

***Trichinella spiralis* (Owen, 1835) Raillet, 1895**
Aspectos morfológicos y biológicos en modelo experimental del ratón

Visciarelli E, Randazzo V, Sgattoni S, Costamagna SR

Cátedra de Parasitología Clínica, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia,
Universidad Nacional del Sur.

Título abreviado: *Trichinella spiralis*: morfología y fecundidad

Correspondencia: e-mail evisciar@criba.edu.ar

San Juan 670. 8000 Bahía Blanca, Argentina. Tel.: 54 9 291 4595101 int. 2421. Fax: 54 9 291 4595130.

RESUMEN

La reproducción de un parásito en un animal, permite obtener conocimientos sobre la enfermedad y la biología del mismo. Se utilizó al ratón como modelo experimental de trichinellosis y se estudiaron las características morfológicas y biológicas de *Trichinella spiralis* según los siguientes objetivos: Obtener parámetros morfológicos de adultos; Estimar la fecundidad como N° de Huevos/hembra al 5° día post-infestación; Observar la disposición, tamaño y forma de los huevos en el útero; Hallar una ecuación para predecir el número de huevos/hembra y Estimar el porcentaje de Efectividad Potencial de la infestación experimental. Tres ratones BALB/c se inocularon oralmente con larvas L1 de *T. spiralis*. A los 5 días post-infestación se extrajeron los intestinos. Se investigó la presencia y el número de parásitos en el contenido y en la mucosa intestinal. El número de parásitos en los distintos materiales biológicos se determinó por recuento en cámara según la técnica de Mc Master modificada. La morfología y morfometría se realizó sobre 30 ejemplares de *T. spiralis* de cada sexo, obtenidos por digestión artificial de la totalidad del intestino delgado de cada ratón. Los machos de *T. spiralis* midieron 1,04 mm \pm 0,04 de largo por 0,04 mm de ancho; las hembras 1,84 mm \pm 0,136 de largo por 0,04 mm de ancho. Largo del útero: 1,35 mm \pm 0,147. La fecundidad media fue 147 Huevos/hembra. En la parte anterior del útero, los huevos se observaron de mayor tamaño (diámetro: 18,6 μ m) y ordenados en una fila; en la parte media anterior fueron pleomórficos y ubicados en tres o cuatro hileras (diámetro: 17,5 μ m) y en la parte media posterior, esféricos (diámetro: 1,049 μ m) y dispuestos desordenadamente. En la

parte posterior del útero no se observaron huevos. La Efectividad Potencial de la infestación experimental fue $55,6\% \pm 4,6$. No se pudo obtener una ecuación para predecir el número de huevos/hembra. La descripción de *T. spiralis* en las condiciones experimentales establecidas aportar un modelo basal, a partir del cual sería posible referenciar cambios que pudieran ocurrir en los parámetros evaluados, en estudios con fármacos, probióticos o cualquier sustancia de uso terapéutico o profiláctico en trichinellosis.

PALABRAS CLAVE: *Trichinella spiralis*, morfología, fecundidad, larviposición.

ABSTRACT

Playback of parasitosis in an animal can gain knowledge about the disease and the biology of the parasite. We used the mouse as an experimental model of trichinellosis and studied the morphological and biological characteristics of *Trichinella spiralis* by the following objectives: Get morphological parameters of adults; estimate fertility as No. of eggs / female 5th day post-infestation; Watch the order, size and shape of the eggs in the uterus; Find an equation to predict the number of eggs / female and estimate the percentage of potential effectiveness of experimental infestation. Three BALB / c mice orally inoculated with L1 larvae of *T. spiralis*. At 5 days post-infection, the intestines were removed. We investigated the presence and the number of parasites in the content and in the intestinal mucosa. The number of parasites in various biological materials was determined by counting in camera according to the modified McMaster technique. The morphology and morphometry was performed on 30 specimens of *T. spiralis* of each sex, obtained by digestion of the whole artificial intestine of each mouse. The male *T. spiralis* measured 0.04 ± 1.04 mm long and 0.04 mm wide, females 0.136 ± 1.84 mm long and 0.04 mm wide. Uterus Length: 1.35 mm \pm 0.147 . Mean fecundity was 147 eggs / female. In the front of the uterus, eggs were observed cuboidal (diameter: 18.6 μ m) and arranged in a row, in the middle above were pleomorphic and located in three or four rows (diameter: 17.5 μ m) and in the posterior mean, spherical (diameter: $1,049$ μ m) and arranged haphazardly. In the back of the uterus eggs were not observed. The potential effectiveness of the experimental infection was $55.6\% \pm 4.6$. Could not get an equation to predict the number of eggs / female. The description of *T. spiralis* in experimental conditions would provide a baseline model, from which it would be possible to reference changes that might occur in the parameters evaluated in studies of drugs, or any substance probiotic therapeutic or prophylactic use in trichinellosis.

KEY WORDS: *Trichinella spiralis*, morphology, fertility, larviposition.

INTRODUCCIÓN

Los nematodos del género *Trichinella* son agentes etiológicos de una zoonosis cosmopolita conocida como trichinellosis, que se presenta en carnívoros salvajes y sinantrópicos, en omnívoros (mamíferos, aves y reptiles) y en cerdos, caballos y otros animales domésticos [1]. El hombre adquiere esta parasitosis por el consumo de carnes crudas o poco cocidas y/o sus productos conteniendo larvas de *Trichinella*. El género *Trichinella* pertenece a la Familia Trichinellidae, Superfamilia Trichinelloidea. Los miembros de esta Superfamilia se caracterizan por presentar una región glandular en el esófago conocida como esticosoma, una característica morfológica que está ausente en otros nematodos [2].

Trichinella spiralis presenta dos estados; adulto y larval, este último con dos estadios: larva recién nacida (LRN) y larva enquistada en músculo o larva infectante (LI). Los adultos presentan sexos separados, cuerpo filiforme, cilíndrico y blanquecino [3]. Las hembras muestran la porción anterior del cuerpo terminada en una punta y la posterior más ancha, miden de 1,26 a 3,35 mm de largo por 0,029 a 0,038 mm de ancho [4]. El aparato reproductor consiste en un único ovario ubicado en la región posterior, detrás del útero y cerca de la abertura anal, un receptáculo seminal, un útero, una vagina

que se extiende en la parte posterior hasta el útero y la vulva que se abre en la porción anterior, aproximadamente al final del esticosoma [3]. La hembra es vivípara, los huevos se forman en la zona germinal de la pared del ovario y el embrión crece, se elonga y eclosiona mientras viaja a través del útero. Se observan huevos inmaduros en la parte posterior del tracto reproductivo y huevos maduros cerca de la parte anterior. Los embriones, en etapas de desarrollo temprano consisten en numerosas células pequeñas, rodeadas por una membrana. A medida que maduran se van desprendiendo de sus cubiertas y las dejan en el útero, para abandonar el cuerpo materno como LRN [4]. Los machos presentan sus extremidades anterior y posterior muy delgadas y son más pequeños que las hembras, miden de 0,62 a 1,58 mm de largo por 0,025 a 0,033 mm de ancho. En el extremo posterior muestran dos apéndices cónicos que favorecen la sujeción de la hembra durante la cópula [1].

