos genéticos evaluados, usando el análisis estadístico ANOVA con un $P < 0,05$.

Este estudio fue evaluado por el Comité de Ética de los animales de laboratorio de la Universidad de Los Andes (Comité de Ética Bioterio Universidad de Los Andes: CEBIOULA), siguiendo los lineamientos para el cuidado y uso de los animales de laboratorio propuestos en el Manual para el uso y cuidado ético de los animales de laboratorio de la Asociación Venezolana de la Ciencia de los Animales de Laboratorio (cuyo acrónimo es AVECAL), [2].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La TABLA I, presenta el período prepatente de los huevos a la cuarta sem post inoculación y las distintas formas del parásito (huevos, larva y adultos – hembra y machos) de *S. obvelata* a la quinta sem postinoculación, en los ratones hembras y machos de los diferentes genotipos en estudio. Se observaron diferencias significativas ($P = 0,002$) entre las distintas formas y las cantidades del parásito entre los tres tipos genéticos evaluados a la quinta sem de la experiencia.

TABLA I
COMPORTAMIENTO DEL DESARROLLO DE LA PARASITOSIS CON *Syphacia obvelata* EN RATONES CONSANGUINEOS Y NO CONSANGUÍNEOS

Ratones	Semana 4 Huevos método de Graham	Semana 5			
		Huevos método de Graham	Ciego		
			Huevos	larvas	adultos
BALB/c//BIOU (machos)	68± 2,5	75±0,5	56± 4,6	9,56±0,6	5,56±0,1
BALB/c//BIOU (hembras)	47± 3,5	56±0,6	21± 7,3	2±0,1	2±0,9
C57BL/6//BIOU (machos)**	0	0	21± 7,3	0	4±2,3
C57BL/6//BIOU (hembras) **	0	0	0	2± 0,9	5± 1,5
BIOU:NMRI (machos)	0	0	26± 4,6	7±2,4	5± 1,46
BIOU:NMRI (hembras)	0	0	10± 3,5	3± 0,9	0

** Presencia de parásitos en la porción distal del intestino grueso, ± SD.

Observándose similitud con lo reportado en la bibliografía que señala que la parasitosis por *S. obvelata* está influenciada por la condición de género animal [18]. La presencia de huevos se percibió a partir de la cuarta sem, luego de la infección, encontrándose diferencias en la cantidad de huevos entre los grupos.

Al ser el parasitismo un fenómeno biológico interdependiente y dinámico, la infección puede provocar escasas manifestaciones; sin embargo, el estado inmunitario del huésped siempre da una respuesta, debido a la misma dinámica de los eventos que ocurren en el establecimiento de la infección.

En relación a la prueba de ELISA, se consideraron valores seropositivos, en el límite de positividad o el punto de corte, aquellos resultados cuya densidad óptica superaba la media del valor negativo más 2 desviaciones estándar, el punto de corte estuvo comprendido entre un rango de 0.0035 - 0.024, entonces

se consideraron positivos todos los sueros que dieron niveles de anticuerpos mayores a esta máxima lectura de densidad óptica. De esta manera se diferenció entre sueros negativos y positivos.

La FIG. 1 presenta los resultados de las absorbancias obtenidos con las distintas diluciones del suero de los ratones machos de los tres tipos genéticos analizados. En ésta se pueden observar que los valores de la absorbancia, de las cinco diluciones de los sueros de los ratones de la cepa consanguínea *BALB/c//BIOU* fueron los más altos aún en la menor titulación de 1:50 la cual fue de $0,15 \pm 0,01$. Seguido por los valores de la línea de de ratones *BIOU: NMRI* ($0,17 \pm 0,01$ a $0,13$), presentando la menor concentración de IgG los ratones de la cepa *C57BL/6//BIOU* ($0,14 \pm 0,02$ a $0,12 \pm 0,01$). Todos los tipos genéticos presentaron una respuesta inmunológica a la presencia del parásito. Las absorbancias obtenidas para los sueros de los ratones controles negativos se mantuvieron por debajo de $0,02 \pm 0,01$.

