



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

**VARIABILIDAD DE LA INTERACCIÓN PARÁSITO-HOSPEDADOR DE
DIFERENTES GENOTIPOS *Mus musculus* AL DESAFÍO
EXPERIMENTAL CON *Trichinella spiralis***

AUTOR: M.V. González Beltrán, Silvina

DIRECTOR: Dr. M.V. Giudici, Claudio Juan

Cátedra de Enfermedades Parasitarias. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNR

2020

A Pablo, mi compañero de vida.

Sin vos, nada es posible.

A mi familia, por su amor y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A mi director, el Dr. Claudio Giudici, por darme la oportunidad de transitar este camino tan importante, acompañarme y alentarme en todo momento a alcanzar la meta.

A la Dra. María Inés Oyarzabal, por su inmensa generosidad y por brindarme sus conocimientos, paciencia y consejos siempre que los necesité.

A mis compañeros y AMIGOS de la cátedra Enfermedades Parasitarias, los M.V. Perla Negro, Amilcar Bassi, Diana Bonifacio, Gerardo Arduoso y Fernando Pagano por apoyarme de manera incondicional, animándome constantemente a crecer tanto personal como profesionalmente.

Al Dr. Germán Coscelli, que con mucha paciencia y generosa colaboración me ayudó a realizar la sección de histopatología de esta tesis.

Al M.V. Nicolás Orozco por su compañerismo y entusiasmo ante cada desafío compartido.

A las M.V. Cora Colla y Melina Gines y a la Técnica Gisel Schroder, del Laboratorio de Análisis Clínicos, Hospital Escuela de Grandes y Pequeños Animales por su valioso aporte a este trabajo.

ÍNDICE

| | | |
|---|-------|---------|
| RESUMEN | | pág. 1 |
| ABSTRACT | | pág. 4 |
| 1. INTRODUCCIÓN | | pág. 7 |
| 1.1. BREVE HISTORIA DE LA TRICHINELLOSIS | | pág. 7 |
| 1.2. TAXONOMÍA Y ESPECIES | | pág. 8 |
| Especies encapsuladas | | pág. 9 |
| Especies no encapsuladas | | pág. 12 |
| Especies de <i>Trichinella</i> halladas en Argentina | | pág. 13 |
| 1.3. MORFOLOGÍA | | pág. 15 |
| 1.4. CICLO BIOLÓGICO | | pág. 18 |
| 1.5. INTERACCIÓN PARÁSITO-HOSPEDADOR | | pág. 21 |
| RESPUESTA INMUNE | | pág. 23 |
| RESPUESTA INMUNE INNATA | | pág. 23 |
| RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA | | pág. 27 |
| Expulsión de nematodos intestinales | | pág. 30 |
| Etapa de enquistamiento muscular | | pág. 32 |
| 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | | pág. 35 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | | pág. 37 |
| 3.1. ANIMALES EXPERIMENTALES | | pág. 37 |
| Líneas derivadas de la cepa CF1 | | pág. 37 |
| Población derivada de la cepa C57BL/6 | | pág. 40 |
| Condiciones de alojamiento y manejo | | pág. 41 |
| 3.2. ORIGEN Y MANTENIMIENTO DE <i>Trichinella spiralis</i> | | pág. 42 |
| 3.3. INFECCIÓN DE LOS RATONES CON <i>Trichinella spiralis</i> | | pág. 42 |
| Obtención de las larvas L1 infectivas | | pág. 42 |
| Preparación de las dosis infectivas e inoculación | | pág. 43 |

| | | |
|---|-------|---------|
| 3.4. COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA AL DESAFÍO CON <i>Trichinella spiralis</i> DE LÍNEAS DERIVADAS DE CF1 EN DIFERENTES ETAPAS DEL CICLO BIOLÓGICO | | pág. 44 |
| 3.4.1. FASE ENTERAL DE LA INFECCIÓN | | pág. 44 |
| Etapa intestinal temprana. Comparación del número de parásitos adultos en las cinco líneas a los tres días post-infección | | pág. 44 |
| Etapa intestinal tardía. Comparación del número de parásitos adultos en las cinco líneas a los 15 días post-infección | | pág. 45 |
| 3.4.2. FASE PARENTERAL DE LA INFECCIÓN. ENQUISTAMIENTO | | pág. 46 |
| 3.5. EFECTO DE LA INFECCIÓN CON <i>Trichinella spiralis</i> EN LA COMPOSICIÓN SANGUÍNEA DE LAS LÍNEAS DERIVADAS DE LA CEPA CF1 | | pág. 48 |
| Determinación de la fórmula leucocitaria relativa y hematocrito | | pág. 48 |
| 3.6. EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA DEL INTESTINO | | pág. 49 |
| 3.7. ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DE <i>Trichinella spiralis</i> EN C57BL/6 LUEGO DE UN PASAJE POR LAS LÍNEAS SELECCIONADAS | | pág. 52 |
| 3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | | pág. 54 |
| 4. RESULTADOS | | pág. 56 |
| 4.1. COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA AL DESAFÍO CON <i>Trichinella spiralis</i> DE LÍNEAS DERIVADAS DE CF1 EN DIFERENTES ETAPAS DEL CICLO BIOLÓGICO | | pág. 56 |
| 4.1.1. FASE ENTERAL DE LA INFECCIÓN | | pág. 56 |
| Etapa intestinal temprana. Comparación del número de parásitos adultos en las cinco líneas a los tres días post-infección | | pág. 56 |
| Etapa intestinal tardía. Comparación del número de parásitos adultos en las cinco líneas a los 15 días post-infección | | pág. 57 |
| 4.1.2. FASE PARENTERAL DE LA INFECCIÓN. ENQUISTAMIENTO | | pág. 58 |

| | |
|--|---------|
| 4.2. EFECTO DE LA INFECCIÓN CON <i>Trichinella spiralis</i> EN LA COMPOSICIÓN SANGUÍNEA DE LAS LÍNEAS DERIVADAS DE LA CEPA CF1 | pág. 62 |
| Determinación de la fórmula leucocitaria relativa y hematocrito | pág. 62 |
| 4.3. EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA DEL INTESTINO | pág. 67 |
| 4.4. ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DE <i>Trichinella spiralis</i> EN C57BL/6 LUEGO DE UN PASAJE POR LAS LÍNEAS SELECCIONADAS | pág. 74 |
| 5. DISCUSIÓN | pág. 76 |
| 6. CONCLUSIONES | pág. 92 |
| 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | pág. 95 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|--|-------|---------|
| Tabla 1. Peso corporal de los ratones previo al desafío con el parásito y a los 3 días post-infección, por línea | | pág. 56 |
| Tabla 2. Número de adultos de <i>T. spiralis</i> presentes en el intestino y la proporción de larvas establecidas en el intestino a los 3 días post-infección, por línea de ratones | | pág. 56 |
| Tabla 3. Peso corporal de los ratones previo al desafío con el parásito y a los 15 días post-infección, por línea | | pág. 57 |
| Tabla 4. Número de adultos de <i>T. spiralis</i> presentes en intestino (NA15) y proporción de expulsión de gusanos adultos a los 15 días post-infección, por línea ratones, con respecto la dosis infectante (PE) y adultos establecidos (PE(NA3)) | | pág. 58 |
| Tabla 5: Peso corporal de los ratones previo a la infección y a los 60 días post-infección, por línea | | pág. 59 |
| Tabla 6. Carga parasitaria relativa media de larvas musculares en diafragma (CPr) e índices de la capacidad reproductiva relativa de <i>T. spiralis</i> a los 60 días post-infección, por línea de ratones, con respecto a la dosis infectante (ICRr) y adultos establecidos (ICRr(NA3)) | | pág. 60 |
| Tabla 7. Carga parasitaria relativa media de larvas musculares en lengua (CPr) e índices de la capacidad reproductiva relativa de <i>T. spiralis</i> a los 60 días post-infección, por línea de ratones, con respecto a la dosis infectante (ICRr) y adultos establecidos (ICRr(NA3)) | | pág. 60 |
| Tabla 8. Proporción de ratones que eliminaron el 50 % de los adultos al día 15 post-infección, por línea | | pág. 61 |
| Tabla 9. Razón entre el número medio de larvas en diafragma y lengua, y adultos intestinales recuperados al día 15 post-infección, por línea de ratones | | pág. 62 |
| Tabla 10. Variación del porcentaje de eosinófilos periféricos por línea y tiempo de infección | | pág. 63 |
| Tabla 11. Variación del porcentaje de linfocitos periféricos por línea y tiempo de infección | | pág. 65 |
| Tabla 12. Variación del hematocrito entre líneas, por tiempo de infección | | pág. 66 |

| | | |
|--|-------|---------|
| Tabla 13. Evaluación histopatológica de los intestinos por línea, control y tiempo de infección | | pág. 68 |
| Tabla 14. Longitudes de las vellosidades y glándulas del duodeno por línea, control y tiempo de infección | | pág. 73 |
| Tabla 15. Longitudes de las vellosidades y glándulas, relativas al promedio de los controles, por línea y tiempo de infección | | pág. 74 |
| Tabla 16. Carga parasitaria relativa media de larvas en diafragma de ratones C57BL/6 (<i>CPrDC57</i>) infectados con larvas provenientes de cinco líneas distintas y el control infectado con larvas provenientes de C57BL/6 | | pág. 75 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|---------|
| Figura 1. Relaciones entre las especies de <i>Trichinella</i> descritas | pág. 13 |
| Figura 2. Microfotografía de las células de las glándulas hipodérmicas dispuestas en hileras de una hembra de <i>Trichinella spiralis</i> | pág. 15 |
| Figura 3. Microfotografía de una hembra de <i>Trichinella spiralis</i> | pág. 16 |
| Figura 4. Microfotografía de embriones dentro del útero de una hembra de <i>Trichinella spiralis</i> | pág. 16 |
| Figura 5. Microfotografía de un macho de <i>Trichinella spiralis</i> | pág. 16 |
| Figura 6. Microfotografía de los apéndices copuladores de un macho de <i>Trichinella spiralis</i> | pág. 16 |
| Figura 7. Microfotografía de una larva recién nacida de <i>Trichinella spiralis</i> | pág. 17 |
| Figura 8. Microfotografía de una larva recién nacida de <i>Trichinella spiralis</i> migrando en músculo | pág. 17 |
| Figura 9. Microfotografía de larvas L1 musculares de <i>Trichinella spiralis</i> enquistadas en el músculo | pág. 17 |
| Figura 10. Microfotografía de larvas L1 musculares libres de <i>Trichinella spiralis</i> por la técnica de DAE | pág. 17 |
| Figura 11. Ratones de las líneas testigo (<i>t</i>) y seleccionadas por peso (<i>h</i> , <i>h'</i> , <i>s</i> y <i>s'</i>) | pág. 39 |
| Figura 12. Modificación del peso corporal de ratones machos de dos líneas seleccionadas por alto peso (<i>s'</i> y <i>h'</i>), dos seleccionadas por bajo peso (<i>s</i> y <i>h</i>) y la línea testigo sin seleccionar (<i>t</i>) | pág. 39 |
| Figura 13. Modificación del peso corporal de ratones hembras de dos líneas seleccionadas por alto peso (<i>s'</i> y <i>h'</i>), dos seleccionadas por bajo peso (<i>s</i> y <i>h</i>) y la línea testigo sin seleccionar (<i>t</i>) | pág. 40 |
| Figura 14. Ratones, hembra y macho, derivados de la cepa C57BL/6 | pág. 31 |

| | |
|--|---------|
| Figura 15. Microfotografía del intestino de un ratón. Medición de la longitud de la vellosidad desde la base hasta el extremo apical y medición de la glándula | pág. 51 |
| Figura 16. Microfotografía del intestino de un ratón. Medición de la longitud de la vellosidad a nivel de la base, centro y ápice | pág. 51 |
| Figura 17. Esquema de pasajes de <i>T. spiralis</i> entre líneas | pág. 53 |
| Figura 18. Variación del porcentaje de eosinófilos periféricos por línea a lo largo del tiempo | pág. 64 |
| Figura 19. Variación del porcentaje de linfocitos periféricos por línea a lo largo del tiempo | pág. 65 |
| Figura 20. Variación del hematocrito por línea a lo largo del tiempo | pág. 67 |
| Figura 21. Microfotografía de la arquitectura histológica normal del intestino delgado de los ratones | pág. 68 |
| Figura 22. Microfotografía de la mucosa intestinal. Discreto infiltrado inflamatorio en la lámina propia de las vellosidades | pág. 70 |
| Figura 23. Microfotografía de la mucosa intestinal. Moderada atrofia y fusión de las vellosidades. Moderado infiltrado inflamatorio. | pág. 70 |
| Figura 24. Microfotografía de la mucosa intestinal. Leve infiltrado inflamatorio en las vellosidades e interglandular. | pág. 70 |
| Figura 25. Microfotografía de la mucosa intestinal. Moderado infiltrado inflamatorio mixto predominantemente linfoplasmocítico con escasos polimorfonucleares neutrófilos, congestión y edema intersticial. | pág. 70 |

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%E: porcentaje de larvas establecidas al día 3 post-infección

A: espesor en μm de la lámina propia de la vellosidad a nivel del ápice

B: espesor en μm de la lámina propia de la vellosidad a nivel de la base

Ce: espesor en μm de la lámina propia de la vellosidad a nivel del centro

CIAL: Centro de Investigación con Animales de Laboratorio

CPA: células presentadoras de antígenos

CPr: carga parasitaria relativa

DAE: digestión artificial enzimática

dpi: días post-infección

E: porcentaje de eosinófilos periféricos

G: longitud en μm de la glándula de Lieberkühn

HTO: hematocrito

ICRr: índice de la capacidad reproductiva relativo

ICRrC57: índice de la capacidad reproductiva relativo al diafragma de la cepa C57BL/6

IE: índice de expulsión al día 15 post-infección

IgA: inmunoglobulina A

IgE: inmunoglobulina E

IgG: inmunoglobulina G

IL3: interleucina 3

IL4: interleucina 4

IL5: interleucina 5

IL9: interleucina 9

IL10: interleucina 10

IL13: interleucina 13

IL25: interleucina 25

IL33: interleucina 33

IFN- γ : interferón gamma

iNOS: sintetasa de óxido nítrico

L: porcentaje de linfocitos periféricos

L1: larva 1

L1m: larva 1 muscular infectante

LRN/NBL: larva recién nacida / new born larvae

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

NA3: número de gusanos adultos de *T. spiralis* a los 3 días post-infección por ratón

NA15: número de gusanos adultos de *T. spiralis* a los 15 días post-infección por ratón

NGI: nematodos gastrointestinales

P0: peso del ratón en gramos previo a la infección

P3: peso del ratón en gramos a los 3 días post-infección

P15: peso del ratón en gramos a los 15 días post-infección

P60: peso del ratón en gramos a los 60 días post-infección

PCR: reacción en cadena de polimerasa

PE: proporción de expulsión de gusanos adultos a los 15 días post-infección

PMNs: polimorfonucleares neutrófilos

PR50: porcentaje de ratones que eliminaron el 50 % de adultos al día 15 post-infección

RD: razón entre el número de larvas enquistadas en diafragma y el número de adultos en intestino a los 15 días post-infección

RL: razón entre el número de larvas enquistadas en lengua y el número de adultos en intestino a los 15 días post-infección

RLA: relación de la longitud de la vellosidad de los ratones infectados a nivel del ápice con respecto a la longitud media de la vellosidad a nivel del ápice de los ratones no infectados

RLB: relación de la longitud de la vellosidad de los ratones infectados a nivel de la base con respecto a la longitud media de la vellosidad a nivel de la base de los ratones no infectados

RLCe: relación de la longitud de la vellosidad de los ratones infectados a nivel del centro con respecto a la longitud media de la vellosidad a nivel del centro de los ratones no infectados

RLG: relación de la longitud de la glándula de los ratones infectados con respecto a la longitud media de la glándula de los ratones no infectados

RLV: relación de la longitud de la vellosidad de los ratones infectados con respecto a la longitud media de la vellosidad de los ratones no infectados

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

TLR: receptores similares a Toll

TNF α : factor de necrosis tumoral alfa

TNFR – 1: receptor 1 del factor de necrosis tumoral alfa

V: longitud en μm de la vellosidad

VARIABILIDAD DE LA INTERACCIÓN PARÁSITO-HOSPEDADOR DE DIFERENTES GENOTIPOS *Mus musculus* AL DESAFÍO EXPERIMENTAL CON *Trichinella spiralis*

RESUMEN

La interacción parásito-hospedador es una relación compleja que determina el resultado de la infección. El grado de infección alcanzado depende, entre otros factores, de la capacidad del hospedador para reducir la carga parasitaria y/o disminuir el daño producido por el parásito y de las estrategias que emplea este último para su supervivencia. La importancia de conocer e identificar las estrategias utilizadas por el hospedador y el parásito radica en la relación con la salud del primero; este puede vivir saludablemente con una alta carga parasitaria o morir con una carga baja, dependiendo de factores inmunológicos, genéticos, ambientales, edad y estado nutricional.

El objetivo general de esta tesis fue evaluar las potenciales diferencias en la interacción parásito-hospedador frente a un desafío con *Trichinella spiralis* por parte de diferentes genotipos de hospedadores, conformados por líneas de ratones seleccionadas por peso y una línea testigo derivadas de la cepa CF1, denominadas: *s*, *h*, *s'*, *h'* y *t*, respectivamente.

El establecimiento de las larvas infectivas fue evaluado contando el número total de adultos encontrados en el intestino a los 3 días post-infección (dpi), obteniendo homogeneidad en la instalación en las cinco líneas estudiadas ($p > 0,05$).

Luego de 15 días de infección, se estimó el índice de expulsión de los nematodos adultos y a los 60 dpi se midió el grado de infección alcanzado a través de la carga muscular relativa de larvas enquistadas en el diafragma y lengua y el índice de la capacidad reproductiva relativa (ICRr). La línea *t* fue la más eficiente en la etapa de expulsión, mientras que la línea *h* fue la más ineficiente en este proceso, debido a que presentó el mayor número de gusanos adultos en el intestino. En cuanto al número de larvas enquistadas en los músculos, la carga muscular relativa en el diafragma y en la lengua fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) en la línea liviana *h*, y menores en *t* y *h'*.