La infestación por este parásito ocurre cuando un hospedador susceptible ingiere carne cruda o mal cocida con larvas (L1) enquistadas en músculo [5, 6]. Las larvas ingeridas, son liberadas en el estómago por la acción de la pepsina y el ácido clorhídrico y luego alcanzan el duodeno donde invaden el epitelio columnar [7, 8]. En esta localización, las larvas mudan 4

veces (10 a 28 h post-infección), transformándose en adultos machos y hembras [9-11]. El apareamiento ocurre 30 a 34 h post- infección [11] y la hembra grávida incuba los huevos en el útero. A los cinco o seis días post-infección las hembras comienzan a liberar LRN. La producción de LRN continúa por una o dos semanas más, dependiendo de la respuesta inmune del hospedador a nivel intestinal, que una vez desarrollada induce la expulsión de los vermes adultos [11]. Las LRN migran directamente a los vasos linfáticos y desde allí a los vasos sanguíneos para alcanzar las células musculares estriadas, en las cuales penetran activamente.

La reproducción de una parasitosis en un modelo animal permite adquirir conocimiento sobre la enfermedad y la biología del parásito. Dicho conocimiento básico es indispensable para el abordaje de otros estudios, como probar la efectividad de nuevos fármacos, evaluar la eficacia de probióticos o la realización de estudios inmunológicos.

Las ratas son hospedadores naturales de *T. spiralis* e importantes en el mantenimiento de este parásito en la naturaleza [12]. En el laboratorio, han sido inestimables para el sustento y provisión de *T. spiralis* para realizar innumerable cantidad de estudios [13]. Por lo expuesto, se utilizó al ratón como modelo experimental de

trichinellosis y se estudiaron las características morfológicas y biológicas de *Trichinella spiralis* según los siguientes objetivos: Obtener parámetros morfológicos de adultos; Estimar la fecundidad como N° de Huevos/hembra de 5° día post-infestación; Observar la disposición, tamaño y forma de los huevos en el útero; Hallar una ecuación para predecir el número de huevos/hembra y Estimar el porcentaje de Efectividad Potencial de la infestación experimental.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se trabajó con ratones BALB/c de $41,3 \pm 0,79$ g de peso, mantenidos con alimento balanceado, suministrados por el Bioterio del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur.

Cepa de *T. spiralis*

La cepa de *Trichinella* que se utilizó en este trabajo fue tipificada por PCR (reacción de polimerasa en cadena) en el Centro Internacional de Referencia (Italia, Roma) por el Dr. E. Pozio, como *T. spiralis* (BBSC 01), y mantenida por repiques sucesivos en ratones BALB/c.

Obtención del inóculo

Un ratón infestado con *T. spiralis* cepa BBSC 01 fue sacrificado de acuerdo con

las normas establecidas por la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 2010 [14]. Posteriormente, su musculatura fue procesada por el método de digestión artificial [15] para la obtención y recuento de larvas libres, las que luego fueron colocadas en solución fisiológica para obtener una concentración de 800 larvas libres/ml. La viabilidad de las larvas se evidenció mediante la coloración de azul de metileno [16]. Para determinar el número de parásitos presentes en materia fecal se utilizó la técnica de Mc Master modificada [17].

Inoculación y tratamiento de los ratones

El día cero tres ratones recibieron, vía oral, 3 ml del digesto (2.400 larvas L1 de *T. spiralis* cepa BBSC 01). A los 5 días post-infestación, los animales se sacrificaron [14] y se extrajeron los intestinos. Se investigó la presencia de parásitos en el contenido y en la mucosa intestinal. Cada intestino se lavó con 20 ml de formol 5% en solución salina 0,9%. En el líquido de lavado obtenido se realizó el recuento de parásitos.

Morfometría y recuento de huevos

Los parásitos requeridos para realizar los estudios morfológicos y morfométricos, se obtuvieron por digestión artificial de la totalidad del intestino delgado de cada uno de los tres ratones. En el digesto obtenido

se realizó el recuento de parásitos y posteriormente se tomaron alícuotas de 100 µl las que fueron observadas bajo lupa con 2 y 4 aumentos. Para obtener los parámetros morfológicos, el número de alícuotas fue el necesario para conseguir 30 ejemplares de cada sexo, por ratón (como se utilizaron 3 ratones, se estudiaron, en total 180 ejemplares de *T. spiralis*). Las observaciones de los parásitos y de los huevos se realizaron en un microscopio Bausch & Lomb con micrómetro de ocular calibrado. Los adultos fueron medidos con ocular 10X. La estimación del Número de Huevos por hembra (NH) y la medición de los mismos, se realizó por observación microscópica a 40X. Los parámetros morfológicos estudiados fueron: largo (LC) y ancho (AC) del cuerpo, largo de diferentes secciones del útero: largo del útero (LU), largo de la parte anterior del mismo (LUa), largo de la parte media (LUm), largo de la parte posterior (LUp) y número de huevos por hembra (NH).

Para determinar si existía un componente de varianza debido a los diferentes hospedadores (ratones), se aplicó ANOVA Simple [18]. Se utilizaron procedimientos clásicos de estadística descriptiva.

Disposición, tamaño y forma de los huevos

La descripción de la disposición de los huevos en el útero se realizó por observación microscópica directa a 40X, de las hembras (n = 25) obtenidas del digesto intestinal. Las variables consideradas fueron: Diámetro Máximo del Huevo (DMáxH) y Diámetro Mínimo del Huevo (DMínH).

Para determinar si había cambios en el "Tamaño" y la "Forma" de los huevos a lo largo del útero, se consideró la parte anterior y media del mismo, dividiéndose esta última en 2 zonas: anterior y posterior. Se midieron huevos en cada zona, quedando un diseño de ANOVA Doble mixto [18]. Las hembras constituyeron el Factor Aleatorio y las partes del útero, el factor Fijo. Las variables analizadas para estimar el *Tamaño*, fueron: Diámetro Medio del huevo (DMedH) donde $D_{MedH} = (D_{MáxH} + D_{MínH})/2$, mientras que, para la *Forma*, se utilizó la relación entre los diámetros = $D_{MáxH} / D_{MínH}$.

Las comparaciones de a pares entre las distintas partes del útero se realizaron con Diferencia Mínima Significativa (DMS) (Sokal y Rohlf, 1981).

Estimación de NH en función de parámetros morfológicos

Para hallar una ecuación para predecir NH a partir de datos morfológicos se aplicó Regresión Lineal Simple y Múltiple [18],

donde la variable dependiente fue el NH y las variables Predictoras: LC, LU y LUm.