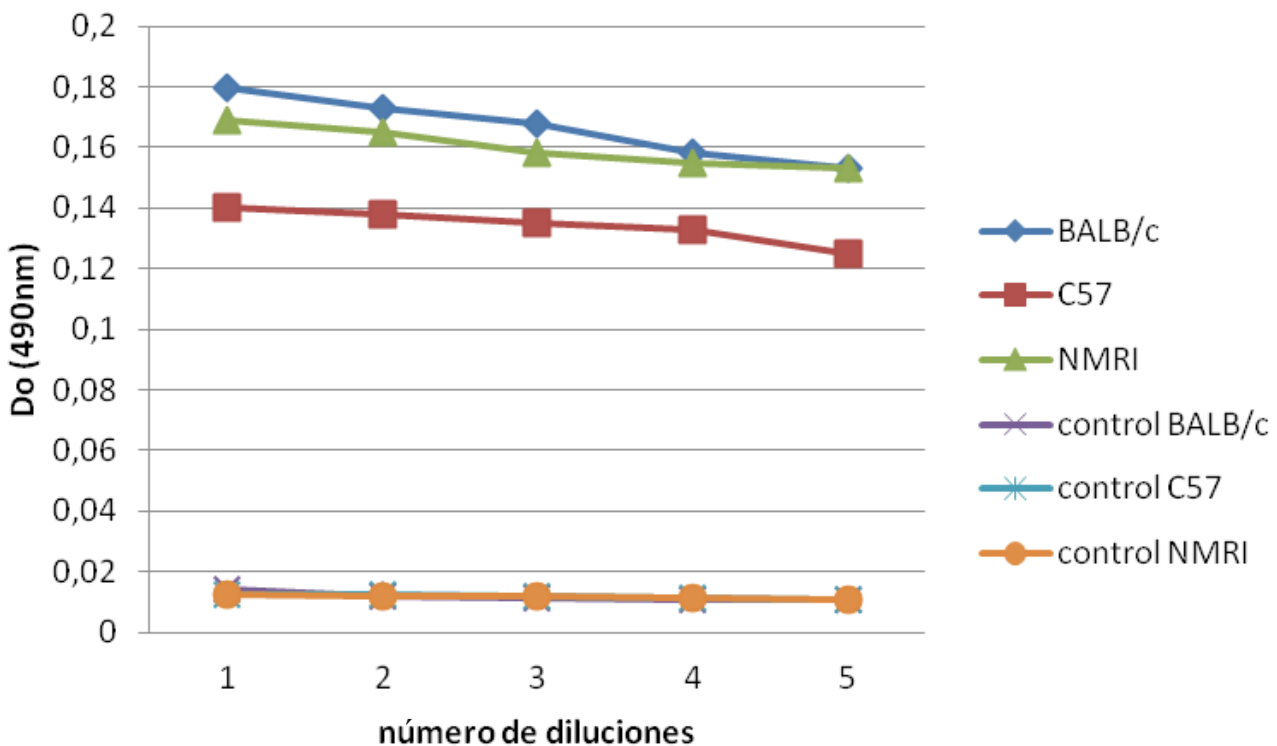


FIGURA 1. TITULOS DE LOS SUEROS DE LOS RATONES MACHOS DE LOS TRES TIPOS GENÉTICOS ANALIZADOS EN EL ESTUDIO.

La FIG. 2 presenta las absorbancias a las distintas diluciones (1:50; 1:100; 1:200; 1:400 y 1:800) de los sueros de las hembras de los tres tipos genéticos involucrados en el estudio, observándose que para las hembras de la cepa *BALB/c //BIOU* éstas se encontraron dentro del rango de absorbancia de $0,17 \pm 0,02$ a $0,15 \pm 0,01$ en relación a las diluciones realizadas, siendo este rango el más alto en relación a los rangos encontrados para el suero de los otros grupos de ratones. Las diluciones del suero

de la línea *BIOU: NMRI* presentaron las medidas en el rango de $0,15 \pm 0,01$ a $0,13 \pm 0,01$ y finalmente los presentados para las hembras de la cepa *C57BL/6//BIOU* se encontraron entre el rango $0,14 \pm 0,02$ a $0,12 \pm 0,01$. El rango de absorbancia de la IgG para los ratones controles se mantuvo en el $0,02 \pm 0,01$. Al igual que se observó para los machos, todos los sueros evaluados de los tres tipos genéticos tuvieron una respuesta inmunológica a la presencia del parásito.