Como complemento para la caracterización de la respuesta de las cinco líneas ante el desafío con *T. spiralis*, se analizaron los cambios hematológicos ocurridos durante la infección, así como una evaluación histopatológica y morfométrica del duodeno. Las líneas *h* y *t* presentaron los valores más elevados de eosinófilos al día 30 dpi y, a su vez, la primera línea presentó los menores valores de linfocitos al día 45 dpi. Con respecto a los valores medios del hematocrito (HTO) a lo largo del tiempo de infección, se observó que al día 15 dpi, los ratones infectados de todas las líneas mostraron una disminución significativa con respecto a los animales sin infectar ($p < 0,05$). En la evaluación histopatológica se observaron características similares a lo largo de la infección en el duodeno de las líneas *t*, *s* y *h'*, mientras que la línea *s'* mostró un grado mayor de severidad en las lesiones respecto a las anteriormente mencionadas. Los mayores cambios histopatológicos se observaron en la línea *h*, en donde a los 15 y 60 dpi se observó descamación de células epiteliales de revestimiento de las vellosidades, glándulas reactivas e hiperplásicas, congestión y edema intersticial de la lámina propia y un moderado infiltrado inflamatorio mixto. Esta variabilidad hallada entre las líneas, cuyo origen es la línea *t*, sería producto del proceso sistemático de selección artificial fenotípica por peso corporal a los que se suman los efectos dispersivos -efecto fundador y deriva génica- asociados al bajo tamaño efectivo de las poblaciones.

Con las larvas recuperadas de los ratones de las líneas testigo y las seleccionadas por peso se infectaron ratones de la cepa C57BL/6 para evaluar la posibilidad de que el pasaje de una generación de *T. spiralis* por otro genotipo murino alterase la capacidad infectante del nematodo. Al analizar los resultados se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en las cargas de larvas musculares, siendo notable la disminución en la capacidad infectante de las larvas de *T. spiralis* que pasaron por línea *s*. Esto podría estar correlacionado con la actividad de los eosinófilos durante la infección en esta línea derivada de CF1, cuyos valores fueron los menores de todas las líneas.

La heterogeneidad observada en los distintos momentos de la infección de los animales confirma la variabilidad genética en los efectores inmunes resultante de los procesos de selección fenotípica por peso y de los procesos dispersivos antes mencionados. Sin embargo, a pesar de la variabilidad encontrada se puede concluir

que, a la misma dosis, todas las líneas mostraron ser susceptibles a la infección con *T. spiralis*, pero que la línea liviana *h* mostró una susceptibilidad mayor, debido a que los animales comenzaron a mostrar un deterioro de su estado general alrededor de los 45-50 dpi, como la disminución significativa del peso corporal, disminución de la actividad, mal aspecto del manto y descargas oculares, lo que llevó a la decisión de aplicar el punto final humanitario en estos animales, hecho que no ocurrió en las demás líneas. Es importante remarcar que, si bien el criterio de selección fue el mismo, para las dos líneas livianas, la presencia de procesos dispersivos (efecto fundador y deriva génica) podría haber determinado la fijación de diferentes alelos en cada una de ellas y, por ende, ser causa de diferencias genéticas entre las mismas, determinando una respuesta marcadamente distinta ante la infección con *T. spiralis* y fortaleciendo el criterio del uso de los dos pares de líneas y la línea testigo en este trabajo.

Palabras clave: *Trichinella spiralis*, ratones, selección por peso

VARIABILITY OF PARASITE-HOST INTERACTION OF DIFFERENT GENOTYPES *Mus musculus* TO EXPERIMENTAL CHALLENGE WITH *Trichinella spiralis*

ABSTRACT

Parasite-host interaction is a complex relationship that determines the outcome of infection. The level of infection depends, among other factors, on the capacity of the host to reduce the parasite load and / or reduce the damage produced by the parasite and on the strategies used by the latter for its survival. The importance of knowing and identifying the strategies used by the host and the parasite lies in the relationship with the health of the former, this can live with a high parasitic load or die with few worms, depending on immunological, genetic, environmental factors, age and nutritional status.

The general objective of this thesis was to evaluate the potential differences in the parasite-host interaction in the face of a challenge with *Trichinella spiralis* by different host genotypes, conformed of weight-selected mouse lines and a control line derived from the CF1 strain. named: *s*, *h*, *s'*, *h'* and *t*, respectively.

The establishment of the infective larvae was evaluated by counting the total number of adults found in the intestine at 3 days post-infection (dpi), obtaining homogeneity in the installation in the five lines studied ($p > 0,05$).

After 15 days of infection, the expulsion index of the adult nematodes was estimated and at 60 dpi the degree of infection achieved through the relative muscle load of larvae encysted in the diaphragm and tongue and the index of relative reproductive capacity (ICRr) was measured. Line *t* was the most efficient in the expulsion stage, while line *h* was the most inefficient in this process, due to the fact that it presented the highest number of adult worms in the intestine. Regarding the number of larvae encysted in the muscles, the relative muscle load in the diaphragm and in the tongue were significantly higher ($p < 0,05$) in the light line *h*, and lower in *t* and *h'*.

As a complement to the characterization of the response of the five lines to the challenge with *T. spiralis*, the hematological changes that occurred during the infection were analyzed, as well as a histopathological and morphometric evaluation of the

duodenum. Lines *h* and *t* presented the highest eosinophil values at day 30 dpi and, in turn, the first line presented the lowest lymphocyte values at day 45 dpi. Regarding the mean hematocrit values throughout the infection time, it was observed at day 15 dpi, that the infected mice of all lines showed a significant decrease with respect to the uninfected animals ($p < 0,05$). In the histopathological assesment, similar characteristics were observed throughout the infection in the duodenum of the *t*, *s* and *h'* lines, while the *s'* line showed a greater degree of severity in the lesions compared to those previously mentioned. The greatest histopathological changes were observed in the *h* line, where at 15 and 60 dpi desquamation of epithelial cells of the villi, reactive and hyperplastic glands, congestion and interstitial edema of the lamina propia, and a moderate mixed inflammatory infiltrate were observed. This variability found between the lines, whose origin is the *t* line, could be the product of the systematic process of artificial phenotypic selection by body weight, to which are added the dispersive effects - founder effect and gene drift - associated with the low effective size of the populations.

With the larvae recovered from the mice of the control lines and those selected by weight, mice of the C57BL / 6 strain were infected to evaluate the possibility that the passage of a generation of *T. spiralis* by another murine genotype altered the infective capacity of the nematode. When analyzing the results, significant differences were found ($p < 0.05$) in the loads of muscle larvae, being notable the decrease in the infecting capacity of the *T. spiralis* larvae that passed through the *s* line. This could be correlated with the activity of eosinophils during infection in this CF1-derived line, whose values were the lowest of all lines.

The heterogeneity observed in the different moments of the infection of the animals confirms the genetic variability in the immune effectors resulting from the phenotypic selection processes by weight and the dispersive processes mentioned above. However, despite the variability found, it can be concluded that, at the same dose, all the lines showed to be susceptible to infection with *T. spiralis*, but that the light line *h* showed a greater susceptibility, due to the fact that the animals started to show a deterioration of their general condition around 45-50 dpi, such as a significant decrease in body weight, decreased activity, poor appearance of the mantle and eye discharges, which led to the decision to apply the humanitarian end point in these animals, a fact that did not occur in the other lines. It is important to note that, although

the selection criterion was the same, for the two light weight lines, the presence of dispersive processes (founder effect and gene drift) could have determined the fixation of different alleles in each one of them and, therefore, be the cause of genetic differences between them, determining a markedly different response to infection with *T. spiralis* and strengthening the criteria for the use of the two pairs of lines and the control line in this work.

Key words: *Trichinella spiralis*, mice, selection by weight

1. INTRODUCCIÓN

1.1. BREVE HISTORIA DE LA TRICHINELLOSIS

La trichinellosis es una enfermedad parasitaria producida por un nematodo perteneciente al género *Trichinella*, transmitida por el consumo de carne cruda o mal cocida. Parasita a los animales silvestres y domésticos y al ser humano y se la considera un problema complejo para la salud pública dada las altas tasas de morbilidad que presenta. En Argentina se presenta de manera endémica en los cerdos, dando lugar a brotes periódicos de trichinellosis humana (Ribicich y col., 2005).

Esta enfermedad afecta a los seres humanos desde hace miles de años, lo cual se demostró con el hallazgo de un quiste de *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*) en la musculatura intercostal del cuerpo momificado de un niño egipcio, quien supuestamente vivió alrededor del año 1200 A.C. (De Boni y col., 1977). Otro reporte informó el hallazgo de *Trichinella* spp. en el “niño del Cerro El Plomo”, encontrado frente a la ciudad de Santiago de Chile en 1954. Se trata del cuerpo momificado de un niño Inca de 8 a 9 años de edad que, por datación relativa, perteneció al año 1500 aproximadamente. En el 2003, los análisis paleoparasitológicos realizados, demostraron la presencia de quistes de *Trichinella* spp. en su musculatura esquelética (Rodríguez y col., 2011).

El parásito fue descubierto por James Paget en 1835 en Londres, cuando realizaba la autopsia de un paciente italiano. Luego, fue Richard Owen (1835) quien lo denominó *Trichina* por ser delgado como un cabello y *spiralis* por su particular “apariencia espiralada” en sus principales rasgos morfológicos (Reinhard, 1958). En 1895, debido a que el nombre genérico del parásito ya había sido utilizado con anterioridad para un género particular de moscas, Railliet modificó su denominación quedando definitivamente establecido como *Trichinella spiralis* (Owen, 1835; Railliet, 1895).

En 1846, Joseph Leidy, médico y naturalista originario de la ciudad estadounidense de Filadelfia, hizo un descubrimiento verdaderamente trascendental cuando encontró quistes en carne de cerdo, los cuales no presentaban diferencias con los que se habían hallado en humanos (Reinhard, 1958). En 1850, Ernst Friedrich

Herbst descubrió que la *Trichinella* spp. podía transmitirse entre animales mediante el consumo de carne infectada, cuando alimentó a perros con carne de tejón infectada con quistes de este parásito (Reinhard, 1958).

En 1859, dos anatomistas alemanes, Rudolf Virchow de Berlín y Rudolf Leuckart de Giessen observaron la presencia de adultos de *Trichinella* spp. en el intestino de animales infectados. Este evento los llevó a dilucidar el ciclo biológico completo del parásito (Reinhard, 1958).

Como cita Campbell (1983), el primer brote de trichinellosis en Argentina es de 1898, en una familia de Buenos Aires que presentó síntomas compatibles con la enfermedad, luego de haber consumido carne de cerdo. Unos días después, un hombre murió en Buenos Aires y en la autopsia se encontraron larvas de *Trichinella* spp. en los músculos. Se halló un nexo epidemiológico entre este hombre y la familia enferma, debido a que habían consumido juntos la carne de cerdo. A partir de allí, en 1899, fue establecida la relación entre ratas y cerdos en los brotes humanos de trichinellosis en Argentina, motivo por el cual comenzaron los diagnósticos *post mortem* de porcinos en Argentina.

1.2. TAXONOMÍA Y ESPECIES

Ubicación taxonómica:

Phylum: Nematoda, Clase: Enoplea, Subclase: Dorylaimia, Orden: Trichinellida, Familia: Trichinellidae, Género: *Trichinella*, Especie: *spiralis* (National Center for Biotechnology Information).

Hasta el momento, se ha determinado la existencia de dos clados principales en el género *Trichinella* mediante datos biológicos, bioquímicos y principalmente moleculares. Uno engloba a las especies que inducen a la célula nodriza a formar una cápsula de colágeno gruesa que recubre el tejido muscular del hospedador (encapsulada) y el otro incluye especies no encapsuladas que inducen una cápsula de colágeno muy fina sólo visible al microscopio. Las especies y los genotipos encapsulados se hallan restringidos a los mamíferos, mientras que las especies no encapsuladas son más diversas en el rango de hospedadores (Pozio y Murrel, 2006).

El descubrimiento y las características de cada una de las especies y genotipos se describen brevemente en los ítems siguientes. En la Figura 1 se puede observar la filogenia de estas especies.

Especies encapsuladas

Dentro de estas especies tenemos a *Trichinella spiralis* (Owen, 1835; Railliet, 1895) (Genotipo T1). Es la primera especie descubierta y la más caracterizada por su importancia como causante de enfermedad humana. Presenta una distribución amplia y global en zonas climáticas templadas y ecuatoriales. Es la especie más adaptada a los cerdos domésticos y salvajes (Gottstein y col., 2009). El ciclo selvático de *T. spiralis* abarca una amplia gama de carnívoros silvestres que pueden convertirse en los responsables de introducir el ciclo de vida en una población de hospedadores domésticos (Dick y Pozio, 2001; Pozio, 2001). En el ciclo doméstico, la carne de cerdos (*Sus scrofa domesticus*) infectados por *T. spiralis* es la principal fuente de infección para los animales sinantrópicos, como la rata parda (*Rattus norvegicus*) y el armadillo (*Dasypus novemcinctus*) (Ribicich y col., 2010b); el gato (*Felis silvestris catus*), el perro (*Canis lupus familiaris*) y un gran rango de carnívoros silvestres (Pozio y Murrel, 2006). Su poca resistencia a las bajas temperaturas ambientales puede haber evitado su propagación entre los animales silvestres que habitan en zonas gélidas. Como se mencionó anteriormente, *T. spiralis* es considerada como la especie del género causante de la mayoría de las infecciones y muertes humanas, lo cual se atribuye a ciertas características biológicas como poseer: (1) un alto índice de la capacidad reproductiva (ICR) en roedores (ratones y ratas) y cerdos (tanto domésticos como silvestres) (Murrell y col., 1985; Pozio y col., 1992; Kapel y Gamble, 2000; Kapel, 2001); (2) una longitud más larga del útero, en comparación con otras especies, lo que se correlaciona directamente con el índice de infectividad, es decir, cuanto más largo es el útero, mayor es la capacidad larvaria intrauterina y mayor el índice de infectividad; (3) un mayor número de larvas recién nacidas producidas por gusanos hembras y (4) un desarrollo más rápido de la célula nodriza y la cápsula de colágeno (Pozio y col., 1992).

Trichinella nativa (Britov & Boev, 1972) (Genotipo T2), se caracteriza por ser resistente a temperaturas extremadamente bajas. Infecta a carnívoros selváticos de

áreas árticas y subárticas de Asia, América del Norte y Europa (Pozio y Zarlenga, 2005). Los hospedadores principales son terrestres como osos pardos y negros (*Ursus arctos* y *americanus*), osos polares (*Ursus maritimus*), tejones (*Meles meles*), mapaches (*Procyon lotor*), linceces (*Lynx lynx*), lobos (*Canis lupus*) y zorros (*Vulpes vulpes*) y marinos como morsas (*Odobenus rosmarus*) y focas (*Phoca vitulina*) (Dick y Pozio, 2001; Kapel, 2000; La Rosa y col., 2003; Pozio y col., 2001). *T. nativa* es el agente etiológico de la trichinellosis en poblaciones humanas que viven en zonas frías. (Pozio y Murrell, 2006). El genotipo *Trichinella* T6 (Pozio y col., 1992) está estrictamente relacionado con *T. nativa*. Este genotipo se ha encontrado en varias regiones de Canadá y Estados Unidos. Se han documentado infecciones humanas (Dworkin y col., 1996).

Trichinella britovi (Pozio y col., 1992) (Genotipo T3), es la especie más ampliamente distribuida en los ciclos de vida selváticos de Europa, Asia y África del Norte y Occidental y aunque puede afectar a jabalíes (*Sus scrofa*), los hospedadores más susceptibles son los mamíferos carnívoros (Pozio y Zarlenga, 2013). Zoonóticamente, *T. britovi* es la segunda especie más común de *Trichinella* que puede afectar la salud humana (Gottstein y col., 2009). El genotipo *Trichinella* T8 (Pozio y col., 1992) se encuentra relacionado con *T. britovi* y ha sido detectado solo tres veces en carnívoros selváticos (una hiena manchada (*Crocuta crocuta*) y leones (*Panthera leo*)) de Sudáfrica y Namibia (Murrell y col., 2000).

Trichinella murrelli (Pozio y La Rosa, 2000) (Genotipo T5) es el agente etiológico de infecciones en carnívoros selváticos que viven en áreas templadas de la región Neártica. Esta especie muestra una infectividad muy baja en cerdos y ratas (Pozio y Murrell, 2006). Se han reportado casos humanos por consumo de carne de caballo (*Equus caballus*) y oso (Pozio y Zarlenga, 2013). El genotipo *Trichinella* T9 (Nagano y col., 1999) se ha encontrado en carnívoros selváticos de Japón y se ha considerado estrictamente relacionado con *T. britovi* con el que se cruzó en condiciones experimentales. Sin embargo, su secuencia sugiere que *Trichinella* T9 está genéticamente más relacionada con *T. murrelli* que con *T. britovi* (Pozio y Zarlenga, 2013).

Trichinella nelsoni (Britov & Boev, 1972) (Genotipo T7), infecta a los carnívoros selváticos que viven en África oriental desde Kenia hasta Sudáfrica (Pozio y Zarlenga,

2005). La variedad de hospedadores incluye carnívoros silvestres y cerdos silvestres y jabalíes, algunos de los cuales han sido fuente de infección para los humanos. (Pozio, 2007b).

Trichinella patagoniensis (Krivokapich y col., 2012) (Genotipo T12) fue obtenida en el año 2004 de un puma en la localidad de Trapalcó, provincia de Río Negro, Argentina. Posteriormente se hallaron larvas en otros pumas provenientes de la localidad de El Calafate (provincia de Santa Cruz) en el año 2008 y del distrito de La Paz (provincia de Catamarca) en el año 2009. Los estudios filogenéticos determinaron que corresponde a una nueva especie: *Trichinella patagoniensis*, llevando el nombre de la región argentina en donde fue encontrada (Krivokapich, y col., 2012). En estudios realizados en cerdos, ratas y gatos, se demostró que, hasta el momento, los gatos domésticos se comportan como los mejores hospedadores para esta especie (Gonzalez Prous y col., 2011; Krivokapich y col., 2012; Ribicich y col., 2013). La infecciosidad de *T. patagoniensis* fue baja en los cerdos comparada con todas las demás especies encapsuladas "selváticas" de *Trichinella*. En estudios realizados en aves (*Gallus gallus domesticus*) se recuperaron adultos del intestino del pollo, pero no se halló evidencia de larvas musculares, demostrando que *T. patagoniensis* es capaz de realizar la fase intestinal pero no de alcanzar el estadio infectante (L1m) en esta especie (Pasqualetti y col., 2014).