Efectividad Potencial de la infección experimental

Para estimar la Efectividad Potencial (EP) de la infestación experimental con *T. spiralis*, en cada uno de los tres ratones, se procedió a contar diariamente, desde la inoculación, las larvas eliminadas por materia fecal, durante los cinco días previos al sacrificio de los animales. El EP (%) se calculó como: $EP (\%) = (LI - LE) \times 100 / LI$, donde LI = larvas inoculadas y LE = larvas eliminadas

Implantación Parasitaria

La Implantación Parasitaria (IP) se determinó contando los parásitos presentes en el digesto del intestino de cada uno de los ratones ensayados. La IP (%) se calculó como: $IP (\%) = PD \times 100 / LI$, donde PD = número de parásitos en el digesto intestinal y LI = larvas inoculadas

Análisis Estadístico de los Datos

Se utilizó el programa InfoStat/Profesional. Versión 1.1 (Universidad Nacional de Córdoba-Estadística y Diseño- F.C.A.).

Ilustraciones

Las fotografías se obtuvieron utilizando una cámara digital Kodak Easy Share C653 y un microscopio óptico Olympus

BX-51, con cámara digital Olympus C7070.

RESULTADOS

Morfometría de adultos y recuento de huevos

Los resultados de los valores medios, mínimos y máximos de los parámetros morfológicos medidos en adultos, machos y hembras de *T. spiralis* cepa BBSC 01 y la estimación de NH, se muestran en la Tabla I y en las Figuras 1 a 6.

El grado de precisión con que se realizaron las mediciones no permitió detectar variaciones en AC ni en machos ni hembras. En todos los machos y en la mayoría de las hembras, los valores de AC resultaron iguales a 0,04 mm. En algunas hembras, AC fue 0,05 mm. En cuanto al LC de los machos no se hallaron diferencias significativas debidas a los ratones ($p > 0,05$) por lo cual se consideró que no hay un componente aditivo de la varianza debida a los hospedadores.

En ninguno de los parámetros morfométricos tomados en las hembras se pudo hallar un componente de varianza significativo debido a los hospedadores.

Sólo en el caso de LU, el nivel de significación fue suficientemente cercano al 5% como para no descartarlo. Aún así, la estimación de su porcentaje reveló que

era despreciable (6% de la varianza en juego).

La fecundidad media de las hembras de 5° día post-infección, NH, fue de 147 huevos, con un mínimo de 81 y un máximo de 200 (Figura 6). No se halló un componente aditivo de la varianza debido a los hospedadores ($p \gg 0,05$)

Disposición, tamaño y forma de los huevos

En todas las partes del útero donde se observan huevos, éstos se acomodaron sin dejar espacios entre ellos.

En la parte anterior del útero: los huevos estaban ordenados en una sola hilera y presentaron forma cuboidal (Figura 7). DMedH: 18,6 μm .

En la parte media anterior del útero: los huevos se acomodaron en tres o cuatro hileras ocupándolo completamente. Se observó gran diversidad de formas (Figura 8). DMedH: 17,5 μm .

En la parte media posterior: se observó una disposición desordenada de los huevos. Presentaban forma esférica. Se pudo observar esperma en la base del útero (Figura 9). DMedH: 1,049 μm .

En la parte posterior del útero: no se visualizaron huevos definidos, sólo se distinguieron numerosas células pequeñas con núcleo prominente (Figura 10).

Tabla I: Estadística descriptiva de cada variable.

Table I: Descriptive Statistics of each variable.

Parámetros morfológicos*	Media	SD	Mínimo	Máximo
LC (machos)	1,0424	0,039	0,97	1,15
LC (hembras)	1,8403	0,1356	1,42	2,12
LU	1,3502	0,1476	0,95	1,74
LUa	0,1414	0,0516	0	0,26
LUm	0,9008	0,1416	0,51	1,26
LUp	0,308	0,053	0,19	0,45
NH	147,34	23,62	81	200

* n = 90 ejemplares

SD: Desviación estándar; LC: Largo del Cuerpo machos (mm); LC: Largo del Cuerpo; hembras (mm); LU: Largo del Útero (mm); LUa: Largo anterior del Útero (mm); LUm: Largo medio del Útero (mm); LUp: Largo posterior del Útero (mm); NH: Número de Huevos por hembra.

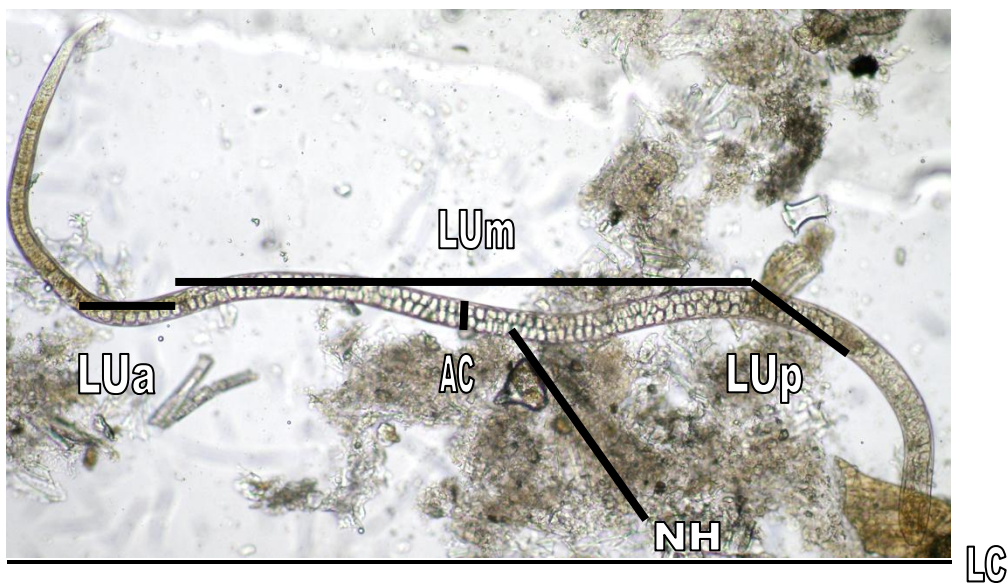


Figura 1: Hembra de *Trichinella spiralis*. Parámetros morfológicos

Referencias: AC: Ancho del Cuerpo; LC: Largo del Cuerpo; LU Largo del Útero; LUa: Largo del Útero anterior; LUm: Largo del Útero medio; LUp: Largo del Útero posterior; NH: Huevos. Magnificación: 400 aumentos.

Figure 1: *T. spiralis* female. Morphological Parameters

References: AC: Width of Body; LC: Length of Body; LU Length of Uterus; LUa: Length of Uterus- anterior part; LUm: Length of Uterus- middle; LUp: Length of Uterus- posterior part; NH: Eggs. Magnification: 400X.