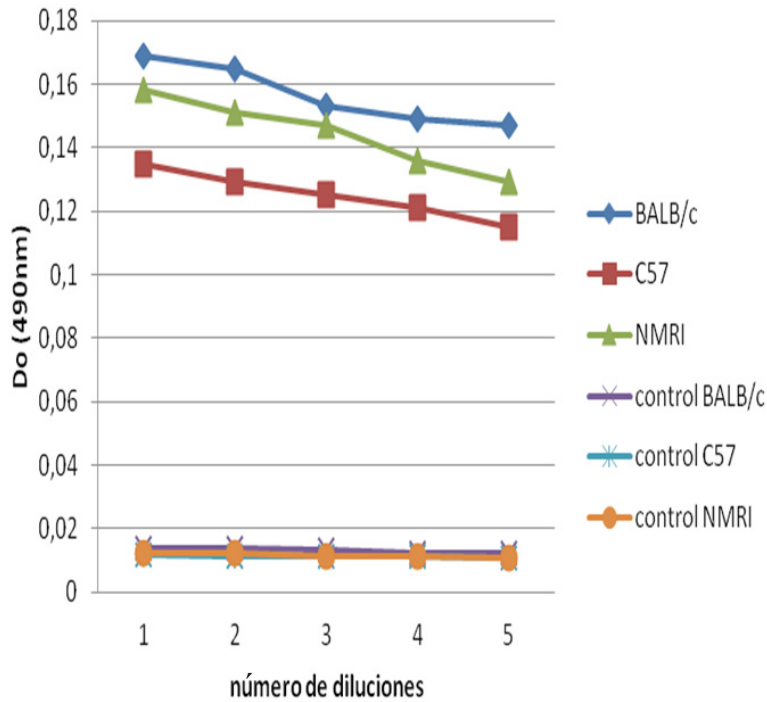


FIGURA 2. TÍTULOS DE LOS SUEROS DE LOS RATONES HEMBRAS DE LOS TRES TIPOS GENÉTICOS ANALIZADOS EN EL ESTUDIO.

En la FIG. 3 se pueden observar las microvellosidades del ciego, donde se pueden observar criptas de Lieberkühn profundas (flecha completa) y microvellosidades alargadas (punta de flecha) y microvellosidades alargadas (punta de flecha)

y relativamente finas, que presentaron los animales controles de los tres tipos genéticos.