Trichinella chanchalensis (Sharma y col., 2020) (Genotipo T13) es la especie más recientemente descrita del género *Trichinella* por Sharma y col. (2020). En su trabajo describieron una especie críptica no reconocida previamente, propuesta como *Trichinella chanchalensis* n. sp. (también designado como T13), en tejones (*Taxidea taxus*) del noroeste de Canadá. Esta especie se diferencia de los congéneres basándose en datos de secuencia molecular y criterios filogenéticos comparativos. Las muestras de esta especie se obtuvieron de larvas o extracto de ADN de *Trichinella* que se había identificado como *T. nativa* mediante PCR multiplex (Zarlenga y col., 1999) de 95 animales, incluidas 12 especies de mamíferos carnívoros de Canadá; 37 eran larvas archivadas en la Agencia Canadiense de Inspección de Alimentos (CFIA), seis eran de zorros árticos (*Vulpes lagopus*) de los Territorios del Noroeste, 41 eran de tejones recolectados en los Territorios del Yukón y del Noroeste, y 11 eran de zorros rojos (*V. vulpes*) de Québec (Sharma y col., 2020). A pesar de compartir la

misma posición de banda que *T. nativa* en la PCR multiplex, *T. chanchalensis* es genéticamente discreta y no está estrechamente relacionada con ninguna especie o genotipo actualmente reconocida en América del Norte o Eurasia. Es así que *T. chanchalensis* (T13) no comparte un ancestro común directo con otras especies que se encuentran en simpatria de latitudes altas (es decir, T6 y *T. nativa*), ni con la exclusión de otras especies encapsuladas. El análisis filogenético y el examen de la compresión del tejido muscular colocaron a *T. chanchalensis* en el clado encapsulado. Se sobreentiende que debido a lo reciente de su hallazgo aún se requieren estudios de infectividad animal para confirmar la viabilidad, el ICR y la patogenicidad de *T. chanchalensis*, en relación con otras especies de *Trichinella* (Sharma y col., 2020). El análisis realizado sitúa a T13 como hermana de un sub clado que incluye *T. patagoniensis* y las especies encapsuladas restantes (*T. nativa*, T6, *T. britovi*, T8, *T. murrelli* y T9). El origen de *T. chanchalensis* es anterior a la divergencia de *T. patagoniensis* e indica que *T. chanchalensis* representa un componente importante y de larga data de la biodiversidad de *Trichinella* en el holártico (Sharma y col., 2020).

Especies no encapsuladas

Trichinella pseudospiralis (Garkavi, 1972) (Genotipo T4) es una especie cosmopolita que muestra un espectro de hospedadores más amplio, que incluye mamíferos y aves ya que es capaz de completar su ciclo de vida a temperaturas corporales variables -entre 37 y 42 °C- del hospedador (Pozio, 2005). Por marcadores moleculares se han distinguido tres poblaciones geográficas de *T. pseudospiralis*: localizadas en las regiones Paleártica, Neártica y Australiana (Tasmania) (Pozio y Murrell, 2006).

Estudios biológicos y moleculares de larvas no encapsuladas de *Trichinella* descubiertas en 1988 en los músculos de cerdos domésticos y salvajes en el suroeste de Papua, Nueva Guinea, demostraron una nueva especie denominada *T. papuae* (Pozio y col., 1999; Pozio y Murrell, 2006) (Genotipo T10). Puede infectar tanto a reptiles (solo aquellos que viven en regiones ecuatoriales) como a mamíferos y requieren temperaturas corporales del hospedador que oscilen entre 25 y 40 ° C (Pozio, 2005). Se han documentado infecciones en humanos por el consumo de carne de reptil (Pozio y Murrell, 2006). *Trichinella zimbabwensis* (Pozio y col., 2002)

(Genotipo T11) es muy similar a *T. papuae* con la que comparte muchas características biológicas. (Pozio y Murrell, 2006) y al igual que dicha especie, puede infectar tanto a reptiles de zonas ecuatoriales como a mamíferos (Pozio, 2005). Aún no se han informado infecciones en humanos (Pozio y Murrell, 2006).

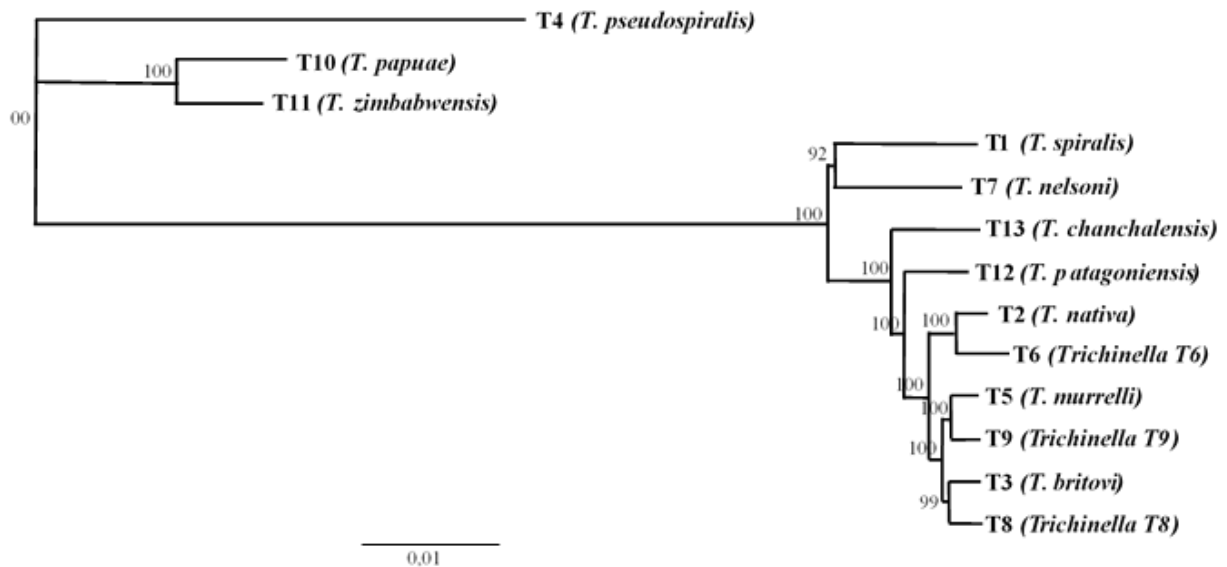


Figura 1. Relaciones entre las especies de *Trichinella* descritas y crípticas basadas en el análisis de las secuencias de nucleótidos de 15 copias simples ortólogas concatenadas utilizando algoritmos de agrupación de cercanía y máxima similitud (Adaptado de Sharma y col., 2020). La barra de escala indica la distancia evolutiva (p-distancia) medida como sustituciones de nucleótidos por posición.

Especies de *Trichinella* halladas en Argentina

En el año 2006, se realizó un estudio en donde se aisló la especie *Trichinella spiralis* en muestras recolectadas desde 1996 hasta 2005 de animales domésticos, selváticos y sinantrópicos de 12 provincias de Argentina. El aislamiento realizado a través de la técnica PCR anidada, comprobó la presencia de la especie *Trichinella spiralis* en muestras de cerdo, gato, perro, peludo (*Chaetophractus villosus*) y rata parda (Krivokapich, y col., 2006). En el año 2010, otro estudio determinó la presencia de *T. spiralis* en muestras de una rata y dos jabalíes provenientes de la provincia de Neuquén (Ribicich y col., 2010b). Además, se ha detectado en otros hospedadores naturales sinantrópicos y silvestres: comadreja overa (*Didelphis albiventris*), comadreja colorada (*Lutreolina crassicaudata*) (Castaño Zubieta y col., 2014) y lobo marino de un pelo (*Otaria flavescens*) (Pasqualetti y col., 2018).

Como se mencionó anteriormente, en el año 2004 en la localidad de Trapalcó, provincia de Río Negro, se encontraron en un puma larvas de un genotipo distinto que fue nombrado *Trichinella patagoniensis* por esta región geográfica (Krivokapich, y col., 2008). Posteriormente se aislaron larvas de *T. patagoniensis* en músculos de puma provenientes de la localidad de El Calafate (provincia de Santa Cruz) en el año 2008 y del distrito de La Paz (provincia de Catamarca) en el año 2009 (Krivokapich, y col., 2012).

En septiembre del 2013 fue aislada una larva de *Trichinella* no encapsulada de un cerdo doméstico proveniente de una granja de la ciudad de Río Gallegos, provincia de Santa Cruz. La identificación molecular del nivel de especie a través de la técnica de PCR multiplex reveló un patrón de banda correspondiente con *Trichinella pseudospiralis*. Este es el primer descubrimiento de un aislamiento de *T. pseudospiralis* de la región Sud América emparentado con los de la región Paleártica. A pesar de que se reconoce un sistema de migración de las aves que conecta ambas regiones, se cree que *T. pseudospiralis* probablemente fue introducida en Argentina por jabalíes y cerdos durante la época de la colonización (Krivokapich y col., 2015).

En 2012, quince personas se enfermaron aparentemente de trichinelosis por haber consumido productos de cerdo contaminados con *Trichinella* en la ciudad de Las Heras, provincia de Mendoza. Se obtuvieron larvas musculares de muestra de chorizo de cerdo sospechosa de ser la fuente de infección. La identificación molecular a través de PCR multiplex mostró un patrón de dos bandas correspondientes con *T. britovi*. Este fue el primer reporte de la identificación molecular de *T. britovi* en Argentina. La fuente de infección fue atribuida a la elaboración de productos manufacturados de carne de cerdos, probablemente criados en Argentina y sacrificados, sin control médico veterinario, en la ciudad de Las Heras. No hubo evidencia de que estos productos provinieran de Europa. *T. britovi* puede haber sido introducida desde Europa a Sud América durante la colonización española a través de cerdos, jabalíes y/o ratas, como se especula para *T. spiralis* y *T. pseudospiralis*. Hasta el momento de este aislamiento, la identificación molecular de más de 200 aislamientos de *Trichinella* de cerdos domésticos y de sus productos, provenientes de diferentes provincias de Argentina indicaron que pertenecían a *T. spiralis*, excepto por uno que fue asignado como *T. pseudospiralis* (Krivokapich y col., 2019).

1.3. MORFOLOGÍA

Trichinella spiralis es un pequeño nematelminto blanquecino y filiforme, con su extremidad anterior más delgada que la posterior. Como muestra la Figura 2, presenta una cutícula externa pseudosegmentada compuesta por estructuras estriadas y lisas; hacia el interior, se encuentra la hipodermis que contiene células con funciones glandulares dispuestas en hileras dorsales y ventrales y comunicadas con el exterior por un poro excretor (Reichels, 1955; Bruce, 1974; Despommier, 1993).

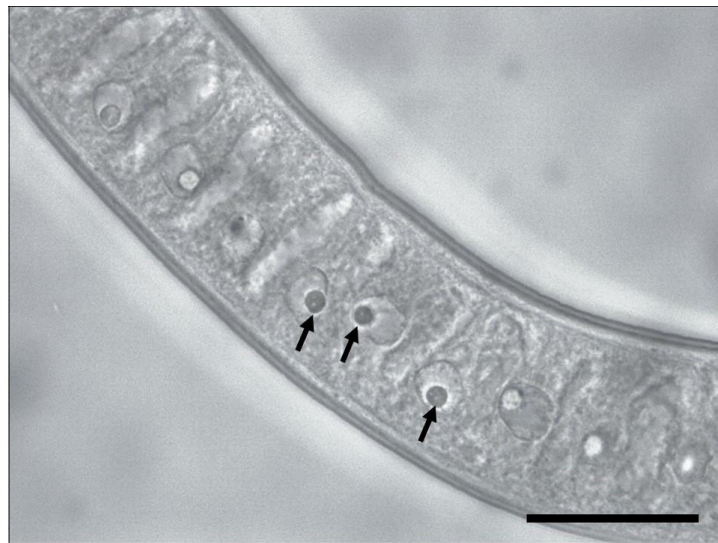


Figura 2. Microfotografía de las células de las glándulas hipodérmicas dispuestas en hileras (flechas) de una hembra de *Trichinella spiralis*. Vista lateral. Barra: 25 μ m.

Debajo de la hipodermis se encuentra la estructura muscular del parásito. El aparato digestivo está formado por una cápsula bucal con un estilete, esófago y tracto intestinal. Ventral al esófago, se encuentra una estructura muy particular denominada esticosoma; formada por 45 - 60 células llamadas esticocitos las cuales son muy activas, con cinco variedades de granulaciones en su interior y que vuelcan sus secreciones al esófago a través de canalículos. El sistema nervioso está integrado por un anillo cefálico, dos nervios laterales, uno dorsal y otro ventral que parten del anillo y seis ganglios ubicados en el extremo anterior del parásito (Pozio, 2007a).

Como todos los parásitos nematodos de los mamíferos, *T. spiralis* presenta dimorfismo sexual (Vilella, 1970). Las hembras adultas (Figura 3) miden de 1,26 mm a 3,35 mm de longitud y 29 μ m a 38 μ m de ancho (Pozio, 2007a). Son vivíparas ya que paren larvas totalmente desarrolladas (Figura 4). Poseen una estructura ovárica

que continúa en el oviducto, un receptáculo seminal, útero, vagina y la comunicación con el exterior a través del poro genital que se ubica en el tercio anterior del parásito hacia la finalización del esófago (Dick, 1983). No poseen apéndices copuladores.

El macho adulto mide de 0,62 a 1,58 mm de longitud total, y de 25 a 33 μm de ancho (Figura 5) (Pozio, 2007a). Es monórquido, y su único testículo se origina en la porción posterior del cuerpo extendiéndose anteriormente hasta aproximadamente el extremo posterior del esófago. Se comunica a través del canal deferente con una vesícula seminal localizada en la cloaca. Dos proyecciones cónicas o mamelones copuladores de 10 μm de largo se encuentran a ambos lados de la apertura cloacal, con papilas accesorias y apéndices copuladores para anclarse a la hembra durante la cópula (Figura 6) (Dick, 1983).

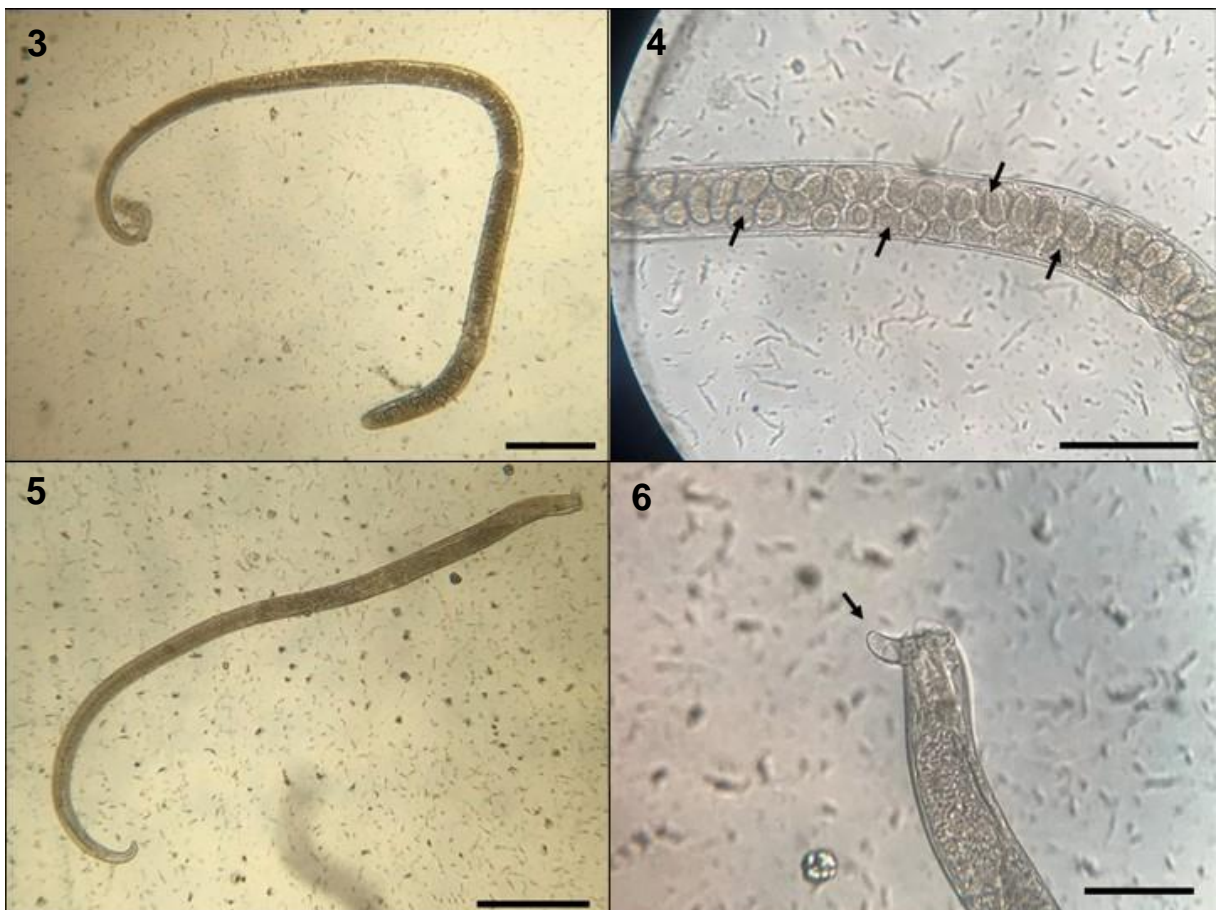


Figura 3. Microfotografía de una hembra de *Trichinella spiralis*. Vista lateral. Barra: 80 μm . Figura 4. Microfotografía de embriones dentro del útero de una hembra de *Trichinella spiralis* (flechas). Vista lateral. Barra: 50 μm . Figura 5. Microfotografía de un macho de *Trichinella spiralis*. Vista dorsal. Barra: 80 μm . Figura 6. Microfotografía de los apéndices copuladores de un macho de *Trichinella spiralis*. Vista ventral.

Las larvas paridas por las hembras, a través del poro genital, se denominan larvas recién nacidas (LRN o NBL por sus siglas en inglés) (Despommier, 1983), miden entre 70 y 120 μm de largo y 6 a 9 μm de ancho y muestran características morfológicas rudimentarias (Figura 7) (Pozio, 2007a). Tienen al menos diez esticocitos funcionales y se pueden encontrar migrando por todo el organismo, aunque sólo van a instalarse en las células de la musculatura esquelética estriada (Figura 8) donde comienzan a incrementar su tamaño (Gould, 1970).