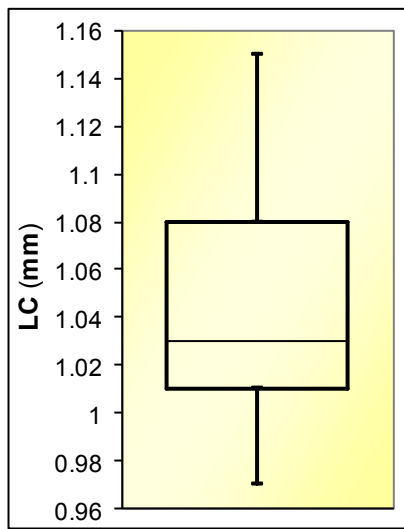


Figura 2

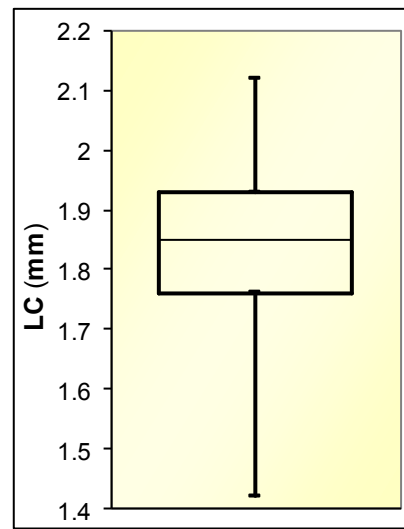


Figura 3

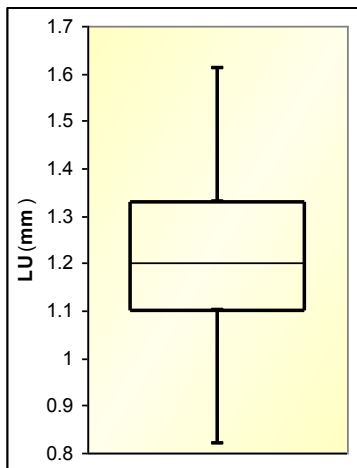


Figura 4

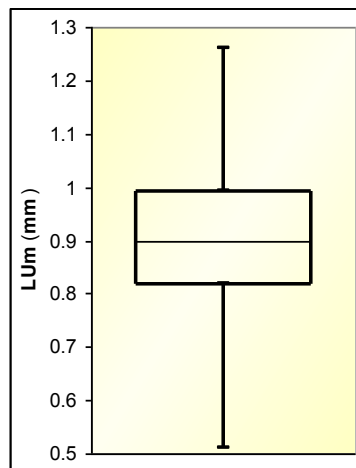


Figura 5

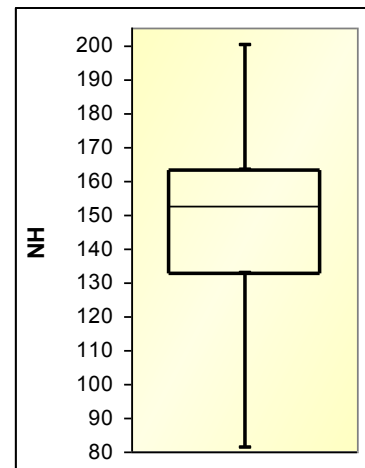


Figura 6

Figura 2: Largo del cuerpo de los machos (n=90) LC: Largo del Cuerpo.

Figura 3: Largo del cuerpo de las hembras (n=90) LC: Largo del Cuerpo.

Figura 4: Largo del útero (n=90) LU: Largo del Útero.

Figura 5: Largo del útero medio (n=90) LUM: Largo del Útero medio.

Figura 6: Número de huevos por hembra (n=90) NH: Número de Huevos por hembra.

Figure 2: Length of Body in Males (n=90) LB: Length of Body.

Figure 3: Length of Body in Females (n=90) LB: Length of Body

Figure 4: Length of Uterus (n=90) LU: Length of Uterus.

Figure 5: Length of Uterus- middle (n=90) LUM: Length of Uterus- middle.

Figure 6: Number of Eggs per Female (n=90) NE: Number of Eggs per Female.

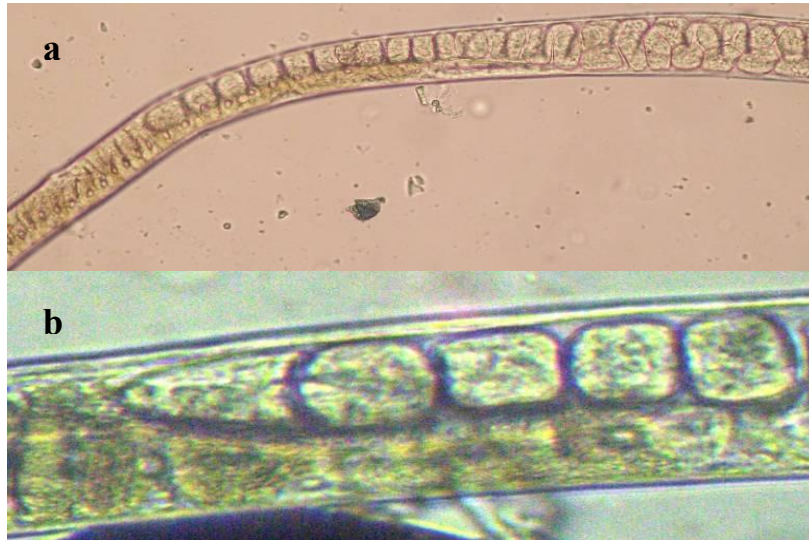


Figura 7: Hembra de *Trichinella spiralis* de 5° día post-infestación. Disposición, tamaño y forma de los huevos en la parte anterior del útero. Se disponen en una hilera y presentan forma cuboidal. Diámetro medio del huevo (DMedH): 18,6 μm . a- Observación a 100 aumentos. b- Observación a 400 aumentos.

Figure 7: Female of *Trichinella spiralis* on 5th day post-infestation. Layout, size and shape of eggs in the anterior part of the uterus. They are laid in a row and have a mesothelial shape. Mean diameter of eggs (DMedH): 18.6 μm . a- Observation to 100 X. b- Observation to 400 X



Figura 8: Hembra de *Trichinella spiralis* de 5° día post-infestación. Disposición, tamaño y forma de los huevos en la parte media anterior del útero. Se disponen en tres o cuatro hileras. Se observa gran diversidad de formas. Diámetro medio del huevo (DMedH): 17,5 μm . a- Observación a 400 aumentos. b. c y d- Observación a 450 aumentos.

Figure 8: Female of *Trichinella spiralis* on 5th day post-infestation. Layout, size and shape of eggs in the middle front / anterior part of the uterus. They are laid in three or four rows and have a variety of shapes. Mean diameter of eggs (DMedH): 17,5 μm . Observation to 400 X b, c, and d. Observation to 450 X.