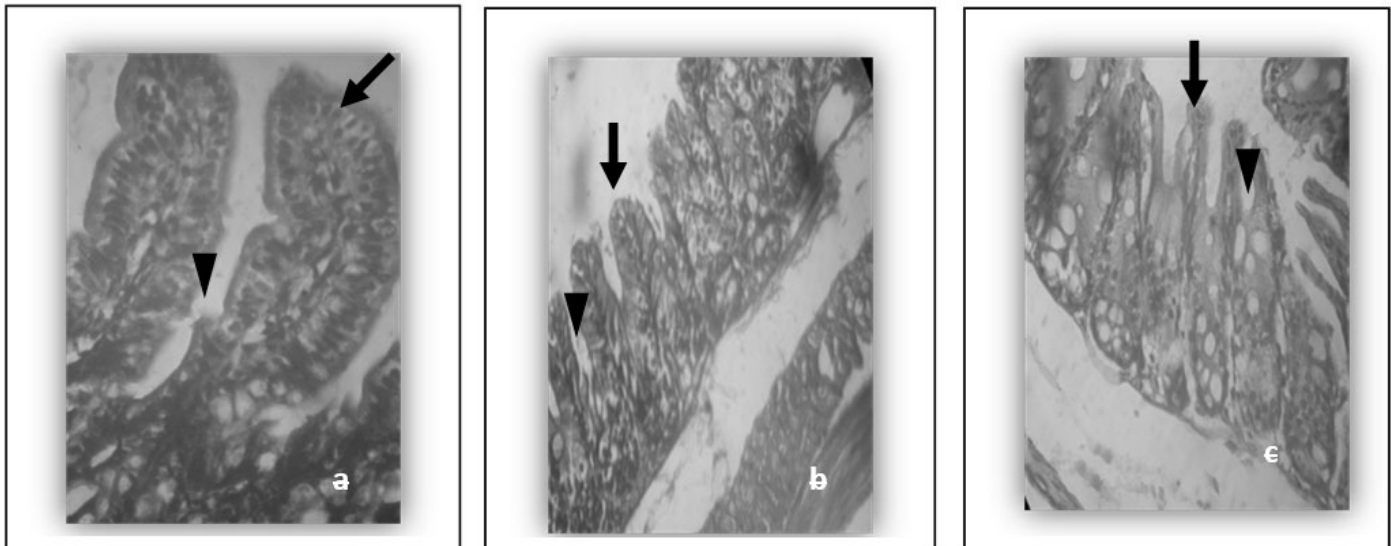


FIGURA 3. MUESTRAS HISTOLÓGICAS DEL CIEGO DE RATONES CONTROLES: A) C57BL/6//BIOU. B) BALB/C//BIOU. C) BIOU: NMRI. H-E (40X).

En la FIG. 4 se pueden observar las microvellosidades del ciego, donde se pueden observar criptas de Lieberkühn poco profundas (flecha completa) y microvellosidades aplanadas (punta de flecha) y relativamente gruesas, que presentaron los

animales parasitados de los tres tipos genéticos. Observándose en el tejido de los ratones C57BL/6//BIOU, no sólo alteración de la profundidad de las criptas sino distorsión de la morfología apical de las microvellosidades.

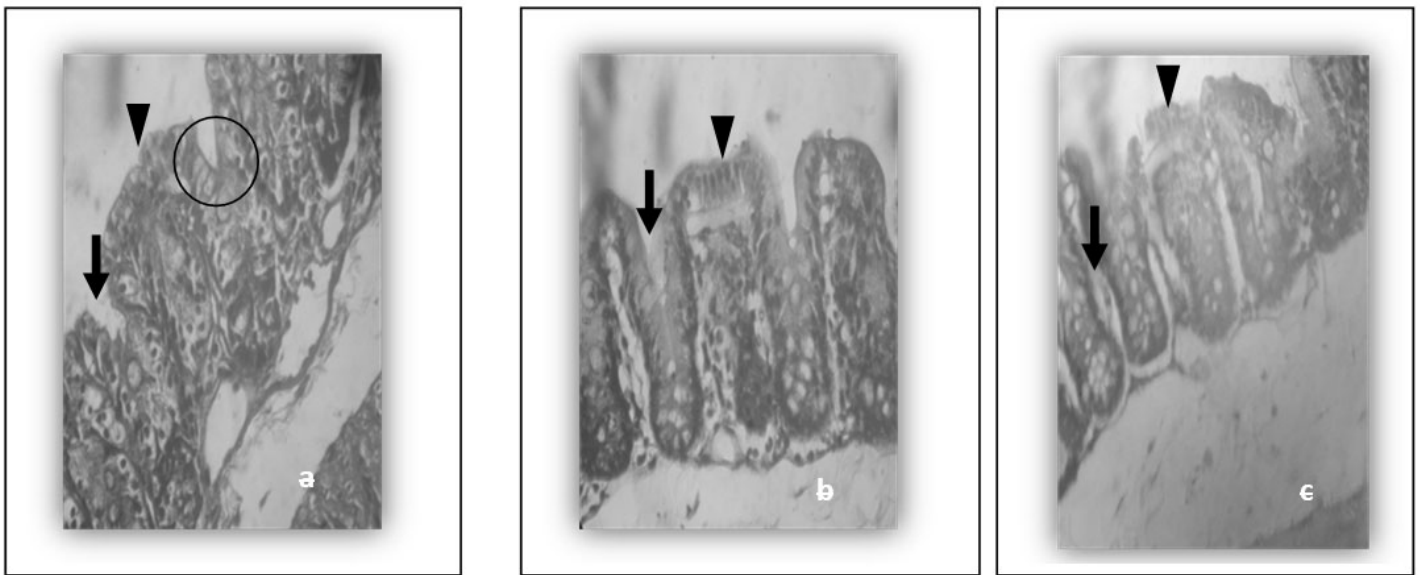


FIGURA 4. MUESTRAS HISTOLÓGICAS DEL CIEGO EN RATONES PARASITADOS. A) C57BL/6//BIOU. B) BALB/c//BIOU. C) BIOU:NMRI. H – E (40X).