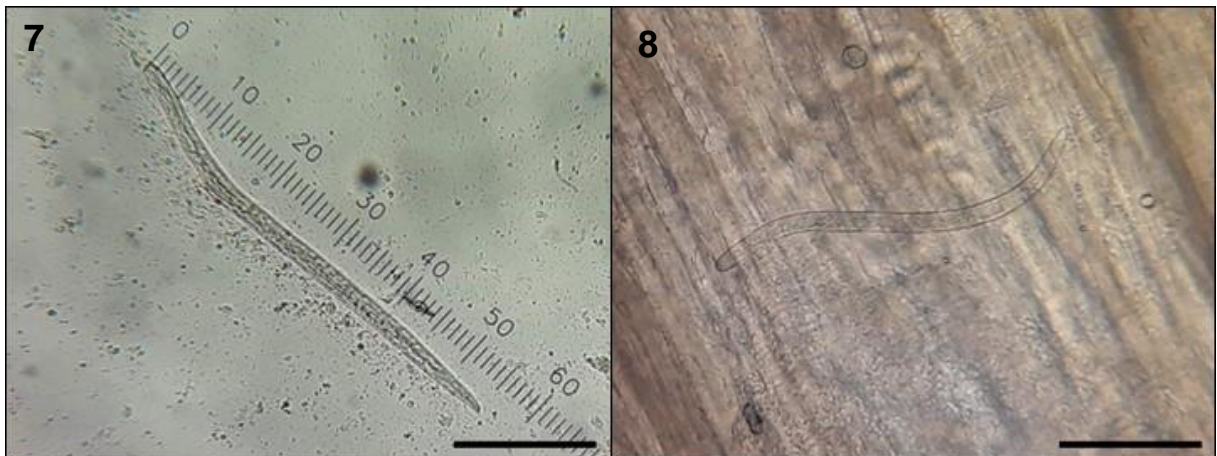


Figura 7. Microfotografía de una larva recién nacida de *Trichinella spiralis*. Barra: 40 μm . Figura 8. Microfotografía de una larva recién nacida de *Trichinella spiralis* migrando en músculo. Barra: 40 μm .

Las larvas que se enquistan en los músculos y que serán infectantes para el futuro hospedador reciben el nombre de L1 musculares (L1m), miden aproximadamente 1.000 μm de largo por 30 de ancho y ya en este momento presentan diferencias sexuales (Figura 9 y 10).



Figura 9. Microfotografía de larvas L1 musculares de *Trichinella spiralis* enquistadas en el músculo. Barra: 200 μm . Figura 10. Microfotografía de larvas L1 musculares libres de *Trichinella spiralis* por la técnica de digestión artificial enzimática. Barra: 300 μm .

Las "larvas machos" presentan esbozos genitales romos y rectos largos y las "larvas hembras" presentan esbozos genitales agudos y rectos cortos. Un elemento importante que presentan las larvas en la extremidad cefálica es el esticosoma, (formado por 30 a 40 esticocitos, de 50 a 70 μm de diámetro) responsable de la elaboración de enzimas proteolíticas que les permiten a las L1m penetrar en las células entéricas (Euzeby 1994; Pozio y col., 1996) y también responsable de la elaboración de antígenos de excreción - secreción (Dea Ayuela y Bolas Fernandez, 1999).

1.4. CICLO BIOLÓGICO

Trichinella spiralis posee un ciclo biológico autoheterógeno (Tolosa Palacios y col., 2006) (también denominado por Navone y col. (2017) como autoheteroxeno), por desarrollar todos sus estadios dentro del hospedador que parasita. Un mismo individuo se comporta como hospedador definitivo e intermediario conteniendo a la vez formas adultas en el intestino y larvas en la musculatura estriada. Para continuar el ciclo requiere siempre de dos hospedadores, a través del carnivorismo y/o canivalismo (Pozio y col., 1996; Soulsby, 1982).

El ciclo biológico puede ser dividido en fase intestinal o enteral, fase migratoria o de diseminación y fase parenteral o muscular (Despommier, 1993). Comienza con la fase intestinal cuando un hospedador consume carne cruda o mal cocida conteniendo quistes de *Trichinella* spp. con larvas infectantes (L1 muscular) en su interior (Despommier, 1983).

Para que una infección tenga éxito es necesario que los animales ingieran un número mínimo de larvas totales que difiere con cada hospedador, por ejemplo 15 a 25 larvas en perros y gatos, 50 larvas para los cerdos, y de 50 a 75 larvas para el ser humano (Mayer, 1984).

Los jugos digestivos, pepsina y ácido clorhídrico, digieren las fibras musculares liberando las larvas de primer estadio de los quistes, que rápidamente pasan al intestino delgado. Aquí las larvas responden a las características del ambiente y penetran las microvellosidades de los enterocitos. Dado que la larva mide aproximadamente 1 mm de largo y cada célula columnar (enterocito) mide 32 μm , se

estima que el parásito ocupa cerca de 117 células durante la etapa temprana, donde se produce una fusión de las membranas celulares formando un sincitio, denominado nicho intramulticelular. Se inicia, aquí, una rápida sucesión de cuatro mudas y en aproximadamente 30 horas se diferencian en machos y hembras adultas (Despommier, 1983).

Seguidamente de la madurez sexual, ocurre el apareamiento, presumiblemente dentro del nicho intramulticelular. Las hembras son usualmente fertilizadas luego de las 37 a 40 horas post-infección. En el momento justo antes de la inseminación, la proporción de hembras y machos es de 1,5-2:1. Comúnmente, todas las hembras son fertilizadas, por lo que se considera que cada macho debe, en promedio, fecundar a dos hembras (Despommier, 1983). Luego de 5 días de haber sido fertilizadas, las hembras paren LRN en la mucosa intestinal. La duración de esta etapa puede variar de 1 a 2 semanas, dependiendo de la respuesta inmune del hospedador que fuerza a los parásitos a salir del nicho y ser eliminados en la materia fecal (Despommier, 1993; Pasqualetti, 2014).

La fase migratoria o de diseminación se inicia alrededor del séptimo día de ocurrida la ingestión del alimento infectado y continúa mientras existan hembras grávidas en el intestino. En esta fase, las LRN penetran la lámina propia de la vellosidad, ayudadas por su estilete bucal, sin la intervención de enzimas proteolíticas, y por vía linfática y, en menor medida, por vía sanguínea alcanzan la circulación general. En la migración, numerosos órganos pueden ser afectados transitoriamente, incluyendo músculo cardíaco, tejido cerebral, retina y coroides, hígado, bazo, riñón, etc., donde causan modificaciones patológicas diversas. En el músculo cardíaco no se instalaría definitivamente debido a la falta de tejido conectivo, el sarcolema muy delgado y la contractibilidad del músculo (Ribicich, 2010a).

Numerosos estudios han demostrado concluyentemente que sólo las células de músculo estriado son un nicho intracelular adecuado para la continuación del desarrollo del parásito (Despommier, 1983). Las larvas sólo se van a enquistar en las células de los músculos más irrigados, ricos en oxígeno, preferentemente en la inserción de estos con los tendones. Entre los músculos más afectados se encuentran el diafragma, los de la base de la lengua, laringeos, intercostales, masticatorios y

oculares. Aquí se desarrolla la fase parenteral o muscular del ciclo de *Trichinella* (Despommier, 1990).

En la célula muscular la larva 1 (L1) pierde su estilete bucal, se ubica en el interior de las fibras musculares (normalmente se aloja una larva por cada fibra muscular, aunque se han encontrado quistes con nueve larvas) y al cabo de 15 días quedan rodeadas por una envoltura constituida por el sarcolema. Se desencadenan una serie de modificaciones produciendo una unidad anatómicamente independiente y altamente especializada conocida con el nombre de "célula nodriza" o "célula nurse". Cada una de estas células se rodea de un plexo de vasos sanguíneos (arterio-venoso) que facilita sus funciones fisiológicas, el núcleo aumenta de tamaño, lo mismo que el número de mitocondrias, las cuales pierden funcionalidad y se vacuolizan, y hay una marcada proliferación del retículo sarcoplásmico. La relación parásito-célula nodriza es una interrelación activa y ambos tienen una alta demanda metabólica sobre el hospedador, funcionando como una placenta por la que el parásito obtiene sus nutrientes y elimina sus desechos (Despommier, 1990; Euzéby, 1994; Murrell y col., 2000). Este complejo se establece completamente a partir del día vigésimo de la entrada del parásito a la célula muscular, y las L1, ahora denominadas L1 musculares (L1m), nunca serán infectantes hasta que haya transcurrido ese tiempo (17 a 20 días post-ingestión). Pasados 30 días, la L1m mide de 800 a 1000 μm y comienza a enrollarse dentro de la célula (período de enquistamiento). Se forma así el quiste que mide 250 μm de ancho x 400-600 μm de largo, de aspecto fusiforme o alargado semejante a un limón, que contiene a la L1m enrollada en su interior. (Despommier, 1990; Euzéby, 1994; Murrell y col., 2000). La cápsula del quiste alcanza su máximo espesor entre los días 45 a 60 post-infección. Entre los tres y seis meses comienza la deposición de calcio, que se completa al año pudiendo llegar a provocar la muerte de la célula nodriza y del parásito. En otras ocasiones cuando un hospedador muere, la larva puede permanecer infectante por muchos días, a veces hasta meses, debido a que posee un metabolismo anaeróbico, que le permite sobrevivir aún en carnes putrefactas (Pozio, 2000). Se han citado casos en los que la L1m vivió 11 y hasta 24 años (Atías 1999; Despommier, 1990). En los quistes las larvas no pueden proseguir con su desarrollo, sino que deben esperar a que la carne en donde se encuentran sea ingerida por otro hospedador y así reiniciar el ciclo (Atías, 1999).

1.5. INTERACCIÓN PARÁSITO-HOSPEDADOR

La interacción parásito-hospedador es una relación simbiótica compleja, que puede analizarse en diversos sentidos. Los nematodos gastrointestinales (NGI) presentan una variedad de antígenos excretorios/secretorios específicos de cada etapa de su ciclo biológico. Dichas moléculas desencadenan la respuesta inmune del hospedador resultando generalmente en una cascada de reacciones que en muchos casos es protectora. Todos los mecanismos inmunológicos que se desarrollan en el hospedador al enfrentarse con un helminto están determinados genéticamente y resultan en la identificación de dos estrategias. La primera, resistencia, puede reducir el riesgo de una infección parasitaria evitándola, mejorando el tiempo de recuperación al eliminar la infección, o controlar la infección atacando la tasa de replicación del parásito. Se la describe como la habilidad de un organismo para reducir la carga parasitaria (resistencia cuantitativa) o para reducir la probabilidad de infección (resistencia cualitativa). La resistencia se relaciona inversamente con la carga parasitaria, siendo a menor carga, una mayor resistencia del hospedador quien expresa así su capacidad inmunológica para defenderse del parásito. Para el caso de *T. spiralis*, la cantidad de larvas recuperadas de los músculos del hospedero son una medida que expresa su resistencia/susceptibilidad y está altamente influenciada por el número de LRN que lograron migrar hacia este tejido desde el intestino (Bell, 1998). Otro índice utilizado también para medir la resistencia/susceptibilidad del hospedador es el ICRr de *T. spiralis* el cual relaciona el número de L1m recuperadas de un determinado músculo por cada larva infectante suministrada (Reiterová y col., 2009).

En la actualidad, se reconoce la importancia de una segunda estrategia, que es la tolerancia del hospedador. En el contexto de la ecología y la evolución, se considera tolerancia a la habilidad de un hospedador de limitar los efectos negativos en su organismo por un parásito determinado sin controlar la infección, y surge de la pendiente resultante entre la relación de la carga parasitaria y la salud corporal (Kutzer y Armitage, 2016). Sin embargo, aún no está claro el rol de los parásitos en inducir dicha tolerancia. La importancia de conocer e identificar las estrategias utilizadas por el hospedador y el parásito radica en la relación con la salud del primero; este puede vivir saludablemente con una alta carga parasitaria o morir con una carga baja,

dependiendo de factores inmunológicos, genéticos, ambientales, edad y estado nutricional (Råberg y col., 2009; Kutzer y Armitage, 2016).

Numerosas experiencias han estudiado la interacción parásito-hospedador utilizando nematodos y animales de laboratorio como modelo experimental, con el objetivo de desentrañar el amplio y complejo número de factores que se ven involucrados en el proceso. Una pregunta que surge de dichos estudios es si diferentes parásitos producen respuestas similares, pero son afectados de manera diferente por los componentes de dichas respuestas, o si producen respuestas de diferentes calidades en cada línea hospedadora. Los estudios comparativos son un enfoque para responder a esta pregunta. De esta manera, indican si los fenotipos de los hospedadores de alta o baja eficiencia en sus respuestas responden consistentemente cuando otra especie parasitaria se utiliza, sin importar los mecanismos involucrados en la protección del hospedador (Artis y Grencis, 2001; Blackwell y Else, 2002; Filbey y col., 2014; Kobets y col., 2012). Por ejemplo, Lee y Wakelin, en 1982 demostraron que la línea NIH contiene las infecciones con *T. spiralis* y *Trichuris muris* más rápidamente que la línea CBA, pero que ambas líneas respondieron de manera similar al enfrentarse con otro nematodo como *Heligmosomoides polygyrus* (Robinson y col., 1989; Wahid y Behnke 1993).

Incluso en líneas de ratones emparentadas cercanamente se ha demostrado que responden de manera diferente a la infección experimental con un mismo parásito, tal como lo demostraron Vasconi y col. (2008) con *H. polygyrus* y *Trypanosoma cruzi*, con *Trichinella spiralis* (Vasconi y col, 2015) y a infecciones naturales Orozco y col. (2018) con *Syphacia obvelata* y *Aspicularis tetraptera*.

Coincidentemente con esto, se ha demostrado que las distintas líneas de ratones poseen patrones definidos de respuesta a la infección por gusanos intestinales. Por ejemplo, se ha visto una respuesta inflamatoria más rápida en la línea NIH, cuando los ratones C57BL/10 lo hacen de manera deficiente (Alizadeh y Wakelin, 1982; Wakelin y Donachie, 1983). A pesar de esto, la respuesta también varía dentro de cada línea al enfrentarse con diferentes especies parásitas. La variabilidad en la respuesta, apuntada específicamente a la cantidad de gusanos en el intestino y a su tasa de rechazo en ratones endocriados, podría estar relacionada a una

inmunosupresión ligada al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), característica de difícil observación o control (Bell y Liu, 1988).

RESPUESTA INMUNE

El sistema inmune de los vertebrados está compuesto de dos brazos, la respuesta inmune innata (no específica) y la respuesta adaptativa (específica). Los componentes bioquímicos y celulares de ambas respuestas trabajan sincrónicamente para proteger a los vertebrados de un número variable de amenazas. La primera línea de defensa contra los NGI es el sistema inmune innato, el cual juega un rol en detectar a los parásitos, y luego inicia y conduce a la respuesta inmune adquirida. De particular relevancia para el establecimiento y sobrevivencia de los NGI son las barreras físicas innatas y, subsecuentemente el proceso por el cual el hospedador los reconoce y activa la respuesta inmune (McRae y col. 2015).

RESPUESTA INMUNE INNATA

La primera línea de la defensa innata contra los alimentos ingeridos y patógenos en el tracto gastrointestinal es la cubierta de moco que recubre la superficie interna, primariamente producida por células mucosas del cuello del estómago y por células epiteliales de Goblet en el intestino (McRae y col., 2015). El componente primario es la mucina; sin embargo, también contiene un conjunto de moléculas bioactivas como defensinas y factores trefoil que tienen actividad antimicrobiana y/o estimulan la inflamación (McGuckin y col., 2011). El aumento de la producción de moco, así como la presencia de sustancias inhibitorias en este se han observado consistentemente durante el desarrollo de la inmunidad a NGI (McRae y col., 2015). Las células epiteliales son claramente las primeras células del hospedador en entrar en contacto con los parásitos una vez que la barrera mucosa ha sido quebrada. Evidencias recientes de infecciones con *H. polygyrus*, *Nippostrongylus brasiliensis* y *T. spiralis* demuestran que las células epiteliales quimiosensibles llamadas células tuft, se expanden en la infección y son importantes al proveer señales tempranas que conducen a una inmunidad del tipo Th2 (Sorobetea y col., 2018). No está claro si estas células perciben directamente a las larvas o si captan señales producidas por otras

células epiteliales; sin embargo, aquellos ratones que no poseen células intestinales tuft no expulsan a *N. brasiliensis* (Gerbe y col., 2016) implicando al epitelio en la generación de una inmunidad protectora. Una vez que el parásito ha sido detectado por el epitelio y/u otras células no hemopoyéticas, la señal es transmitida hacia células del sistema inmune innato para que una cascada inflamatoria apropiada pueda iniciarse.

Los receptores similares a Toll (TLR) son proteínas transmembrana de un solo paso caracterizadas por su reconocimiento de PAMP/DAMP (patrones moleculares asociado a patógenos/patrones moleculares asociado a daño). Este reconocimiento lleva a la dimerización del TLR (Gay y Gangloff, 2007). El TLR dimerizado recluta una o más proteínas adaptadoras y activa una cascada de señalizaciones que activan un amplio abanico de respuestas inflamatorias y antimicrobianas que llevan a la maduración de la respuesta adaptativa. Los adaptadores de TLR son proteínas que se asocian y facilitan la señalización, siendo los dos más importantes MyD88 y TRIF. El reclutamiento selectivo de estos adaptadores hacia TLRs específicos activa distintas vías señalizadoras, que orquestan respuestas inmunes para cada TLR. Estas vías son mayormente clasificadas en dependientes de MyD88 y TRIF (Akira y col., 2006). Con la excepción del TRIF, que es reclutado por TLR3, todos los demás reclutan MyD88 como adaptador señalizador. Se ha demostrado que la señalización de TRIF es esencial para la función homeostática de las células epiteliales del intestino y que la señalización dependiente de TRIF tiene un rol central en la defensa del hospedador, como se ha evidenciado en los numerosos patógenos cuya estrategia de evasión involucra el ataque hacia esta vía (Ullah y col., 2016).

Las principales citoquinas derivadas del epitelio implicadas en la generación temprana de la inmunidad de tipo 2 son la IL25, IL33 y la linfopoyetina estromal tímica (TSLP) que estimulan la liberación de IL4, 5, 9 y 13 de varios orígenes, mayormente células linfoides innatas del tipo 2 (ILC2). Cabe aclarar que, aunque las células epiteliales tuft parecen ser los principales productores de IL25 en ratones, se ha visto en los humanos que los eosinófilos y basófilos también la producen (Sorobetea y col., 2018).

En el sitio de infección del tracto gastrointestinal, la liberación de citoquinas y otros mediadores inflamatorios producidos por células inmunitarias innatas reclutan a los mastocitos los cuales, aunque más conocidos por su rol en la respuesta alérgica, también han sido observados en infecciones contra helmintos. Estas son células inflamatorias que pueden responder directamente a los patógenos y enviar señales hacia otros tejidos regulando así tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa (Urb y Sheppard, 2012). Los mastocitos se distribuyen uniformemente y su activación ocurre predominantemente por estimulación inducida por antígeno de receptores de alta afinidad de IgE en la superficie de los mismos (McRae y col. 2015). Dehlawi y Wakelin (1995) demostraron que el aumento en los mastocitos de mucosa, un componente mayor de la respuesta intestinal a *T. spiralis*, fue similar en ratones expuestos a diferentes dosis infectantes, aumentando rápidamente entre los días 6 a 9 post-infección.