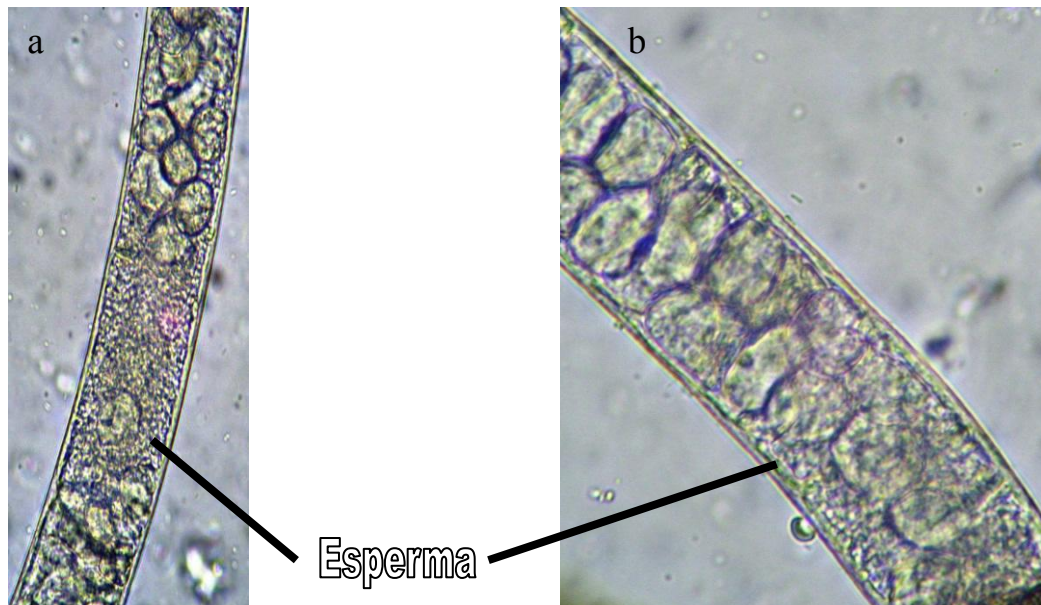


Figura 9: Hembra de *Trichinella spiralis* de 5° día post-infestación. Disposición, tamaño y forma de los huevos en la parte media posterior del útero. Se observa una disposición desordenada de los huevos. Se presentan en forma esférica. Diámetro medio del huevo (DMedH): 1,049 μm . Se observa esperma en la base del útero. a. Observación a 400 aumentos. b. Observación a 1000 aumentos.

Figure 9: Female of *Trichinella spiralis* on 5th day post-infestation. Layout, size and shape of eggs in the middle back part of the uterus. There is disorderly array of eggs. They have a spherical shape. Mean diameter of eggs (DMedH): 1,049 μm . Sperm is seen in the base of the uterus. a. Observation to 400 X. b. Observation to 1000 X.

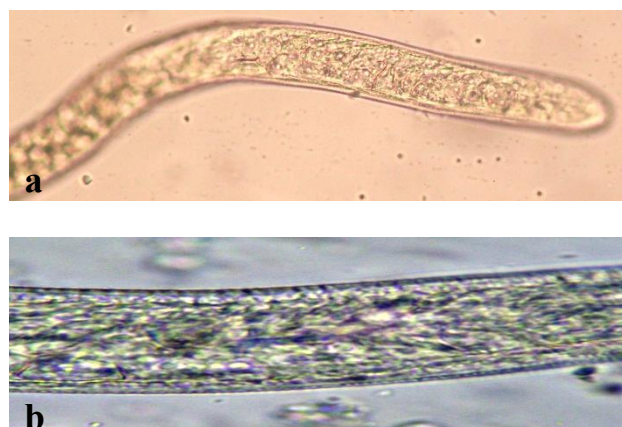


Figura 10: Hembra de *Trichinella spiralis* de 5° día post-infestación. Parte posterior del útero. Se observa que no hay huevos definidos, sólo se distinguen numerosas células pequeñas (cp) con núcleo prominente. a. Observación a 400 aumentos. b. Observación a 1000 aumentos.

Figure 10: Female of *Trichinella spiralis* on 5th day post-infestation. Back of the uterus. No defined eggs are observed, only many small cells (cp) with prominent nucleus. a. Observation to 400 X. b. Observation to 1000 X.

Los huevos variaban en tamaño en las distintas partes del útero siendo cada vez más pequeños a medida que se avanzaba hacia la parte posterior del útero (Figura 11). La mayor variación en el tamaño de los huevos se debió principalmente a la posición que ocupaban dentro del útero, siendo relativamente muy pequeña la contribución debido al comportamiento diferencial de las partes en las distintas hembras (interacción hembras - partes del útero). El resto de la variación es la que tienen los huevos dentro de una misma parte y que pertenecen a la misma hembra (Figura 12). El grado de precisión con que se realizaron las mediciones de los diámetros máximos y mínimos de los huevos (2,5 mm), determinó una discretización en sólo 6 valores diferentes en un rango de 12,5 a 25 mm. Los huevos de la parte media posterior fueron en promedio, más esféricos que los huevos en el resto del útero (Figura 13). La variación en la forma de los huevos dependió fundamentalmente de la posición que ocuparon los mismos dentro del útero (Figura 14).

Estimación de NH en función de parámetros morfológicos

Todos los modelos lineales con una sola variable ajustaron razonablemente, los gráficos no presentaron curvaturas marcadas ni datos sospechosos que

podieran haber influido en la estimación de los parámetros (Figuras 15 a 17).

En todos los modelos la regresión lineal fue altamente significativa. Sin embargo, ninguno de los modelos tuvo un porcentaje de explicación suficiente como para poder predecir NH de manera precisa (los R^2 fueron alrededor del 30%). Como el agregado de otra variable podría aumentar el porcentaje de explicación, se optó por seleccionar el Modelo simple de mayor R^2 (LC), y observar cuál de las variables restantes producía una adición significativa. Sin embargo ninguna de las variables, pudo ser utilizada para predecir el NH con suficiente precisión.

Los valores de EP (%) e IP (%) se presentan en las Tablas II y III respectivamente.

DISCUSIÓN

La descripción morfológica de un parásito es de gran importancia para comprender la biología, el ciclo de vida y los efectos patogénicos en el hospedador [19]. Nuestro estudio aportó un modelo basal de trichinellosis a partir del cual referenciar los cambios que pudieran ocurrir en los parámetros estudiados cuando se modifican las condiciones experimentales. Resultaría de aplicabilidad cuando se realicen trabajos en los que se prueben fármacos, probióticos o cualquier sustancia

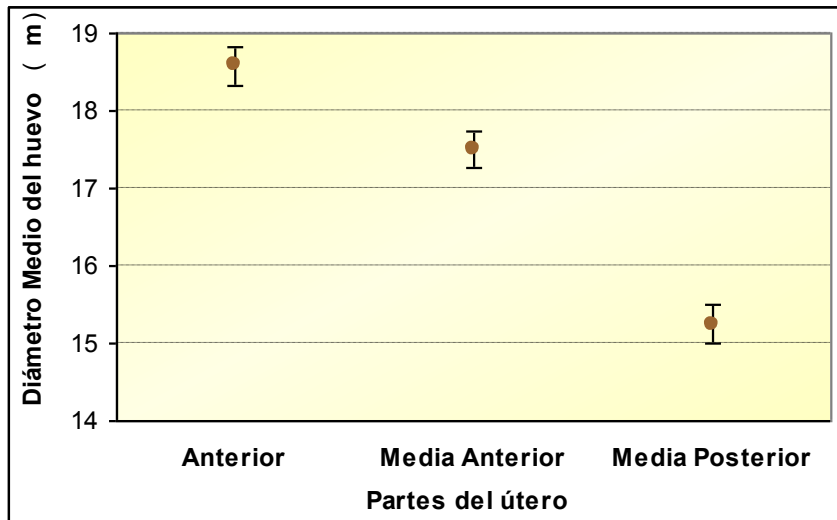


Figura 11: Comparación del tamaño de los huevos (μm), Diámetro medio del huevo (DMedH), respecto de las partes del útero: Anterior, Media anterior y Media posterior.