Una de las características de la especie *S. obvelata*, es que se encuentra altamente distribuida en los ratones que se producen en los bioterios convencionales [11, 16, 20], si no son diagnosticados estos parásitos, pueden interferir en el desarrollo de protocolos y alterar la interpretación final de los resultados [14].

La producción de IgG en parasitosis producidas por parásitos intestinales ha sido reportada por varios autores [15, 20]. En este trabajo se compararon las absorbancias encontradas a cinco diluciones distintas (1:50; 1:100; 1:200; 1:400 y 1:800) del suero de los ratones con características genéticas distintas parasitados con *S. obvelata*. Encontrándose que los ratones del tipo genético consanguíneo, *BALB/c//BIOU*, presentaron los mayores valores de absorbancia aún a las menores titulaciones (1:50), tanto para machos como para hembras. Siendo el suero de los ratones *C57BL/6//BIOU*, los que presentaron los valores más bajos en relación a la menor titulación, pero similares al que se reporta para otros parásitos específicamente, *L. major* [12].

El comportamiento observado en los ratones no consanguíneos (*BIOU:NMRI*), presentando valores intermedios observados entre los ratones consanguíneos *BALB/c//BIOU* y *C57BL/6//BIOU*, tanto en relación a la concentración de IgG y el inicio de la infección (TABLA I; FIG.2), indican un comportamiento intermedio en relación a la parasitosis con *S. obvelata*.

Es importante considerar que en los ratones *C57BL/6//BIOU*, no se observaron en el órgano blanco, el ciego, los parásitos adultos [26] durante el tiempo del estudio, sin embargo, éstos se observaron en la porción distal del intestino delgado, no siendo usual de estas parasitosis. También se pudo observar que, a pesar de que estos ratones son de un tipo genético consanguíneo, fueron los que presentaron menor susceptibilidad al parásito. La adaptación de un parásito a un determinado microambiente es consecuencia de la expresión de diversas moléculas que intervienen en la capacidad de obtener y utilizar

recursos del hospedero (espacio y nutrientes) para lograr su supervivencia y reproducción. Algunas de estas moléculas tienen capacidad antigénica y evocan respuestas efectoras que limitan la diseminación y multiplicación parasitarias, otras son efectivas como mecanismos de evasión de la respuesta inmune, para lograr determinar con mayor precisión el comportamiento de invasión de un microambiente distinto al observado comúnmente para *S. obvelata*, se necesitan realizar estudios diferentes a los reportados en este trabajo.

La mayor susceptibilidad del tipo genético consanguíneo al parásito *S. obvelata* podría estar relacionada a con la inducción de una respuesta inmune transitoria del tipo Th2 con elevada producción de citoquinas IL-4, IL-5, e IL-13 y la inmunoglobulina parásito específica IgG1. En contraste el ratón *BALB/c* es deficiente en IL-13, IL-4/13, o de los receptores cadena alfa de IL-4 por lo que desarrolla una enfermedad crónica con una mayor carga parasitaria y una falla en la respuesta Th2 [20].

Las concentraciones de IgG fueron mayores en los ratones machos en comparación con el de las hembras, coincidiendo con los reportes bibliográficos, de que los machos presentan mayor susceptibilidad al parásito [18].

En la evaluación de la histología del tejido del órgano blanco se pudo observar aplanamiento de las vellosidades del tejido del ciego del intestino grueso en los ratones *BALB/c//BIOU* (tipo consanguíneo) y de los ratones *BIOU:NMRI* (tipo no consanguíneo). En el caso del *C57BL/6//BIOU* se observó distorsión en las vellosidades no se observa a una estructura conservadas a nivel del glucocálix de la histología del ciego del *C57BL/6//BIOU* (tipo consanguíneo), a pesar de que se observó una menor susceptibilidad en relación a los otros tipos genéticos, indicando que la presencia de los parásitos en el órgano blanco produjeron daño.