Además de que aumenten los mastocitos también se observa un aumento de los eosinófilos en la infección por nematodos. Los eosinófilos son producidos en las células madres hemopoyéticas de la médula ósea y su desarrollo y supervivencia es estimulado por las citoquinas TH2: IL3, IL5 y GM-CSF (Hogan y col., 2008). Los eosinófilos, escasos a nivel circulatorio, son relativamente abundantes en el tracto gastrointestinal y han sido tradicionalmente asociados con la defensa contra parásitos (Sorobetea y col., 2018). Luego de la infección, los eosinófilos proliferan en la sangre y migran al sitio de infección en respuesta a varias sustancias quimioattractivas, como IL5 y otras. A partir de la activación, las funciones de los eosinófilos incluyen regulación inmune, resistencia a la invasión parasitaria a través de la degranulación y reparación del tejido dañado. Estas funciones resultan en el daño y muerte de estadios larvales de muchos parásitos helmintos (McRae y col., 2015).

La IL13 es el eje para la protección contra la mayoría de los parásitos nematodos, quizás por su rol en la migración de las células dendríticas que subsecuentemente conducen la inmunidad adaptativa. Se ha visto que, al igual que la IL 4, también es fundamental en producir muchos de los mecanismos de expulsión en el intestino. La redundancia entre IL4 e IL13 posiblemente provenga de su uso compartido de la subunidad α del receptor de IL4 α (IL4R α) aunque, interesantemente, la deficiencia de este receptor en células T no tiene impacto en la expulsión en las

infecciones por *T. spiralis*, *H. polygyrus* o *N. brasiliensis* en contraste con la ablación total de esta subunidad. A diferencia de la IL13, la IL5 tiene un rol menos relevante en la inmunidad del tipo Th2. Su función es predominante para reclutar eosinófilos y como factor de crecimiento de éstos (Sorobetea y col.,2018).

La respuesta inflamatoria es un conjunto de respuestas fisiológicas y de comportamiento que incluyen pérdida de masa corporal, disminución de la actividad, aumento del hematocrito (HTO), aumento de los niveles de citoquinas inflamatorias y aumento de la masa del hígado y bazo (Bauss y col, 1987; Hart, 1988; Gabay y Kushner, 1999)

Estudios en ratones han mostrado que una sola inyección de lipopolisacáridos (LPS) genera una respuesta inflamatoria que resulta en un aumento significativo en la eritropoyesis desde la médula ósea hasta el bazo (Fruhman, 1966). La hiperplasia leucocítica en la médula ósea podría ser la causa de este cambio en la eritropoyesis (Elin y Wolff, 1976). En un estudio de Downs (2012), los ratones que recibieron una dosis de 60 µg de LPS de la enterobacteria *Escherichia coli*, tuvieron un hematocrito más alto que los no tratados o los valores basales de los animales antes del estudio.

En un estudio, Bauss y col. (1987) observaron que el hematocrito de los ratones C3H/He mostró un aumento significativo entre las 3 y 6 horas de la inyección tanto con LPS como del factor de necrosis tumoral (TNF). Niveles similares de hematocrito fueron obtenidos con TNF en los ratones que no respondieron a LPS (2,4mg/kg), pero estos animales no respondieron a la misma cantidad de LPS como la que le fue dada a los ratones C3H/He (3,0 mg/kg).

En un estudio realizado por Meagher (1998), se observó que los ratones de una línea provenientes de Garden Island infectados con el nematodo *Capillaria hepática* (*Calodium hepaticum*) tenían un aumento del hematocrito en relación a los animales sanos. Esto no sucedió al compararlos con ratones de la misma línea del condado de Mackinac. Es importante notar que solo los ratones de Garden Island comparten una historia evolutiva con la cepa de *C. hepática* utilizada en este experimento. Debido a que el hematocrito elevado aumenta la capacidad de transportar oxígeno, tal vez los ratones de Garden Island pueden desplegar un mecanismo para lidiar con la infección de *C. hepática* o una mayor respuesta porque el parásito es más dañino para ellos.

La evolución debida a una asociación histórica entre estas dos especies puede producir cualquiera de estos resultados. Estas diferencias pueden ser debido a que las historias de infecciones microbianas diferentes pueden haber alterado el ambiente maternal de estos ratones criados en laboratorio y producir diferentes mediciones pre y post-infección (Carlier y Truyens, 1995).

En el estudio de Dlugozs y col. (2013) los ratones infectados con *T. spiralis* tuvieron un hematocrito significativamente mayor comparado con los ratones no infectados una semana después de la infección. Dos semanas después de la infección el HTO disminuyó en los animales infectados por debajo del normal. Esto puede ser esperado, debido a que *T. spiralis* daña a los tejidos del hospedador produciendo pérdida de sangre y, en algunos casos, incluso anemia.

RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA

Una vez que el sistema inmune innato ha sido alertado acerca de la presencia de parásitos intestinales debe propagar la señal hacia los linfonódulos mesentéricos para iniciar la respuesta inmune adaptativa.

En el caso de *T. spiralis*, los antígenos que generan los cambios en el intestino son reconocidos por ser liberados del esticosoma y están también presentes en la cutícula de los gusanos (Ortega-Pierres y col., 1996), para ser luego presentados a las células presentadoras de antígeno (CPA). Las CPA, como las células dendríticas y macrófagos migran a los linfonódulos regionales a través del sistema linfático donde presentan los antígenos a receptores de células T a través de moléculas Carrier del MHC clase 1 o 2. La activación de células T "naive" por las CPA activa la respuesta inmune adaptativa y resulta en la liberación de citoquinas llevando a la diferenciación y proliferación de las células T (McRae y col., 2015).

Los receptores tipo Toll (TLR) juegan un papel fundamental en la activación de la inmunidad y el viraje hacia una respuesta Th1 o Th2. En ratones sin expresión de TLR2 (TLR2^{-/-}) se vio que la inmunidad se mantenía fijada en una respuesta Th1 debido a una disminución de IL10 y que esto los volvía más resistentes ante una infección contra la bacteria *Yersinia enterocolitica* o la levadura *Candida albicans* (Netea y col., 2004; Sing y col., 2002). Sin embargo, esta respuesta Th1 también ha

sido contraproducente en ratones infectados con *Staphylococcus aureus* (Kristian y col., 2003; Takeuchi y col., 2000) y *Streptococcus pneumoniae* (Echchannaoui y col., 2002; Koedel y col., 2003). También se ha visto en ratones TLR2^{-/-} un aumento en la mortalidad con *Mycobacterium tuberculosis* debido a una inflamación incontrolada de los pulmones (Quesniaux y col., 2004) lo que demostraría efectos protectores de la señalización mediante TLR2 en algunas infecciones.

La inducción de la inmunidad adaptativa es clave para la protección en contra de los NGI, y las células T juegan un rol importante en su expulsión como se evidencia en ratones atímicos o linfopénicos infectados por *T. spiralis* (Walls y col., 1973; Ruitenbergh y col., 1977). Se ha demostrado que la inmunidad es mediada por células T helper más que citotóxicas, ya que la transferencia de células T CD4⁺ adoptivas de ratones previamente infectados confieren protección en ratones susceptibles linfopénicos (Sorobetea y col., 2018). La respuesta Th1 ha sido asociada comúnmente con la respuesta a bacterias intracelulares, protozoos y virus. La cascada Th1 es desencadenada por la producción de IL12 por las células dendríticas, macrófagos y linfocitos B, lo que estimula la producción de la citoquina proinflamatoria IFN- γ y células NK (McRae y col., 2015). Tanto la IL12 como el IFN- γ inhiben la producción de la IL4, citoquina producida por los linfocitos Th2, en ratones infectados con nematodos intestinales (Finkelman y col., 1994).

Dentro de las células que son activadas ante la presencia de un antígeno por las células dendríticas se encuentran los linfocitos Tregs que son células especializadas en generar inmunosupresión usualmente ante antígenos propios del organismo. Se puede ver un aumento de la población de células Treg en un hospedador infectado por un helminto lo que se puede explicar como un mecanismo de evasión desarrollado por el parásito durante la evolución o podría ser un mecanismo homeostático del sistema inmune que minimiza la patología (Ilic y col., 2012).

Debido a las diferencias en los ciclos de *T. spiralis* y *H. polygyrus* se advirtió que los Treg presentan distintos beneficios para cada uno de ellos. Los adultos de *H. polygyrus* se benefician por una inducción de células Treg en el intestino del hospedador, lugar donde permanecen por un largo tiempo, y la inmunidad suprimida

mejora la producción de huevos y minimiza la patología del hospedador. En contraste, durante la fase intestinal, *T. spiralis* se beneficia de una respuesta inmune intensa que controla el número de LRN liberadas y previene de una invasión muscular masiva, que ocasionaría la muerte del hospedador. La población de células Treg en la infección por *T. spiralis* se ve aumentada en el sitio de inflamación muscular lo que beneficia la sobrevivencia del parásito durante esta etapa. De esta manera el parásito facilita la sobrevivencia del hospedador e influye en su propia longevidad. (Ilic y col., 2012).

Luego de la activación de los linfocitos CD4+ por los antígenos parasitarios, se desencadena una respuesta Th2 productora de anticuerpos. Las células Th2 producen una IL4 adicional junto con otras citoquinas (IL5, 9, 13 y 25), aunque algunos estudios sugieren que las IL4 y 13 provenientes de células T no son indispensables para la expulsión del parásito al menos en la infección por *N. brasiliensis* y pueden provenir de la inmunidad innata (Sorobetea y col., 2018). La IL 4 induce el cambio de clase y activación de células B llevando a la producción de IgE (McRae y col., 2015). *T. spiralis* provoca una vigorosa respuesta de IgE y eosinofilia periférica en ratones que alcanzan sus respectivos picos para el día 14 y 21 (Gurish y col., 2004).

Además de la presencia de los adultos en el intestino las L1 de *T. spiralis*, en su migración por el organismo, también colaboran en la inducción de la producción de IgE. Es más, se requiere un número mínimo de larvas migrantes L1 para inducir una respuesta efectiva de IgE hacia los gusanos intestinales, aunque la producción de IgE, al menos en ratones BCF1, no aumenta al aumentar la dosis infecciosa. También se puede argumentar que, en adición a las larvas migrantes, los quistes con las L1m en su interior, podrían inducir una potenciación de la respuesta de IgE, aunque resultados obtenidos por Santamarina y col. (1988) demostraron que el principal estímulo en la fase parenteral son las larvas migrantes. Rivera-Ortiz y Nussenzweig (1976) observaron que el número de quistes de *Trichinella* fue mayor cuando los títulos de anticuerpos fueron menores. El número de quistes musculares en ratones BALB/c que no producen IgE fue mayor al doble que los encontrados en ratones que no poseían esa deficiencia.

A partir de cortes histológicos se observó la presencia de IgE y unión con los gusanos, por lo que la IgE no solo facilita la expulsión de los gusanos del intestino sino

también contribuye a la respuesta a las larvas enquistadas en el músculo esquelético. El reclutamiento efectivo de granulocitos hacia los quistes musculares y el aumento de la tasa de necrosis de quistes en animales con producción normal de IgE avala su importancia en esta respuesta. Se cree que los mastocitos de tejido se activan con esta IgE y liberan un conjunto de sustancias capaces de reclutar una respuesta inflamatoria aguda. Capron y col. (1987), reportaron que la IgE puede opsonizar parásitos para luego ser destruidos por eosinófilos. Sin embargo, existe evidencia contradictoria de que los eosinófilos sean eficientes en la eliminación de las larvas intramusculares de *T. spiralis* (Beiting y col., 2007).

Cuando los antígenos helmínticos se unen a la IgE de las células llevan a una degranulación de mastocitos y a la liberación de mediadores solubles (Anthony y col., 2007). La sensibilidad de las células blanco a los mediadores de mastocitos es aumentada por las señales de IL4 y 13. Se ha demostrado en ratones que estas dos citoquinas promueven el aumento de contractibilidad de las células de músculo liso, aumento de permeabilidad de las células epiteliales y el aumento de hiperplasia de células de Goblet en la infección por nematodos. La presencia de IL4 en tejidos extravasculares induce la activación alternativa de macrófagos tisulares residentes, los que ayudan en la reparación de lesiones (McRae y col., 2015).

La IL5, además de desencadenar eosinofilia, aumenta la secreción de IgA por las células B. La citoquina Th2 IL13 induce la reparación de células epiteliales y la producción de moco y, en conjunto con la IL 9 recluta y activa mastocitos de mucosa. Por otro lado, las células T son una fuente muy importante de IL9, mediador en la expulsión de *N. brasiliensis* (Licona-Limón y col., 2013) y *T. spiralis* (Angkasekwina y col., 2013).

Una vez que la inmunidad adaptativa ha sido inducida en los linfonódulos locales las células efectoras activadas deben viajar de nuevo al sitio de infección para generar una reacción inflamatoria.

Expulsión de nematodos intestinales

Con infecciones de más de 400 larvas, a medida que la infección progresa, el número de adultos de *T. spiralis* en el intestino desciende alrededor de un 10 % hasta

que entre los días 17 y 20 la expulsión se hace más abrupta (Bell y Liu, 1988; Fariña y col., 2020). En este momento es cuando se produce el pico inflamatorio que luego disminuye rápidamente (Kamal y col., 2001). En el intestino delgado del ratón la inflamación produce una atrofia parcial de la vellosidad e hiperplasia de la cripta, características que coinciden temporalmente con la expulsión de gusanos adultos (Manson-Smith y col., 1979). También se observan mastocitosis de la mucosa, hiperplasia de las células de Goblet e hiperproducción de moco y aumento de la permeabilidad de la mucosa (Garside y col., 1992).

Quizás lo más importante de todo esto sea el aumento de la mucina que atrapa a los gusanos impidiendo su motilidad. Por ejemplo, aquellos ratones deficientes en la producción de moco son más susceptibles a la infección por *T. muris* y muestran un retardo en la expulsión (Hasnain y col., 2010). Sin embargo, *T. muris* y otras larvas de nematodos son igualmente capaces de penetrar la barrera mucosa de ratones normales indicando que han desarrollado estrategias para sobrepasarla. La respuesta inmune Th2, sin embargo, actúa no solo aumentando la proliferación de células de Goblet y la producción de moco sino también modificando las mucinas existentes por sulfatación y cambiando la secreción por Muc5ac, para hacerla más resistente a la degradación (Sorobetea y col., 2018). Consistente con esta información se ha visto que el Muc5ac solo se encuentra presente de manera importante en líneas de ratones resistentes (Hasnain y col., 2010) y que aquellos deficientes en esta mucina tienen una expulsión más retardada de *T. muris*, *N. brasiliensis* y *T. spiralis* (Hasnain y col., 2011).

Otro mecanismo de expulsión es la liberación de varias proteínas por granulocitos y células epiteliales. La contribución de cada molécula depende extremadamente del contexto ya que, por ejemplo, la acción de los eosinófilos *in vitro* es potente en matar gusanos, pero no son tan imprescindibles como se advierte en las infecciones por nematodos en ratones deficientes de eosinófilos (Fabre y col., 2009). Los mastocitos, por otra parte, contribuyen a la expulsión de nematodos a través de la liberación de varias proteasas que sirven para separar las uniones entre las células epiteliales y así favorecer la descamación de las células en las que los gusanos se hallan adheridos, especialmente en la infección por *T. spiralis* (Sorobetea y col., 2018).

Lawrence y col. (1998) encontraron que ratones deficientes en IL 4 fallaron en expulsar a los gusanos en el tiempo normal y que no mostraron atrofia de la vellosidad/hiperplasia de la cripta ni mastocitosis, que es consistente con información previa, pero que ratones deficientes en receptores del factor de necrosis tumoral α (TNF α) que sí expulsaron los gusanos tampoco mostraron los cambios, aunque la hiperplasia de la cripta sí ocurrió. Esta información implica que al menos dos componentes importantes de la patología inducida por nematodos gastrointestinales (atrofia de la vellosidad y mastocitosis), mediado a través de TNF α e IL 4 no son requeridos para la expulsión de los gusanos. Se puede concluir que varios de estos componentes, solos o en combinación, pueden producir la expulsión de los gusanos habiendo una considerable redundancia en el sistema (Kamal y col., 2001).

Cuando una infección helmíntica intestinal ha sido resuelta, la inflamación disminuye y el tejido dañando debe ser reparado. Este proceso se encuentra parcialmente dirigido por las citoquinas tipo 2 e involucra a varios tipos celulares, principalmente macrófagos y eosinófilos. Es por esto por lo que, a pesar de ser prescindibles para la expulsión de la mayoría de los nematodos, los eosinófilos podrían ser importantes para la reparación de heridas y la regeneración tisular. También se ha demostrado que los eosinófilos promueven la supervivencia de células plasmáticas en la médula ósea, así como la generación de células plasmáticas secretoras de IgA en el tracto gastrointestinal (al menos en el intestino delgado) sugiriendo que podrían tener un efecto en las reinfecciones donde los anticuerpos presumiblemente juegan un rol mayor. Es más, ratones deficientes de IL5 y eosinófilos, albergaron mayores números de larvas de *N. brasiliensis* luego de una segunda infección y lo mismo sucede con *T. spiralis* (Sorobetea y col., 2018).

Etapa de enquistamiento muscular

Concordantemente con la etapa de expulsión y reparación intestinal, en la infección con *T. spiralis*, los efectores inmunes deben enfrentarse al desafío con las larvas migrantes en las células del músculo estriado. A pesar de existir una respuesta de células B potente y persistente durante la infección muscular, la respuesta inflamatoria local a las células *nurse* es limitada, sugiriendo que actúan factores supresores del hospedador y del parásito (Fabre y col., 2009). Esto podría deberse a

que *T. spiralis* provoca un aumento de las células Treg en el sitio de la inflamación muscular. El rol de los productos excretorios/secretorios de la larva L1m en esta inhibición de la inflamación muscular no está claro, pero no puede ser descartado. El estímulo de la respuesta de células T por los antígenos de excreción/secreción de la L1m estimula a las células dendríticas generando una expansión de la población de células Treg. Dentro de las citoquinas producidas por estas células se encuentran la IL 10 y el factor de crecimiento transformante β (TFG- β) (Ilic y col., 2012) las cuales controlan la inflamación local (Fabre y col., 2009). La IL 10 limita la inflamación aguda, disminuye los niveles de IFN- γ y previene la producción de iNOS (sintetasa de óxido nítrico) por las células inflamatorias reclutadas al sitio de infección (Beiting y col., 2007).