Figure 11: Comparison of size of eggs (μm), average/mean diameter of eggs (DMedH), in respect of the parts of the uterus: anterior, middle anterior and middle posterior.

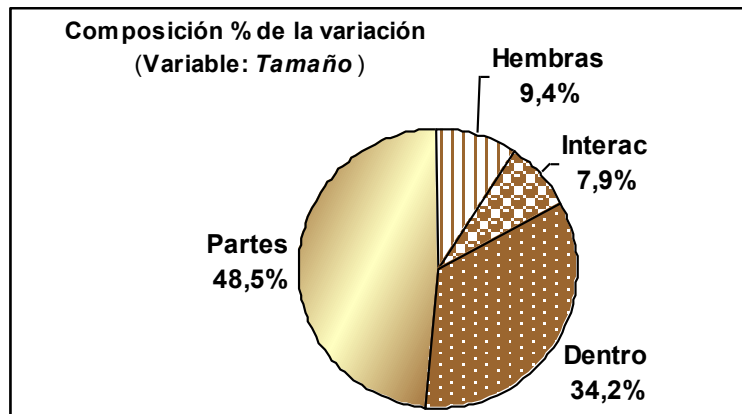


Figura 12: Composición (%) de la variación (Variable: Tamaño).

Figure 12: Composition (%) of the variation (Variable: Size).

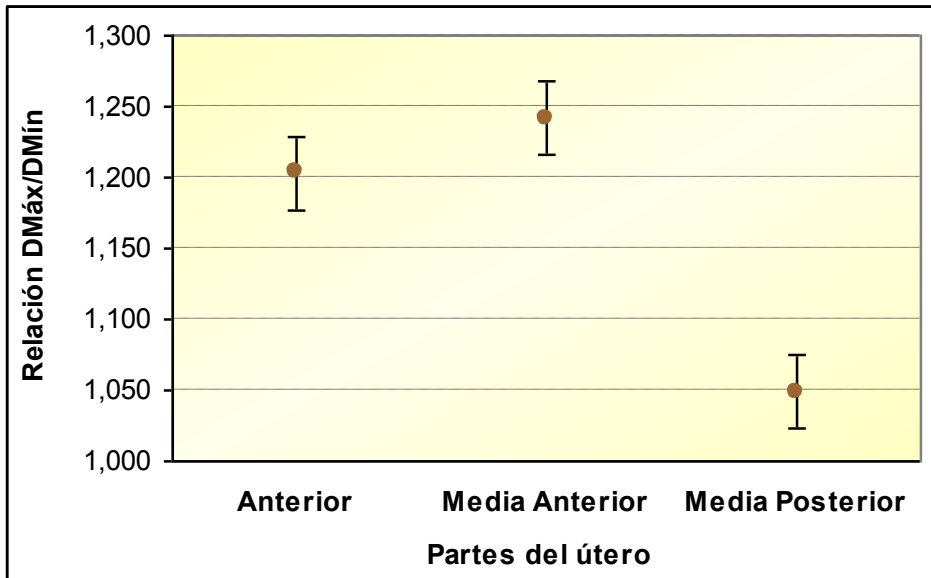


Figura 13: Comparación de la Forma de los huevos: relación entre los diámetros (DMáxH / DMínH), respecto de las partes del útero: Anterior, Media anterior y Media posterior.

Figure 13: Comparison of shape of the eggs: relationship between diameters (DMáxH / DMínH), in respect of the parts of the uterus: anterior, middle anterior and middle posterior.

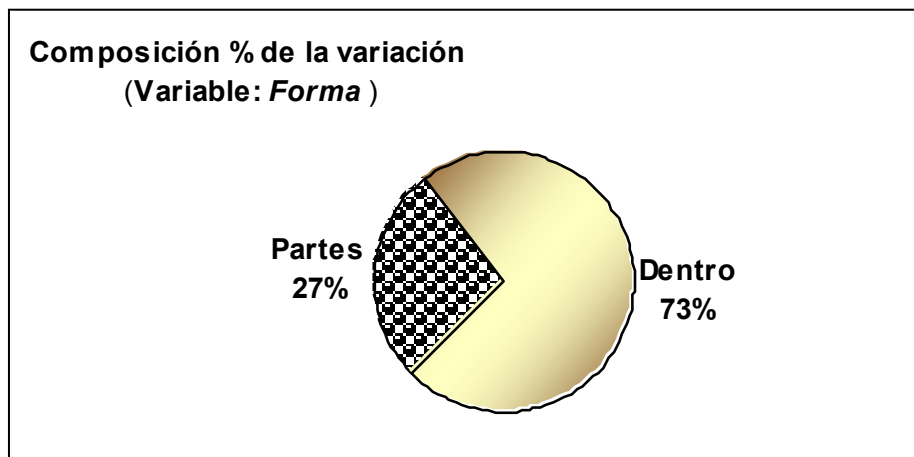


Figura 14: Composición % de la variación (Variable: Forma).

Figure 14: Percentage composition of the variation (Variable: Shape).

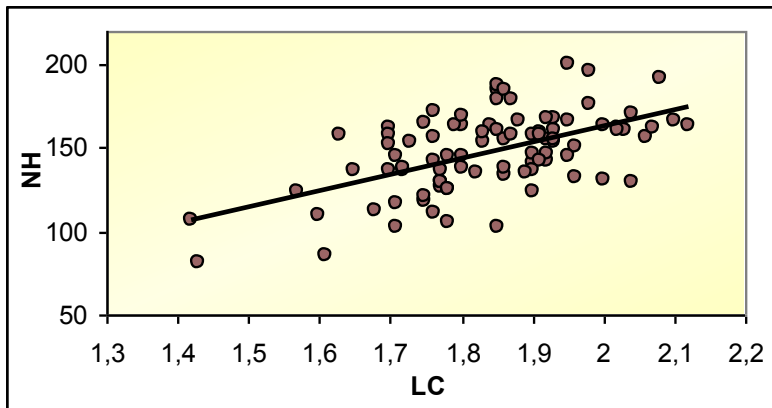


Figura 15: Regresión lineal. Variable dependiente: NH. Variable Predictoria: LC
Referencias: NH: Número de Huevos; LC: Largo del Cuerpo.
Ecuación: $NH = - 31.98 + 97.44 LC$ Significación de la Regresión: Estadístico "t" = 6.33 ($p < 0.0001$): Porcentaje de explicación del modelo: $R^2 = 0.313$ (31.3%).