CONCLUSIÓN

Los resultados conducen a concluir que los ratones *BALB/c//BIOU* presentan una mayor susceptibilidad a *S. obvelata* en relación a los ratones del tipo genético no consanguíneo *NMRI:BIOU* y a los ratones del tipo consanguíneo *C57BL/6//BIOU*, ya que éstos fueron los primeros en presentar un periodo de prepatencia más corto, además de presentar los valores más altos de absorbancias en la titulación más baja, a pesar de que todos los sueros evaluados presentaron concentración de IgG a la presencia del parásito *S. obvelata*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AGERSBERG, S.; GARZA, K.; TUNG, K. Intestinal parasitism terminates self tolerance and enhances neonatal induction of autoimmune disease and memory. **Eur. J. Immunol.** 31:851-859. 2001.
- [2] AVECAL. Organización y funcionamiento de los bioterios. En: Manual para la producción y uso ético de los animales de laboratorio. MPPyT, Pp 15-38.2008.
- [3] BENAVIDES, F.; GUENÉT, JL. Las líneas genéticamente estandarizadas y los controles de pureza. En: **Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones.** Universidad de Alcalá. Lab Animal. Ltd. SECAL, Pp 105 – 124. 2003.
- [4] BAZZANO, T.; RESTEL, T.; PINTO, R.; GOMES, D. Patrones de infección con los nematodos de *S. obvelata* y *A. tetráptera* en ratones de tipo convencional. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 97:97-113. 2002.
- [5] BIEDERMANN, T.; ZIMMERMANN, S.; HIMMELRICH, H.; GUMY, A.; EGETER, O.; SAKRAUSKI, A.; SEEQMÜLLER I.; VOIGHT, H.; LUNIOS, P.; LEVINE, A.; WAGNER, H.; HEEQ, K.; LOUIS, J.; RÖCKEN, M. IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible *BALB/c* mice. **Nat. Immunol.** 2:1054-1060. 2001.
- [6] CARDONI, M.; ANTUNEZ, M.; ABRAMI, A. Respuesta Th1 en la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*. **Med.** (Buenos Aires). 59 (Supl. II): 84-90. 1999.
- [7] CHAN, K. Life cycle studies on the nematode *Syphacia obvelata*. **Ame. J. Hyg.** 56(1):14-21. 1952.
- [8] CHESNEY, M.; GOYAL, P.; NIEUWENHUIZEN, N.; BROMBACHER, F. Infection with *Syphacia obvelata* (pinworm) Induces Protective Th2 Immune Responses and Influences ovalbumin – Induced Allergic Reactions. **Infect. Immunity.** 74(10): 5926–5932. 2006.
- [9] DE JESÚS, R.; RODRÍGUEZ, N.; TORRES, W.; MORENO, Y.; O'CALLAGHAN, J. Uso de marcadores moleculares microsatélites para determinar condición de homocigosis y heterocigosis en roedores producidos en el Bioterio de la Universidad de Los Andes, Venezuela. **AIA.** 15: 45-63. 2011.
- [10] DE JESÚS, R.; PAVÓN, W. Sinergismo en la respuesta inmune en ratones *BALB/c//BIOU* con parasitosis combinadas: *Syphacia obvelata* y *Leishmania mexicana*. **Spei Domus.** 21(10): 29-39.2015.
- [11] DOYLE, R.; GONZÁLEZ, S.; LÜHERS, D.; MORAES, J.; SCHAFER, A.; BERTOLIN, K. Avaliação helmintológica de camundongos (*Mus musculus*) criados em biotério experimental. **Uruguiana.** 13:108-115. 2006.
- [12] FALÚE, M.; GARCÍA-BUSTOS, M.; PARODI C.; MOLINA De R.; CARDOZO, R.; CIMINO, R.; BASOMBRÍO, M. Susceptibilidad de distintas cepas de ratones a la infección por *Leishmania amazonensis*. **Dermatol. Argent.** 15: 334–339. 2009.
- [13] FRAGOSO, G. Factores del huésped y del parásito implicados en la susceptibilidad a la cisticercoides experimental murina por *Taenia crassiceps*. 2006. Actividades académicas. 13era. Mesa Redonda. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. CisTiMex. En Línea: <http://www-lab.biomedicas.unam.mx/cistimex/s714.html>. 21 /10 /2015.
- [14] GONCALVES, L.; PINTO, R.; VICENTE, J.; NORONHA, D.; GOMES D. Helminth parasites of conventionally maintained laboratory mice - II. Inbred strains with an adaptation of the anal swab technique. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 93: 121-126. 1998.
- [15] GUDIÑO, M.; DE JESÚS, R.; OSORIO, A.; URDANETA, H.; ALFONZO, N.; MORA, Y.; O'CALLAGHAN, J. Implementación de la técnica inmunoensayoenzimática ELISA como método de diagnóstico para la detección de *Syphacia obvelata* en ratones producidos para uso experimental. **Rev. Latinoam. Parasitol.** 68:86-91. 2009.
- [16] HINRICHSEN, L.; DI MASSO, R. Empleo de un modelo murino original de Argentina en la caracterización de fenotipos complejos. **BAG. J. Basic Appl. Genet.** 21(2):1-12.2010.
- [17] HUAPAYAI, P.; ESPINOSA, I.; UAIZA, A.; SAVILLA, C. Estandarización de la técnica de ELISA para diagnóstico de Estrangiloidiosis. **An. Fac. Med. Univ. Nac. Mayor de San Marcos.** 63 (3):179-184.2002.
- [18] KLEIN, L. Mecanismos hormonales e inmunológicos que median las diferencias de sexos en la infección por parásitos. **Parasit. Immunol.** 26: 247 – 264. 2004.
- [19] MARTÍNEZ, M.; BUZALEH, A.; BATLLE, A. Efecto de los anestésicos Enflurano e Isoflurano en ratones con niveles inducidos y deprimidos de citocromo p450: estudios sobre el sistema enzimático metabolizante de drogas. **Acta Bioq. Clin. Latinoam.** 39:37-42. 2005.