La supresión de la respuesta Th1 por la IL10 durante la infección por *T. spiralis* reflejaría una adaptación biológica para limitar los mecanismos de eliminación intracelular durante el desarrollo larval dentro de las células musculares (Beiting y col., 2007). El efecto de la IL10 fue evidente 20 días después de la infección muscular, cuando se comparó a los C57Bl/6 con ratones deficientes de IL10; estos últimos tuvieron una respuesta local notoriamente incrementada. Se demostró que la inhibición de la iNOS mejora la sobrevivencia de las larvas en ratones deficientes de IL10 implicando al óxido nítrico en la eliminación de los parásitos (Fabre y col., 2009). A su vez, se comprobó que las larvas musculares de *T. spiralis* poseen la capacidad de generar productos antioxidantes, pero no así las larvas recién nacidas, sugiriendo que estas últimas serían vulnerables al daño oxidativo (Beiting y col., 2007).

En adición a la IL10 se conoce que el TGF- β media la supresión de células T (Zeller y col., 1999). El tratamiento de ratones normales con anticuerpos anti TGF- β promueve miositis; sin embargo, la deficiencia combinada de TGF- β e IL10 conduce a una respuesta inflamatoria mucho más severa en músculo. La depleción de TGF- β no afectó la sobrevivencia de los parásitos en el músculo, pero sí lo hizo en combinación con una deficiencia de IL10 (Beiting y col., 2007). Así se establece que el TGF- β coopera con la IL10 en el control de la inflamación local (Fabre y col., 2009). Las respuestas Th1 en ratones deficientes de IL10 y TGF- β destruyen a las larvas en una infección primaria mientras que una adecuada respuesta Th2 no lo hace (Beiting y col., 2007).

Entre los días 20 a 50 post-infección la respuesta inflamatoria disminuyó tanto en ratones normales como en los deficientes de IL10, sugiriendo que la inflamación crónica es independiente de IL10. La infección muscular generó una respuesta de anticuerpos de isotipos mixta dirigida a los antígenos larvales somáticos que varió a una respuesta predominante de IgG1 dirigida a los antígenos excretorios/secretorios portadores de tyvelosa (Beiting y col., 2004). El surgimiento de la IgG1 coincidió con la fase independiente de IL10. La IL10 limitó la reacción local en las primeras etapas de la infección muscular mientras que el control de la inflamación crónica es independiente de IL10 y coincidente con la aparición de una respuesta Th2 potente (Fabre y col., 2009).

Es válido remarcar que la mayor parte de estas cuestiones refieren a las infecciones primarias, mayormente con una alta carga parasitaria infectiva. Se debe recordar que las infecciones naturales por estos parásitos se presentan a través de desafíos repetidos con baja carga infectiva y que esto posiblemente inflencie el desencadenamiento de la respuesta del hospedador y las contribuciones relativas de los diferentes componentes inmunes a la resistencia parcial usualmente generada (Sorobetea y col., 2018).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS SUSTANTIVA

Las **diferencias genotípicas** entre cinco líneas de ratones derivadas de la población CF1 -dos pares de líneas con **selección** divergente por **peso corporal** y la línea testigo sin selección- están asociadas con **diferencias en la expresión** de la **interacción parásito-hospedador** ante un desafío experimental con *Trichinella spiralis*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar las **potenciales diferencias** en la **interacción parásito-hospedador** -con base en variables parasitológicas, hematológicas e histopatológicas- frente a un **desafío experimental con *Trichinella spiralis*** expresados por los **diferentes genotipos de las líneas derivadas de CF1**, producto de un proceso de selección fenotípica por peso y determinar el grado de influencia del genotipo en la interacción parásito-hospedador.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Primer objetivo específico

Evaluar en un desafío experimental de las líneas derivadas de la cepa CF1 con *Trichinella spiralis*, el **establecimiento o instalación de las larvas infectivas** en la etapa intestinal temprana (3 días post-infección), **la capacidad de expulsión de adultos intestinales** en la etapa intestinal tardía (15 días post-infección) y **la carga parasitaria muscular relativa y el índice de la capacidad reproductiva relativa** en la etapa parenteral o de enquistamiento (60 días post-infección).

Segundo objetivo específico

Determinar si las líneas derivadas de la cepa CF1 desafiadas experimentalmente con *Trichinella spiralis* presentan **alteraciones de tres indicadores hematológicos** -porcentaje de **eosinófilos periféricos**, porcentaje de

linfocitos periféricos y hematocrito- involucrados en la respuesta inflamatoria en las distintas etapas post-infección.

Tercer objetivo específico

Evaluar **diferentes alteraciones histopatológicas** en el duodeno en distintas etapas post-infección en las líneas derivadas de la cepa CF1 desafiadas experimentalmente con *Trichinella spiralis* y su asociación con los cambios hematológicos y las variables parasitarias.

Cuarto objetivo específico

Evaluar si se presenta **variabilidad en la capacidad de infección al transferir larvas musculares** de *Trichinella spiralis* desde líneas ***Mus musculus*** seleccionadas por peso a una **cepa de ratones** caracterizada por tener **distancia genética de las anteriores**.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES EXPERIMENTALES

LÍNEAS DERIVADAS DE LA CEPA CF1

La cepa CF1 proviene de una población de ratones albinos no suizos (*Mus musculus*) obtenida en 1935 en Estados Unidos, endocriados mediante apareamientos entre hermanos con el objetivo de disponer de animales genéticamente homogéneos, sanos y de alta productividad. A lo largo de las primeras 21 generaciones de apareamientos consanguíneos la población se vio reducida a una única pareja de reproductores. La población CF1 deriva del último cuello de botella que tuvo lugar en la generación 21. A partir de ese momento no se llevaron a cabo apareamientos hermana x hermano por lo que la nueva endocría fue producto de un proceso de limitación del tamaño efectivo (N_e) de la población (Zampini, 1986), transcurriendo alrededor de 90 generaciones hasta que se fundaron las líneas que aquí se describen (Oyarzabal y Rabasa, 1995).

En el año 1986, a partir de una población de ratones descendientes de la cepa CF1 existente en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNR, mantenida con $N_e \leq 80$, se formó una población testigo (t) sin selección de los reproductores, con $N_e \leq 40$. Utilizando como población base a animales t se fundaron dos pares de líneas con selección divergente por su peso corporal a los 49 días de edad:

par s: s' línea de selección positiva

s línea de selección negativa

par h: h' línea de selección positiva

h línea de selección negativa.

Los pares de líneas s y h se originaron a partir de las generaciones 2 y 8 de t , respectivamente, en los años 1986 y 1988 (Oyarzabal y Rabasa, 1995; Oyarzabal y Rabasa, 1999). Estas líneas constituyen un material biológico único en el país que fue incorporado al patrimonio de la Universidad Nacional de Rosario mediante Res. C.S. 559/2007.

La selección por peso es fenotípica seleccionándose en cada generación como reproductores los animales más pesados en s' y h' y los más livianos en s y h . Simultáneamente con el proceso selectivo se practicó endocría por limitación del número de individuos manteniendo la población con un $N_e \leq 8$ en las sucesivas generaciones. En el par h se realizaron exclusivamente apareamientos entre hermanos en las primeras generaciones, no así en el par s . En el momento de la realización de este trabajo las poblaciones t , el par s y el par h se encontraban en las generaciones 87, 84 y 79, respectivamente.

Si bien el criterio de selección en cada par de líneas fue el mismo (divergencia en peso corporal a los 49 días de edad), cada par se inició en diferentes momentos y se mantuvo cerrado, sin intercambio genético con los integrantes del otro par, por lo que la presencia de procesos dispersivos (efecto fundador y deriva génica) podría haber determinado la fijación de diferentes alelos en cada una de ellas y, por ende, ser causa de diferencias genéticas entre las mismas.

Como respuesta a la presión de selección aplicada, las líneas se diferenciaron en su peso corporal promedio. Los animales pertenecientes a las líneas con selección positiva por el carácter pesan, en promedio, un 60% más que los generados por selección negativa (Fig. 11, 12 y 13). Simultáneamente, con el progreso de la selección por peso, se produjo el deterioro de otros caracteres no seleccionados relacionados con la eficacia biológica tales como la fertilidad y la sobrevivencia y se observó, también, una menor estabilidad (Oyarzabal, 2006). Como resultado de estas respuestas correlacionadas, se modificaron el potencial reproductivo, la capacidad embrionaria, las estrategias de las líneas en cuanto al momento en que ocurren las mayores pérdidas gestacionales (Bernardi y col., 1999, 2009, 2011) y las curvas de crecimiento (Orozco y Oyarzabal, 2014, 2015). Estas respuestas no se observaron solo en las comparaciones entre las líneas con selección positiva y negativa por peso corporal dentro de cada par, sino también en aquellas seleccionadas por alto peso o bajo peso, entre sí. Por ejemplo, con relación a la infestación con parásitos de presencia habitual en roedores criados en bioterios convencionales, la línea h' presentó el menor número de huevos de *Syphacia obvelata*, diferenciándose de la otra línea seleccionada para alto peso (s). También fueron menores los valores de prevalencia, intensidad y abundancia en h' con respecto a s' (Orozco y col., 2018).

Estas diferencias sentaron un precedente a partir del cual se planteó la utilización de los pares de líneas pesadas y livianas, así como la testigo, para analizar su comportamiento ante un desafío con *T. spiralis*.



Figura 11. Ratones de las líneas testigo (*t*) y seleccionadas por peso (*h*, *h'*, *s* y *s'*)

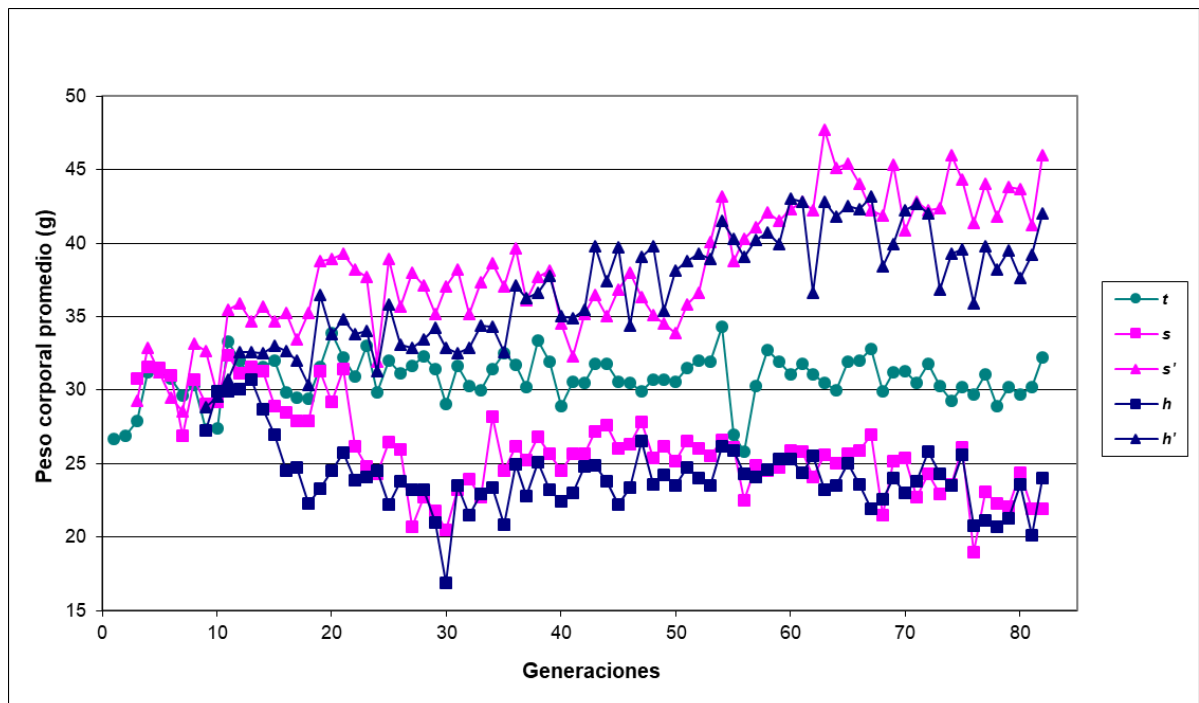


Figura 12. Modificación del peso corporal de ratones machos de dos líneas seleccionadas por alto peso (*s'* y *h'*), dos seleccionadas por bajo peso (*s* y *h*) y la línea testigo sin seleccionar (*t*)

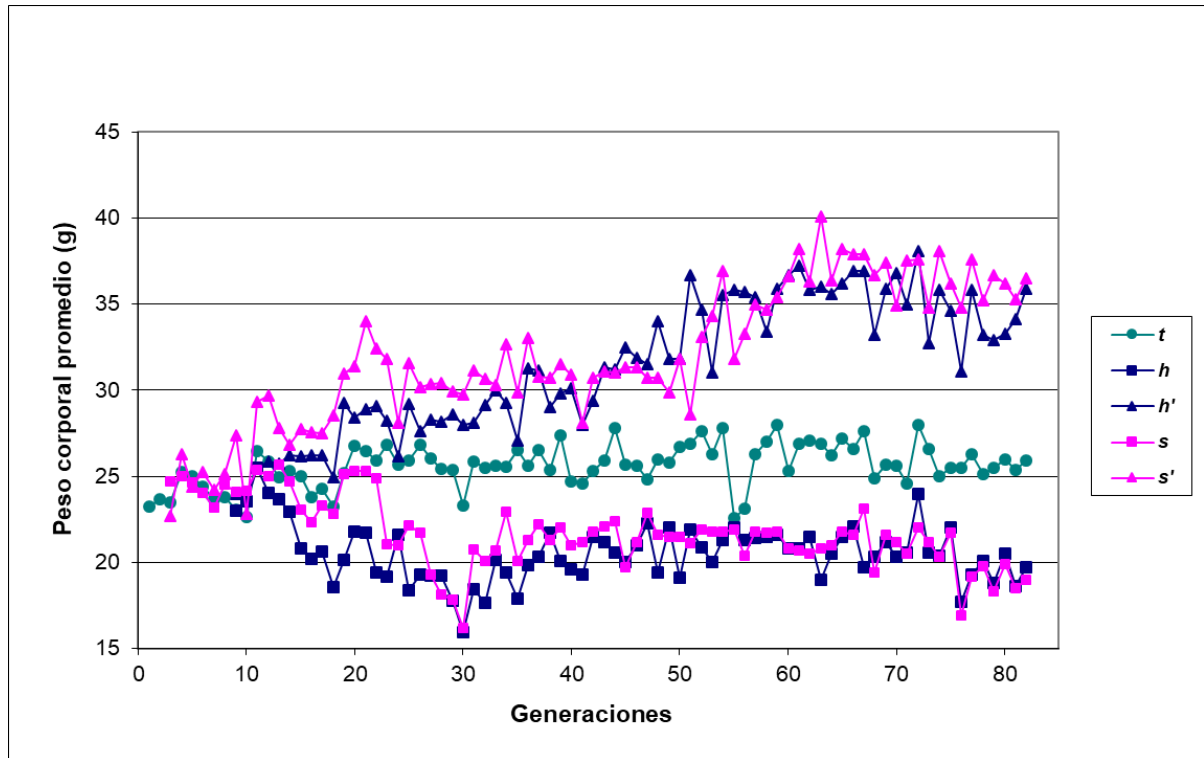


Figura 13. Modificación del peso corporal de ratones hembras de dos líneas seleccionadas por alto peso (s' y h'), dos seleccionadas por bajo peso (s y h) y la línea testigo sin seleccionar (t)

POBLACIÓN DERIVADA DE LA CEPA C57BL/6

En el año 1989, ingresaron a la cátedra de Parasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNR ratones (*Mus musculus*) provenientes de una colonia de la cepa C57BL/6. Esta cepa se originó en el Charles River Laboratories de EEUU y los animales ingresados fueron donados por el grupo de Reproducción del Hospital Italiano de Rosario. La población se mantiene sin selección de los reproductores, solo se observa el buen estado clínico de los animales. Los apareamientos son al azar y solo se evitan aquellos que implican consanguinidad estrecha tales como entre padres e hijos y entre hermanos (Figura 14).



Figura 14. Ratones, hembra y macho, derivados de la cepa C57BL/6

CONDICIONES DE ALOJAMIENTO Y MANEJO

Los animales se encuentran alojados en el Centro de Investigación con Animales de Laboratorio (CIAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario. Al destete, se identifican mediante señales en el pabellón auricular utilizando el sistema australiano, se separan por sexo y se alojan en número de seis por caja de polipropileno de 28x19x13,5 cm, con cama de viruta de madera, respetando los 238 cm² recomendados por animal (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011). Se les suministra *ad-libitum* agua y un alimento balanceado comercial con 24 % de proteínas (GEPESA Feeds). La temperatura se controla mediante un sistema frío/calor central, con termostato, permaneciendo en el rango de los 20 ± 2 °C. La ventilación se realiza a través de un sistema automático de ventilación forzada. El fotoperíodo requerido para la cría de los ejemplares se controla mediante temporizadores, con un ciclo de 12 h luz / 12 h oscuridad.

El manejo y cuidado de los animales se lleva a cabo según normas éticas reconocidas internacionalmente (Guide for the Care and Use of Laboratory Animal, 2011).

3.2. ORIGEN Y MANTENIMIENTO DE *Trichinella spiralis*

El parásito *T. spiralis* se obtuvo en el año 2013 por donación de la Dra. María Delia Vasconi (Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina). Esta cepa fue tipificada por PCR Múltiple como *T. spiralis* por el Dr. Silvio Krivokapich, Departamento de Parasitología, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos Malbrán", Buenos Aires, Argentina. La cepa se mantiene en el CIAL a través de pasajes periódicos en *Mus musculus* C57BL/6.

3.3. INFECCIÓN DE LOS RATONES CON *Trichinella spiralis*

Con el propósito de probar si existe variabilidad en la respuesta a la infección experimental con *T. spiralis* en las líneas seleccionadas y la línea testigo se obtuvieron larvas viables del nematodo para su posterior inoculación en los individuos sujetos al estudio.