Figure 15: Linear regression. Dependent variable: NE. Variable Predictoria: LB
References: NE: number of eggs; LB: Length of the body.
Equation: $NE = - 31.98 + 97.44 LB$. Significance of the regression: Statistical "t" = 6.33 ($p < 0.0001$): percentage of explanation of the model: $R^2 = 0.313$ (31.3%).

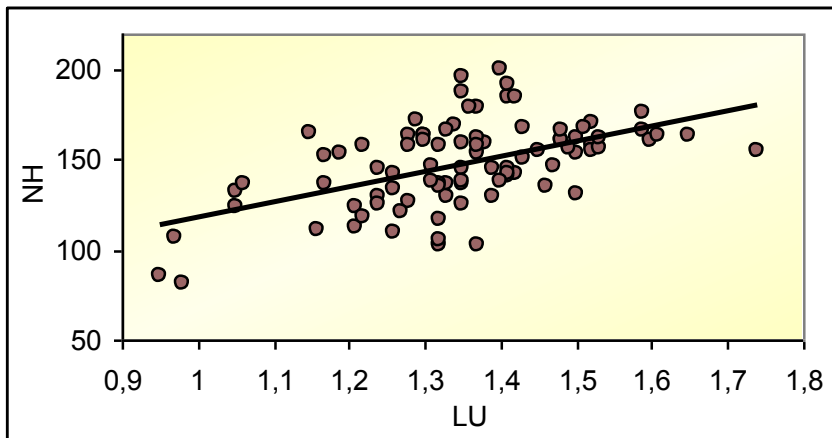


Figura 16: Regresión lineal. Variable dependiente: NH. Variable Predictoria: LC
Referencias: NH: Número de Huevos; LC: Largo del Cuerpo.
Ecuación: $NH = 32.487 + 85.065 LU$ Significación de la Regresión: Estadístico "t" = 5.886 ($p < 0.0001$). Porcentaje de explicación del modelo: $R^2 = 0.2825$ (28.25%).

Figure 16: Linear regression. Dependent variable: NE. Variable Predictoria: LB
References: NE: number of eggs; LB: Length of the body.
Equation: $NE = 32.487 + 85.065 LU$.
Significance of the regression: Statistical "t" = 5.886 ($p < 0.0001$)
Percentage of explanation of the model: $R^2 = 0.2825$ (28.25%).

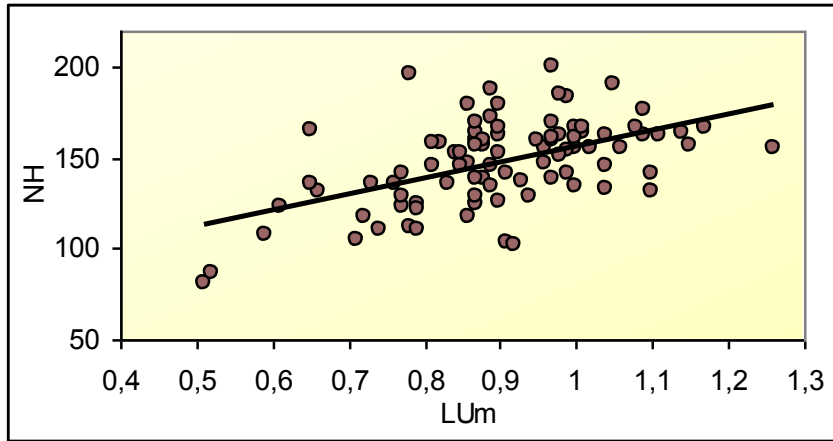


Figura 17: Regresión lineal. Variable dependiente: NH. Variable Predictoria: LC
Referencias: NH: Número de Huevos; LC: Largo del Cuerpo.
Ecuación: $NH = 67.33 + 88.824 LUm$. Significación de la Regresión:
Estadístico "t" = 5.90 ($p < 0.0001$). Porcentaje de explicación del modelo: $R^2 = 0.2835$ (28.35%).

Figure 17: Linear regression. Dependent variable: NE. Variable Predictoria: LB
References: NE: number of eggs; LB: Length of the body.
Equation: $NE = 67.33 + 88.824 LUm$.
Significance of the regression: Statistical "t" = 5.90 ($p < 0.0001$).
Percentage of explanation of the model: $R^2 = 0.2835$ (28.35%).

Tabla II: Porcentajes de la Efectividad Potencial de la infestación experimental.
Table II: Percentages of the Potential Effectiveness of the experimental infestation.

Ratón	LE*	LI†-LE	EP(%)‡
M1	1193	1207	50,3
M2	985	1415	58,9
M3	1018	1382	57,6
Media			55,6 ± 4,6

R: Ratón LE: Larvas Eliminadas por materia fecal. * Eliminadas durante los cinco días previos al sacrificio de los animales; LI: Larvas Inoculadas. † Inóculo de 2400 larvas; EP (%): Porcentaje de Efectividad Potencial. ‡ $EP (\%) = (LI-LE) \times 100 / LI$

Tabla III: Porcentaje de Implantación Parasitaria.
Table III: Percentage of Parasite Implantation.

Ratón	PD*	IP(%)†
M1	720	30
M2	753	31,4
M3	770	32,1
Media		31,2% ±1,07

R: Ratón; PD: Número de Parásitos en el Digesto intestinal; * Inóculo de 2400 larvas; IP (%): Porcentaje de Implantación Parasitaria; † $IP (\%) = PD \times 100 / LI$

de uso terapéutico o profiláctico contra esta parasitosis. Es incesante la búsqueda de nuevos fármacos para la etapa temprana, o fase intestinal, con el propósito de bloquear el establecimiento y la fecundidad del parásito adulto [20]. Se ha comprobado que algunas sustancias producen una disminución en la implantación parasitaria y reducen la fecundidad de las hembras [20-22]. Por lo tanto, es fundamental el conocimiento sobre la implantación y la fecundidad de *T. spiralis* en un modelo animal, en esta etapa del ciclo. Las hembras grávidas de *T. spiralis* larviponen a partir del 5^{to} o 6^{to} día post infestación, tanto *in vitro* como *in vivo* [23]. Los estudios *in vitro* que han estimado la fecundidad de la hembra [24] no pueden ser extrapolados a lo que sucede *in vivo* y dada la localización de la hembra en el intestino, no existe demasiada información sobre lo que sucede en el hospedador. Por lo tanto fue de interés estimar el potencial reproductivo de hembras individuales en ratones experimentalmente infectados. Se decidió estudiar las hembras de 5^o día post-infección porque en esta etapa del ciclo biológico se observan huevos en el útero y no larvas que aparecen horas más tarde. Además, en ese momento del ciclo no hay desarrollo de respuesta inmune por parte del hospedador [13] lo que podría alterar o dañar a los parásitos y modificar los

parámetros morfológicos estudiados y/o la fecundidad de las hembras. Si bien, no se puede predecir cuál será la tasa de larviposición durante el desarrollo del ciclo biológico, el conocimiento de la fecundidad de las hembras, hallado en el modelo estudiado en el 5^o día post-infección, permitiría inferir un valor mínimo de larviposición, equivalente al número de huevos. Los datos de larviposición informados en la literatura son muy dispares y de rangos muy amplios (60 a 2000 LRN por hembra), lo que depende fundamentalmente del hospedador [25, 26].