- [20] MICHELS, C.; GOYAL, P.; NIEUWENHUIZEN, N.; BROMBACHER, F. Infection with *Syphacia obvelata* (Pinworm) Induces Protective Th2 Immune Responses and Influences Ovalbumin-Induced Allergic Reactions. **Infect. Immun.** 74: 5926–5932. 2006.
- [21] NOBLE, J.; KNIGHT, A.; REASON, A.; DI MATOLA, A.; BAILEY, M. A comparison of protein quantitation assays for biopharmaceutical applications. **Mol. Biotechnol.** 37(2):99-111. 2007.
- [22] PATEL, N.; KREIDER, T.; URBAN, J.; GAUSE, W. Characterization of effect or mechanisms at the host: parasite interface during the immune response to tissue-dwelling intestinal nematode parasites. **Int. J. Parasitol.** 39: 13-21. 2009.
- [23] PARKINSON, C.; O'BRIEN, A.; ALBERS, T.; SIMON, M.; CLIFFORD, C; PRITCHETT-CORNING, K. Diagnosis of Ecto- and Endoparasites in Laboratory Rats and Mice. **J. Vis. Exp.** 55:e2767. 2011.
- [24] PLACHY, V.; LITVINEC, A.; LANGROVA, I.; HORA'KOVA, B.; SLOUP, V.; JANKOVSKA, I.; VADLEJCH, J.; ADKOVA, Z.; BORKOVCOVA, M. The effect of *Syphacia muris* on nutrient digestibility in laboratory rats. **Lab. Anim.** 50(1) 39–44. 2016.
- [25] PRITCHETT, K.; JOHNSTON, N. A review of treatments for the eradications of pinworm infections from laboratory rodents colonies. **JAALAS.** 41:36-46. 2002.
- [26] SATO, Y.; NONAKA, N.; OKU, Y.; KAMIYA, M. Antibody Production in *Syphacia obvelate* **Infect. Mice. J.Parasitol.**81:559-562.1995.
- [27] SCAINI, C.; TRAVERSI, M.; RHEINGANTZ, M.; SIGNORINI, V.; TEIXEIRA, M. Helintos de ratas Wistar de diferentes faixas etarias criados en bioterio convencional. **Arq. Inst. Bio.** 3:265-268.2003.