OBTENCIÓN DE LAS LARVAS L1 INFECTIVAS

Para la obtención de larvas infectivas de *T. spiralis* se utilizaron los músculos esqueléticos estriados (diafragma, lengua, intercostales y abdominales) de ratones derivados de la cepa C57BL/6 con larvas enquistadas. Los ratones infectados se sacrificaron en cámara de CO₂ (AVMA, 2013). El procesamiento de los músculos se realizó mediante la técnica de digestión artificial enzimática (DAE) de acuerdo con el siguiente protocolo: los músculos se extrajeron por disección, se pesaron y procesaron con una picadora de carne eléctrica; se colocaron en una solución conformada por agua destilada, pepsina de cerdo 1:10000 1% P/V y ácido clorhídrico 1% V/V (Kapel y Gamble, 2000). La preparación se mantuvo en agitador magnético a 37-39 °C aproximadamente 1 hora y 30 minutos, hasta que el tejido se digirió por completo (Luebke, 2007). Luego se procedió a la filtración y el líquido obtenido se colocó en una ampolla de decantación Squibb, durante 30 minutos, para permitir la sedimentación de las larvas desenquistadas. Se recuperaron 50 ml del sedimento con las larvas L1 musculares en un tubo cónico y se dejó reposar por 15 minutos. Mediante el uso de una pipeta se aspiró de la superficie 40 ml de líquido sobrenadante dejando un volumen final de 10 ml. Para clarificar la muestra se agregó solución fisiológica estéril

hasta obtener nuevamente un volumen de 50 ml. Se dejó reposar 10 minutos y se aspiraron 40 ml conservando 10 ml. Este procedimiento se repitió tres veces y las larvas así obtenidas se reservaron para su posterior utilización (Res. 740/99 SENASA).

PREPARACIÓN DE LAS DOSIS INFECTIVAS E INOCULACIÓN

Los ratones fueron desparasitados 10 días previos a la infección según lo indicado por Harkness y col. (2010) con febendazol al 10 % e ivermectina al 1% oral (Canole y col., 2003) en el alimento para evitar la interferencia de otros endo y ectoparásitos con la infección artificial con *T. spiralis*.

Las larvas L1 musculares infectivas se administraron por vía oral mediante una cánula bucoesofágica para ratones (Luebke, 2007). Entre la obtención de las larvas musculares y la infección de los animales medió un lapso no mayor a 12 h post-sacrificio para asegurar la mayor viabilidad de las larvas infectivas. Esta fue una metodología que adoptó la cátedra de Enfermedades Parasitarias de la UNR para las infecciones experimentales con dicho parásito, tras haber determinado que, si ese lapso es superado las larvas comienzan a perder infectividad

La dosis infectiva de L1 musculares para cada ratón se calculó por alícuotas. La suspensión con las larvas se agitó en un vórtex para asegurar la distribución homogénea de las mismas en la muestra. A continuación, se extrajeron con micropipeta, alícuotas de 10 µl cada una las que se colocaron en portaobjetos. El número de larvas por portaobjeto se contó al microscopio óptico a 10X obteniéndose el total de larvas por ml. La solución inicial total se diluyó hasta obtener la dosis buscada en el volumen final de 0,1 ml de solución, utilizado para la administración de las larvas a cada ratón. Para evitar que las larvas se adhirieran a las paredes de la jeringa durante la inoculación, antes de cada desafío, las larvas se resuspendieron mediante pequeños movimientos del émbolo de la misma. Luego de vaciar el contenido en el estómago del animal, se aspiró con la misma jeringa 0,1 ml de solución fisiológica, se repitió el proceso de resuspensión y se volvió a inocular. Este último paso se realizó dos veces por animal y permitió descargar la mayor cantidad posible de larvas, disminuyendo el error en la dosis infectiva. Entre cada infección se lavó la sonda bucoesofágica y se descartó la jeringa utilizada (Bell y Liu, 1988).

Con el fin de controlar los signos de la enfermedad relacionados con el estrés de los animales, se observaron semanalmente los cambios en el aspecto general, en el comportamiento y/o en las actitudes posturales asociadas al dolor (Guide for the Care and Use of Laboratory Animal, 2011) para determinar el criterio de la aplicación del “punto final humanitario” (Guidelines on choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research, teaching and testing, 1998).

3.4. COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA AL DESAFÍO CON *Trichinella spiralis* DE LÍNEAS DERIVADAS DE CF1 EN DIFERENTES ETAPAS DEL CICLO BIOLÓGICO

El estudio del desafío con *T. spiralis* se dividió en tres fases: (a) fase intestinal temprana, (b) fase intestinal tardía y (c) fase parenteral o de enquistamiento de las larvas en los músculos estriados. Esta división se fundamentó en que cada una de las fases mencionadas comprende diferentes estadios del parásito, así como diferentes procesos de interacción parásito-hospedador.

3.4.1. FASE ENTERAL DE LA INFECCIÓN

ETAPA INTESTINAL TEMPRANA. COMPARACIÓN DEL NÚMERO DE PARÁSITOS ADULTOS EN LAS CINCO LÍNEAS A LOS TRES DÍAS POST-INFECCIÓN

Para evaluar el número total de nematodos adultos de *T. spiralis* establecidos al día 3 post-infección, se infectaron por vía oral, cinco ratones machos adultos entre 100 y 120 días de vida. El tamaño muestral utilizado fue similar al informado por Fariña y col. (2020). La edad mencionada corresponde a aquella en que los ratones de estas líneas alcanzan su peso asintótico (Figallo y Oyarzabal, 1989; Orozco y Oyarzabal, 2014, 2015). Se utilizó una dosis infectiva de 400 larvas musculares, valor elegido por estar dentro del rango de dosis que se ha demostrado que constituye la base experimental para separar los fenotipos de ratones de acuerdo a su capacidad de rechazo del nematodo *T. spiralis* (Bell y Liu, 1988).

Se utilizaron machos debido a que las hembras resultan, en general, más resistentes a las infecciones parasitarias (Morales-Montor y col., 2004).

El día del desafío se consideró como día 0. La etapa intestinal temprana se estudió luego de transcurridos 3 días post-infección (dpi). Previo al sacrificio en cámara de CO₂ (AVMA, 2013), los ratones se pesaron en balanza digital electrónica.

Para recuperar los parásitos adultos, los intestinos delgados fueron diseccionados en su totalidad y, con tijera de bordes romos, se abrieron longitudinalmente en toda la extensión. Se colocaron en placas de Petri con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) compuesta por cada 1000 ml de solución: cloruro de sodio (NaCl) (8000 mg), cloruro de potasio (KCl) (400 mg), fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) (60 mg), glucosa (1000 mg), fosfato de sodio dibásico anhidro (Na₂HPO₄) (48 mg), sulfato de magnesio anhidro (MgSO₄) (98 mg), cloruro de calcio anhidro (CaCl₂) (140 mg), bicarbonato de sodio (NaHCO₃) (350 mg), pH = 7,5 (Sánchez, 2009). Se dejó incubar durante 4 horas en estufa a 37 °C. Se removió el intestino de la solución y con una pinza de mano izquierda se arrastró la mucosa y el contenido intestinal. El líquido fue trasvasado a tubos de centrífuga de 50 ml. Se dejó sedimentar por 30 minutos. Se retiró el sobrenadante y el sedimento fue colocado en alcohol al 70 % para conservación de los ejemplares (Wakelin y Wilson 1977; Grecis, 1982; Gamble, 1985; Luebke, 2007). Cada parásito se recuperó bajo lupa estereoscópica.

Se registraron las siguientes variables:

- peso en gramos del ratón previo a la infección: **P0₃**
- peso en gramos del ratón a los 3 días post-infección: **P3**
- número de gusanos de *T. spiralis* recuperados del intestino a los 3 días post-infección por ratón: **NA3**

y se calculó el

- porcentaje de larvas establecidas al día 3 post-infección de la i-ésima línea:

$$\%E_i = (NA3_i / \text{dosis infectiva}) * 100,$$

donde $NA3_i$ es el promedio de NA3 de la i-ésima línea.

ETAPA INTESTINAL TARDÍA. COMPARACIÓN DEL NÚMERO DE PARÁSITOS ADULTOS EN LAS CINCO LÍNEAS A LOS 15 DÍAS POST-INFECCIÓN

Con el mismo procedimiento y la misma cantidad de animales utilizados para la etapa temprana, se evaluó la capacidad de expulsión de los ratones frente a la infección con *T. spiralis* a los 15 dpi. Los ratones fueron pesados y luego sacrificados en cámara de CO₂.

Para la recuperación de los parásitos en el intestino se utilizó la misma técnica explicada en el apartado anterior. Se evaluó la expulsión de adultos mediante el índice

de expulsión que relaciona el número de adultos encontrados en el intestino con la dosis infectiva (Wakelin, 1980).

Se registraron las siguientes variables:

- peso en gramos del ratón previo a la infección: **P0₁₅**
 - peso en gramos a los 15 días post-infección: **P15**
 - número de gusanos adultos de *T. spiralis* a los 15 días post-infección por ratón: **NA15**
- y se calculó el

- índice de expulsión al día 15 post-infección de la i-ésima línea:

$$IE_i = 1 - (NA15_i / \text{dosis infectiva}),$$

donde $NA15_i$ es el promedio de NA15

- proporción de expulsión de gusanos adultos a los 15 días post-infección de la i-ésima línea:

$$PE_i = IE_i \times 100$$

Para calcular el número real de gusanos adultos rechazados en un período de tiempo se consideró el porcentaje de la dosis infectante de parásitos adultos que se establecieron al día 3 post-infección (Bell y Liu, 1988). A tal fin se calcularon las siguientes variables:

- índice de expulsión al día 15 post-infección de la i-ésima línea:

$$IE(NA3)_i = 1 - (NA15_i / NA3),$$

donde $NA15_i$ es el promedio de NA15 y $NA3_i$ es el promedio de NA3

- proporción de expulsión de gusanos adultos a los 15 días post-infección de la i-ésima línea:

$$PE(NA3)_i = IE(NA3)_i \times 100$$

El significado de las diferencias entre **PE** y **PE(NA3)** se evaluó con un análisis de la variancia.

3.4.2. FASE PARENTERAL DE LA INFECCIÓN. ENQUISTAMIENTO

Con el mismo procedimiento y la misma cantidad de animales utilizados en las etapas anteriores, se estudió la etapa de infección crónica a los 60 dpi, cuando las L1m ya se encuentran enquistadas. Los ratones se pesaron y sacrificaron en cámara de CO₂. Se diseccionaron y pesaron el diafragma y la lengua. Cada órgano fue

seccionado en pequeños trozos y colocado en el líquido de DAE. Se dejaron entre 8 a 12 h los diafragmas y entre 12 a 24 h las lenguas, en estufa a 37 °C, hasta que los tejidos se digirieron por completo. El sobrenadante fue descartado y las larvas conservadas en formol al 10%. Se contaron en microscopio óptico a 4X.

En cada ratón se registraron las siguientes variables:

- peso en gramos del ratón previo a la infección: **P0₆₀**
 - peso en gramos a los 60 días post-infección: **P60**
- y se calculó la carga parasitaria muscular relativa: **CPr** (número de larvas por gramo de músculo)

El índice de la capacidad reproductiva relativa, medida de la resistencia/susceptibilidad del hospedador (Bolas Fernández y Wakelin, 1989) se estimó relacionando la carga parasitaria en los músculos con la dosis infectiva.

- índice de la capacidad reproductiva relativa de la i-ésima línea:

$$\mathbf{ICRr}_i = \mathbf{CPr}_i / \text{dosis infectiva},$$

donde \mathbf{CPr}_i es el promedio de CPr de la i-ésima línea.

Este índice se calculó tanto para el diafragma como para la lengua.

Considerando que los adultos encontrados al día 3 dpi son aquellos que se establecieron y llevaron a cabo la infección, en esta fase el índice de la capacidad reproductiva relativa en diafragma y lengua se calculó considerando al establecimiento de los parásitos al día 3.

- índice de la capacidad reproductiva relativa de la i-ésima línea:

$$\mathbf{ICRr(NA3)}_i = \mathbf{CPr}_i / \mathbf{NA3}_i,$$

donde \mathbf{CPr}_i y $\mathbf{NA3}_i$ son los promedios de CPr y NA3 de la i-ésima línea.

Mediante un análisis de la variancia se comprobó si existían diferencias significativas entre **ICRr** y **ICRr(NA3)**.

Además, se calculó:

- el porcentaje de ratones que eliminaron el 50% de los adultos establecidos al día 15 post-infección de la i-ésima línea:

$$\mathbf{PR50}_i (\%) = (\text{nro. de ratones que eliminaron el 50\% de los adultos de la } i\text{-ésima línea} / \text{total de ratones de la } i\text{-ésima línea}) \times 100$$

- la razón entre el número de larvas enquistadas en diafragma y lengua a los 60 días post-infección y el número de adultos en el intestino a los 15 días de la i-ésima línea:

$$\mathbf{RD}_i = \mathbf{CPr}_i / \mathbf{NA15}_i$$

$$\mathbf{RL}_i = \mathbf{CPr}_i / \mathbf{NA15}_i$$

Como se expresó anteriormente, mientras haya adultos en la luz intestinal, estos se seguirán reproduciendo y las LRN continuarán ingresando a la circulación sistémica terminando su recorrido en los músculos esqueléticos. En consecuencia, cuantos más adultos permanezcan mayor tiempo en el intestino, la cantidad de LRN con las que se verá desafiado el sistema inmune del hospedador será mayor. Estos índices expresan la asociación relativa entre las larvas musculares enquistadas y cada nematodo adulto presente en el intestino a los 15 días y son indicadores de la eficiencia de la respuesta de la fase parenteral en la infección con *T. spiralis*. El ciclo de vida de *T. spiralis* es un proceso continuo en donde el ciclo del parásito, si bien puede ser dividido en etapas para su mejor estudio y comprensión, se producen de manera continua y solapadas entre sí. El ICR comprende a la infección desde el inicio hasta el enquistamiento, y aunque es un índice de la resistencia/susceptibilidad del hospedador, no permite estudiar la interacción parásito-hospedador en las diferentes etapas del parásito. RD y RL intentan explicar de alguna manera la interacción en una etapa más avanzada, es decir, la etapa parenteral.

3.5. EFECTO DE LA INFECCIÓN CON *Trichinella spiralis* EN LA COMPOSICIÓN SANGUÍNEA DE LAS LÍNEAS DERIVADAS DE LA CEPA CF1

DETERMINACIÓN DE LA FÓRMULA LEUCOCITARIA RELATIVA Y EL HEMATOCRITO

La determinación de los parámetros hematológicos se llevó a cabo en los mismos animales infectados a los 3, 15 y 60 días. La fórmula leucocitaria relativa se

determinó mediante extendidos sanguíneos obtenidos de una gota de sangre de la punta de la cola (Diehl y col., 2001; Hoff, 2000). Los preparados se fijaron y colorearon con May Grunwald Giemsa y se contaron 100 células de la serie blanca.

Inmediatamente previo a la infección, se realizó la fórmula leucocitaria relativa de todos los animales utilizando los datos obtenidos como valores basales. Al momento del sacrificio de los animales de los 3 y 15 días se les extrajo una nueva muestra de sangre. Para el grupo de animales infectados y sacrificados a los 60 días, se realizaron extendidos sanguíneos a los 3 dpi y luego cada 15 días.

Se calcularon los siguientes indicadores:

- porcentaje eosinófilos periféricos: **E**
- porcentaje de linfocitos periféricos: **L**

Además, previo al sacrificio, en cada tiempo de infección, se extrajeron muestras de sangre mediante punción cardíaca aplicándose previamente anestesia terminal en base de CO₂ (Parasuraman y col., 2010; SOP, 2017; AEC SOP 51, 2016 y AVMA, 2013).

Las muestras se recogieron en microcontenedores con EDTA procesándose en un equipo Auto Hematology Analyzer BC-2800Vet y de los valores obtenidos del hemograma, se evaluó el siguiente indicador:

- hematocrito: **HTO**

3.6. EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA DEL INTESTINO

Los cambios histopatológicos a nivel del duodeno se evaluaron en forma cualitativa (descripción de las alteraciones) y en forma cuantitativa (determinación del valor de distintas variables).

Para la evaluación histopatológica y morfometría de las vellosidades, se tomaron dos muestras (secciones transversales) del duodeno de cada ratón de cada una de las cinco líneas y sus controles, en cada momento de infección. Las muestras de 0,5 cm de longitud se tomaron a partir del píloro y se fijaron en formol al 10 % (v/v) hasta su procesamiento en forma rutinaria para su inclusión en parafina. Se realizaron secciones (de entre 2 y 3 μ m) del tejido en parafina las que fueron teñidas con

hematoxilina y eosina (HE). Para la evaluación de las células mucosas se utilizó la tinción especial de ácido Peryódico de Schiff (PAS).

La densidad relativa de células mucosas o células de Goblet en las secciones de duodeno de cada ratón se evaluó de forma semicuantitativa de acuerdo al número de dichas células en tres campos microscópicos a 200 aumentos. Los resultados se categorizaron como: esporádicas (0), escasas (+), moderada (++) y abundantes (+++) utilizando el siguiente criterio:

- Menos de 5 por unidad cripta vellosidad esporádicas
- De 5 a 25 escasas
- De 25 a 50 moderado
- Más de 50 abundantes

Para el estudio morfométrico se tomó una fotografía por cada una de las dos secciones de duodeno de cada ratón. En cada sección se realizaron 10 mediciones de cada una de las siguientes variables:

- longitud en μm de la glándula de Lieberkühn: **G** (Figura 15)
- longitud en μm de la vellosidad: **V** (Figura 15)
- espesor en μm de la lámina propia de la vellosidad a nivel de la base: **B** (Figura 16)
- espesor en μm de la lámina propia de la vellosidad a nivel del centro: **Ce** (Figura 16)
- espesor en μm de la lámina propia de la vellosidad a nivel del ápice: **A** (Figura 16)

Cada una de estas variables fue medida en los animales infectados y en los animales controles de cada una de las líneas, denominándose como: I (infectados) y C (controles).