Ninguno de los modelos estadísticos aplicados tuvo un porcentaje de explicación suficiente como para poder predecir el NH por hembra de manera precisa a partir de los parámetros morfológicos medidos.

Los tamaños de los ejemplares adultos obtenidos en el modelo experimental estudiado fueron más cortos, más cercanos a la medida mínima informada por la literatura [1] y ligeramente más anchos.

El nivel de infectividad de *T. spiralis* está en relación con los caracteres del hospedador, el número de parásitos que se establecen, el grado de inmunidad y la cepa infestante. En el modelo animal utilizado en nuestro estudio, la *Efectividad Potencial* de la infección experimental y el porcentaje de *Implantación Parasitaria*

hallados, fueron compatibles con los resultados obtenidos por otros autores [1, 3].

Consideramos que el conocimiento de los parámetros estimados en nuestro trabajo tendría gran aplicabilidad en estudios de investigación que reproduzcan la Trichinellosis en el modelo murino.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Ricardo Camina por el asesoramiento estadístico y a la SECyT de la UNS por financiar el estudio.

LITERATURA CITADA

1. Pozio E. 2007. Chapter 1: Taxonomy, Biology and Epidemiology of *Trichinella* parasites. In: FAO/WHO/OIE Guidelines for de surveillance, management, prevention and control of Trichinellosis. Dupouy-Camet J, Murrell KD. (eds), p. 1-35.
2. Zarlenga DS, Rosenthal B, La Rosa G, Pozio E, Hoberg EP. 2006. An old genus learns new tricks: late Tertiary colonization and speciation of *Trichinella* nematodes among Eutheria. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 103: 7354-7359.
3. Valenzuela MR. 1981. Epidemiología de la Trichinellosis. *Ciencia Veterinaria* 3:1-332.
4. Takahashi Y, Goto C, Kita KK. 1995. Ultrastructural study of *Trichinella spiralis* with emphasis on adult female reproductive organs. *Journal of Helminthology* 69: 247-52.
5. Ali Khan Z. 1966. The postembryonic development of *Trichinella spiralis* with special reference to ecdysis. *Journal of Parasitology* 52: 48-59.
6. Kozek WJ. 1971. The molting pattern in *Trichinella spiralis*. I. A. light microscope study. *Journal of Parasitology* 57: 1015-1028.
7. Despommier D, Sukhdeo M, Meerovitch E.. 1978. *Trichinella spiralis*: site selection of the larva during the enteral phase of the infection in mice. *Experimental Parasitology* 44: 209-215.
8. Wright KA, Weidman E, Hong H. 1987. The distribution of cells killed by *Trichinella spiralis* in the mucosal epithelium of two strains of mice. *Journal of Parasitology* 73:935-39.
9. Bailey T, Schantz P. 1990. Trends in the incidence and transmission patterns of trichinosis in humans in the United States: comparisons of the periods 1975-1981 and 1982-1986. *Reviews of Infectious Diseases* 12: 5-11.
10. Capo V, Despommier D, Silberstein DS. 1984. The site of ecdysis of the L1 larvae of *T. spiralis*. *Journal of Parasitology* 70: 992-93.

11. La Rosa G, Tasciotti L, Pozio E. 1993. DNA repetitive probes for the characterization and identification of *Trichinella* parasites. In: Trichinellosis. Campbell WC, Pozio E, Bruschi F (eds). Rome: Istituto Superiore di Sanità Press. Roma, Italia, p. 89–94.
12. Leiby D, Duffy C, Murrell K, Schad G. 1990. *Trichinella spiralis* in an agricultural ecosystem: transmission in the rat population. *Journal of Parasitology* 76: 360–64.
13. Bell R. 1998. The generation and expression of immunity to *Trichinella spiralis* in laboratory rodents. *Advances in Parasitology* 41: 149–217.
14. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 2010. The National Academy Press. USA. p. 326.
15. Montali G, Cabral M, Plaza H. 1997. Diagnóstico de *Trichinella spiralis* por el método de digestión artificial. Publicación del Ministerio de Asuntos Agrarios. Provincia de Buenos Aires, Argentina.
16. Randazzo V, Costamagna SR. 2010. Coloración de azul de metileno como alternativa para determinar viabilidad de larvas libres de *Trichinella spiralis*. *Revista Argentina de Microbiología* 42: 95-97.
17. Robert F, O'Sullivan PJ. 1949. Methods for egg count and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research* 24: 947-953.
18. Sokal R, Rohlf F. 1981. Biometry. Freeman, W.H., and Co., New York, 2nd ed., 859 pp.
19. Takahashi Y, Yoshikawa Y, Furuki J, Yamada S, Araki T. 1987. Morphological study of *Trichinella spiralis*: an overall picture of a muscle larva as revealed by longitudinal sectioning. *Japanese Journal of Parasitology* 36: 361-366.
20. Jiménez Cardoso E, Caballero-García M, González R, Chapa Ruiz M., Vázquez-Bravo R, Ángeles-Anguiano E. 2006. Detection of the effect of *Usnea florida* lichen extract on the implantation and fertility of the adult stage of *Trichinella spiralis* in BALB/c mice. *Veterinaria México* 37: 43-50.
21. Garfías C, Fernández Roman A, Posadas Beltrán A, Rodríguez O. 2002. Increase of resistance against murine experimental *Trichinella spiralis* infection using *Lactobacillus casei*. *Veterinaria México* 33: 173-77.
22. Randazzo V, Costamagna S. 2005. Effect of oral administration of probiotic agents on *Trichinella spiralis*-infected mice. *Revista de Patología Tropical* 34: 55-59.
23. Ching-Hua W. 1997. Study of biological properties of *Trichinella spiralis* newborn larvae and the antiparasitic

- mucosal immunity of the host. *Frontiers in Bioscience* 2:317-30
24. Pozio E, La Rosa G, Rossi P, Murrell K. 1992. Biological characterization of *Trichinella* isolates various host species and geographical regions. *Journal of Parasitology* 78: 647-53.
25. Reveles HRG, Villalobos R, Saldivar S, Moreno MA. 1997. Implante histológico de *Trichinella spiralis* experimental. *Parasitología al Día* 22: 114 – 118.
26. Wakelin D, Denham DA. 1983. The immune response. In Campbell WC. (ed.), *Trichinella* and trichinosis. Plenum Press, New York p. 265–308.