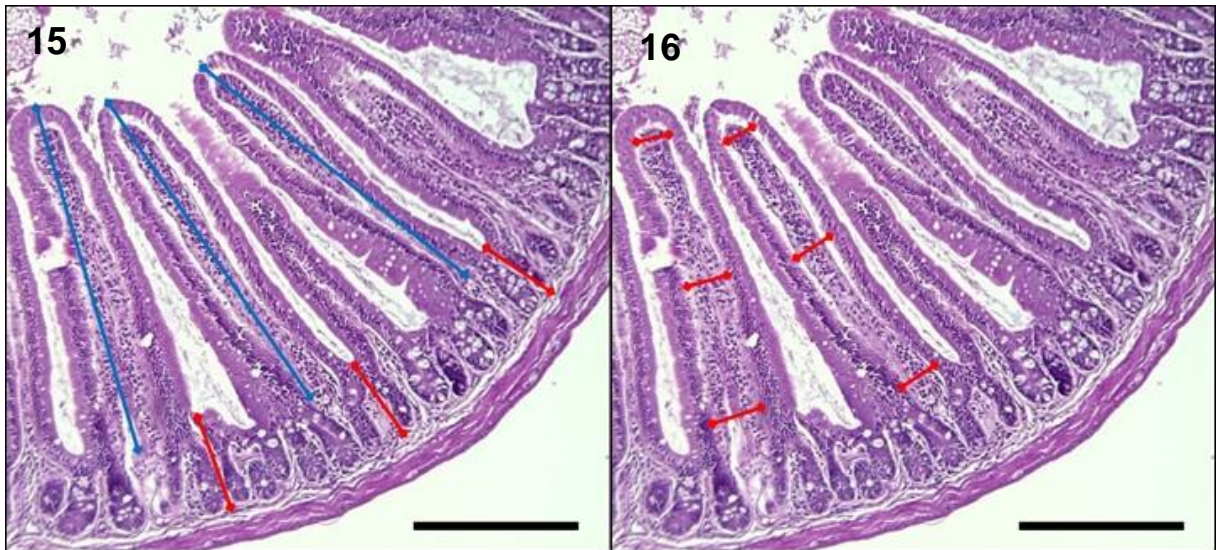


Figura 15. Microfotografía del intestino de un ratón. Medición de la longitud de la vellosidad desde la base hasta el extremo apical (línea azul) y medición de la glándula (línea roja). Barra: 150 µm. Figura 16. Microfotografía del intestino de un ratón. Medición de la longitud de la vellosidad a nivel de la base, centro y ápice (línea roja). Barra: 150 µm.

Tomando en cuenta las diferencias de peso de las líneas en estudio, los valores promedios de las longitudes de las vellosidades y de las glándulas de los ratones infectados se relacionaron a los correspondientes promedios de los ratones controles.

Se calcularon los valores de las siguientes variables derivadas:

- 1. RLG: relación de la longitud media de la glándula de los ratones infectados (I) con respecto a la longitud media de la glándula de los ratones no infectados (C):

$$\mathbf{RLG} = G I_i / G C_i,$$

donde $G I_i$ y $G C_i$ son los promedios de GI y GC de la i -ésima línea.

- 2. RLV: relación de la longitud media de la vellosidad de los ratones infectados (I) con respecto a la longitud media de la vellosidad de los ratones no infectados (C):

$$\mathbf{RLV} = V I_i / V C_i,$$

donde $V I_i$ y $V C_i$ son los promedios de VI y VC de la i -ésima línea.

- 3. RLB: relación de la longitud media de la vellosidad de los ratones infectados (I) a nivel de la base con respecto a la longitud media de la vellosidad a nivel de la base de los ratones no infectados (C):

$$\mathbf{RLB} = B I_i / B C_i,$$

donde $B I_i$ y $B C_i$ son los promedios de BI y BC de la i -ésima línea.

- 4. RLCe: relación de la longitud media de la velloidad de los ratones infectados (I) a nivel del centro con respecto a la longitud media de la velloidad a nivel del centro de los ratones no infectados (C):

$$\mathbf{RLCe} = CeI_i / CeC_i,$$

donde CeI_i y CeC_i son los promedios de CeI y CeC de la i -ésima línea.

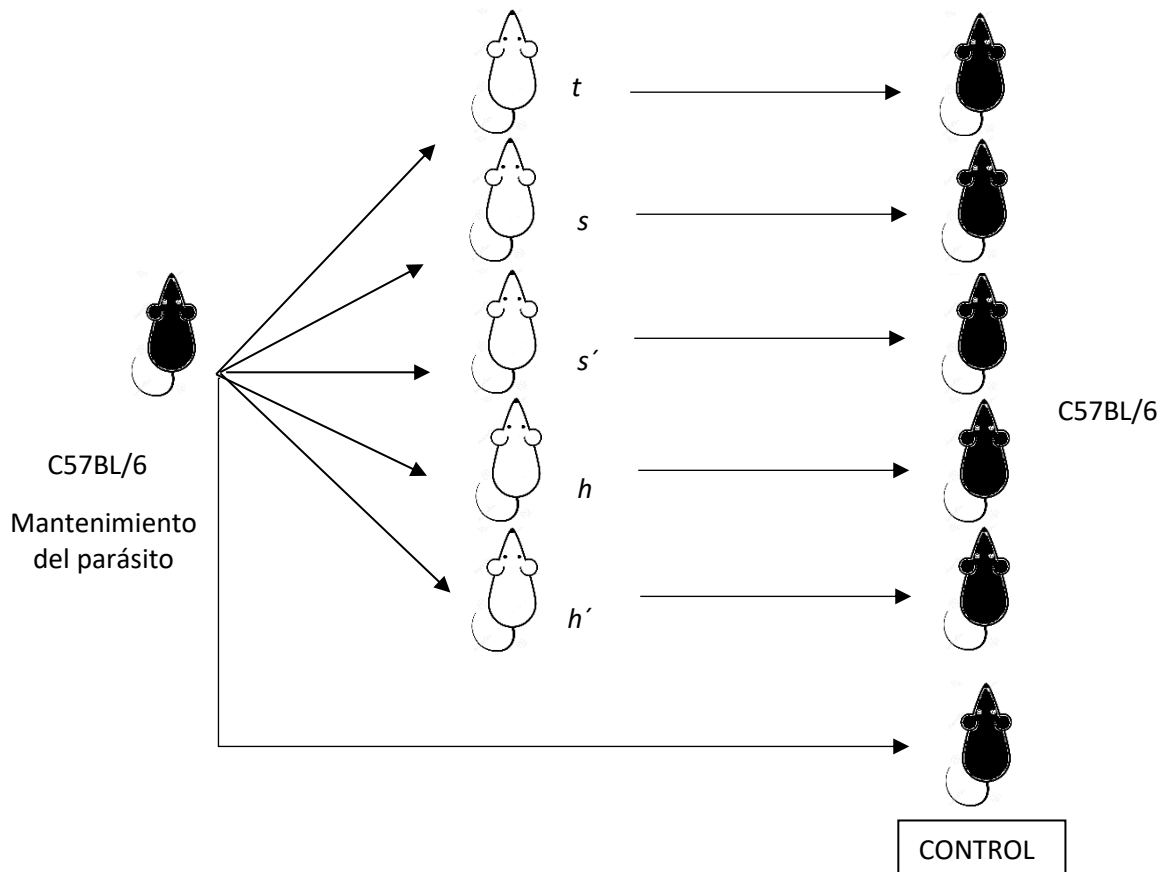
- 5. RLA: relación de la longitud media de la velloidad de los ratones infectados (I) a nivel del ápice con respecto a la longitud media de la velloidad a nivel del ápice de los ratones no infectados (C):

$$\mathbf{RLA} = AI_i / AC_i,$$

donde AI_i y AC_i son los promedios de AI y AC de la i -ésima -línea.

3.7. ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DE *T. spiralis* EN C57BL/6 LUEGO DE UN PASAJE POR LAS LÍNEAS SELECCIONADAS

El procedimiento realizado para evaluar el efecto sobre la capacidad reproductiva de *T. spiralis* en C57BL/6 luego de haber pasado por las líneas seleccionadas por peso se esquematiza en la Figura 17.



* El origen de las flechas indica la procedencia de las larvas con las que se infecta cada línea

Figura 17. Esquema de pasajes de *T. spiralis* entre líneas

Por cada línea derivada de la cepa CF1, se infectaron por vía oral cinco ratones C57 BL/6 adultos de entre 100 y 120 días de edad con 300 L1m (Fabre y col., 2009) provenientes de cada una de las primeras. Luego de transcurridos 30 días desde la infección, los ratones fueron sacrificados en cámara de CO₂. Se diseccionó el diafragma de cada uno, y se digirió enzimáticamente siguiendo el mismo procedimiento ya mencionado. Se contaron las larvas L1m encontradas en cada uno de los músculos.

Como grupo control se infectaron cinco ratones C57 BL/6 con 300 larvas cada uno, provenientes de la misma línea.

En cada ratón se contó el número de larvas musculares recuperadas en diafragma y se calculó la carga parasitaria relativa (larvas por gramo de músculo) en C57BL/6 provenientes de la línea i:

CPr DC57_i

Se estimó el siguiente índice por línea:

- índice de la capacidad reproductiva relativa al diafragma de la línea i:

$$\mathbf{ICRrC57}_i = CPr DC57_i / LMCF1_i,$$

donde *CPr DC57_i* es el promedio de L/g DC57_i y *MCF1_i* es el número de larvas musculares infectivas suministradas de la línea CF1_i.

Como en este caso no se realizó el conteo del número de gusanos adultos establecidos al día 3 post-infección, se calculó al ICRr con la dosis infectiva suministrada.

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Como se mencionó, las líneas difieren en sus pesos medios a los 49 días de edad como resultado de la selección fenotípica realizada por este carácter. Se utilizaron machos adultos de 100 a 120 días de edad, que se pesaron al inicio de cada uno de los experimentos y previo a su sacrificio luego de cada uno de los tiempos de infección analizados (3, 15 y 60 dpi).

Para comprobar si el peso de los animales previo a la infección difería del registrado al momento del sacrificio para cada etapa, se realizaron análisis de la variancia y pruebas de comparación de medias de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

El número de parásitos adultos, generalmente, no presenta distribución normal. Por lo tanto, en primer lugar, a los 3 y 15 dpi se probó la hipótesis de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk. En los casos en que la hipótesis no fue rechazada, se probó si existían diferencias entre las medias de las líneas por análisis de la variancia y, de encontrarse entre ellas, se realizaron pruebas de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer. Cuando la hipótesis de normalidad fue rechazada se probó si existían diferencias entre las medianas de las líneas mediante el test de Kruskal-Wallis.

El mismo procedimiento aplicado para el número de parásitos adultos se siguió para las variables: carga parasitaria relativa (número de larvas por gramo en

diafragma y lengua (CPr D y CPr L)), porcentaje de eosinófilos periféricos (E), porcentaje de linfocitos periféricos (L) y hematocrito (HTO) (Sokal y Rohlf, 1979).

Las lesiones histopatológicas en vellosidades y glándulas del intestino se evaluaron en una escala cualitativa: a) atrofia/fusión de vellosidades: no evidente, leve, moderada; b) infiltrado inflamatorio: discreto, leve, moderado; c) glándulas: normales, reactivas, hiperplásicas.

La evaluación cuantitativa de las lesiones se realizó estimando las medias aritméticas y los errores estándar de las longitudes de las vellosidades (V, B, Ce y A) y de las glándulas (G) del duodeno por línea y tiempo de infección. Para probar si existían diferencias entre líneas y tiempos, se llevaron a cabo Análisis de la Variancia y pruebas de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer, previa transformación de V, B, Ce, A y G en variables relativas a los promedios de V, B, Ce, A y G de los grupos control (RLV y RLG).

4. RESULTADOS

4.1. COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA AL DESAFÍO CON *Trichinella spiralis* DE LÍNEAS DERIVADAS DE CF1 EN DIFERENTES ETAPAS DEL CICLO BIOLÓGICO

4.1.1 FASE ENTERAL DE LA INFECCIÓN

ETAPA INTESTINAL TEMPRANA. COMPARACIÓN DEL NÚMERO DE PARÁSITOS ADULTOS EN LAS CINCO LÍNEAS A LOS TRES DÍAS POST-INFECCIÓN

La Tabla 1 resume los pesos corporales de los ratones de cada una de las cinco líneas antes y a los tres días del desafío con el parásito.

No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los pesos promedio de los ratones previo a la infección y a los 3 días post-infección por línea. Las diferencias entre líneas en cada momento se explican por los procesos de selección fenotípica por peso.

Tabla 1. Peso corporal de los ratones previo al desafío con el parásito y a los 3 días post-infección, por línea

| | <i>t</i> | <i>s</i> | <i>s'</i> | <i>h</i> | <i>h'</i> |
|------------------------|----------|----------|-----------|----------|-----------|
| <i>P0</i> ₃ | 36,5±0,7 | 27,5±0,7 | 51,9±2,1 | 28,4±1,0 | 55,7±2,2 |
| <i>P3</i> | 36,4±0,9 | 27,4±0,5 | 52,4±2,5 | 29,0±1,8 | 56,0±2,4 |

*P0*₃: peso corporal (g) pre-infección.
P3: peso corporal (g) al día 3 post-infección.
 Todos los valores corresponden a la media aritmética ± error estándar.

Tabla 2. Número de adultos de *T. spiralis* presentes en el intestino y la proporción de larvas establecidas en el intestino a los 3 días post-infección, por línea de ratones

| | <i>t</i> | <i>s</i> | <i>s'</i> | <i>h</i> | <i>h'</i> |
|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <i>NA3</i> | 280,6±6,5 | 287,2±5,9 | 287,4±7,1 | 293,2±5,4 | 278,2±3,9 |
| %E | 70,1 | 71,1 | 71,9 | 73,3 | 69,6 |

NA3: número de gusanos adultos a los 3 días post-infección (media aritmética ± error estándar);
 %E: porcentaje de larvas establecidas al día 3 post-infección.

El número de parásitos adultos en el intestino a los 3 dpi presentó distribución normal (prueba de normalidad de Shapiro-Wilk: $p > 0,05$). La Tabla 2 presenta los valores promedio de dicho carácter.

No se observaron diferencias significativas entre el número de adultos promedio por línea ($p > 0,05$).

De la dosis infectiva de 400 larvas musculares, la proporción de establecimiento promedio en todas las líneas fue de alrededor de un 70 % (Tabla 2).

ETAPA INTESTINAL TARDÍA. COMPARACIÓN DEL NÚMERO DE PARÁSITOS ADULTOS EN LAS CINCO LÍNEAS A LOS 15 DÍAS POST-INFECCIÓN

El efecto de la infección con *T. spiralis* sobre el peso corporal de los animales luego de transcurridos 15 días de la infección se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3. Peso corporal de los ratones previo al desafío con el parásito y a los 15 días post-infección, por línea

| | <i>t</i> | <i>s</i> | <i>s'</i> | <i>h</i> | <i>h'</i> |
|------------------------|----------|----------|-----------|----------|-----------|
| <i>P0₁₅</i> | 37,5±1,4 | 27,5±1,7 | 51,9±2,1 | 27,1±1,2 | 55,1±2,2 |
| <i>P15</i> | 35,6±1,1 | 28,1±2,3 | 52,3±2,1 | 27,0±1,5 | 54,6±1,8 |

P0₁₅: peso corporal (g) pre-infección.

P15: peso medio en gramos de los ratones al día 15 post-infección ± error estándar.

Todos los valores corresponden a la media aritmética ± error estándar.

No se observaron diferencias significativas entre los pesos corporales promedio registrados en los dos momentos, por lo que, al igual que lo constatado a los 3 días, la infección por *T. spiralis* no produjo una disminución en el valor de este carácter transcurridos 15 días del desafío ($p > 0,05$).

Al igual que en la fase intestinal temprana, en esta etapa tampoco se rechazó la hipótesis de normalidad de la variable número de parásitos adultos intestinales ni de la proporción de expulsión ($p > 0,05$). En la Tabla 4 se presentan las medias y errores estándar por línea del número de parásitos adultos en intestino a los 15 dpi y la proporción de expulsión para cada línea.

Tabla 4. Número de adultos de *T. spiralis* presentes en intestino (*NA15*) y proporción de expulsión de gusanos adultos a los 15 días post-infección, por línea ratones, con respecto la dosis infectante (*PE*) y adultos establecidos (*PE(NA3)*)

| | <i>t</i> | <i>s</i> | <i>s'</i> | <i>h</i> | <i>h'</i> |
|----------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|
| <i>NA15</i> | 127,0±9,8 ^a | 187,6±5,9 ^c | 170,4±4,7 ^{b,c} | 239,4±5,6 ^d | 154,8± 7,3 ^b |
| <i>PE</i> | 66,4±3,5 ^c | 51,7±4,0 ^{a,b} | 60,4±4,8 ^{b,c} | 40,1±1,4 ^a | 60,2±2,7 ^{b,c} |
| <i>PE(NA3)</i> | 50,7±4,9 ^c | 32,8±5,6 ^{a,b} | 44,9±6,7 ^{b,c} | 18,3±1,9 ^a | 42,7±3,8 ^{b,c} |

NA15: número medio de gusanos adultos al día 15 post-infección.

PE: proporción (%) de expulsión de adultos a los 15 dpi: $[1 - (\text{número adultos recuperados a los 15 dpi} / \text{dosis infectiva})] * 100$.

PE(NA3): proporción (%) de expulsión de adultos a los 15 dpi: $[1 - (\text{número adultos recuperados a los 15 dpi} / \text{número medio de adultos establecidos a los 3 dpi})] * 100$.

Todos los valores corresponden a la media aritmética ± error estándar.

a,b,c: para cada fila, valores con diferente letra difieren al menos al 0,05.

Se presentaron diferencias significativas entre las líneas en el número promedio de adultos ($p < 0,05$). La línea *t* presentó el menor número de gusanos adultos en el intestino al momento de la recuperación de los mismos. En contraste, la línea *h* presentó la mayor cantidad de parásitos a los 15 dpi. El par *s* presentó una carga de adultos intestinales similar, mientras que eso no ocurrió en el par *h* (Tabla 4).

Las variables *PE* y *PE(NA3)* presentan el mismo ordenamiento para las líneas debido a la ausencia de diferencias significativas en el *NA3* entre líneas.

4.1.2. FASE PARENTERAL DE LA INFECCIÓN: ENQUISTAMIENTO

Los pesos corporales de los ratones previo a la infección y a los 60 dpi se presentan en la Tabla 5.

Debido a que los ratones de la línea *h* manifestaron signos de deterioro de su estado general, tales como pérdida de peso, disminución en la actividad, mal aspecto del manto y descargas oculares, se decidió aplicar en estos animales el punto final humanitario entre los 45 y 55 dpi. Los valores presentados de esta línea, en este apartado, corresponden al día en que fueron sacrificados.

Tabla 5. Peso corporal de los ratones previo a la infección y a los 60 días post-infección, por línea

| | <i>t</i> | <i>s</i> | <i>s'</i> | <i>h</i> (*) | <i>h'</i> |
|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>P0₆₀</i> | 36,2±0,9 ^a | 27,6±0,9 ^a | 52,4±2,5 ^a | 28,7±1,7 ^b | 55,6±1,7 ^a |
| <i>P60</i> | 34,3±0,7 ^a | 26,8±1,1 ^a | 51,7±2,5 ^a | 22,4±1,2 ^a | 54,4±0,8 ^a |

P0₆₀: peso corporal (g) pre-infección.

P60: peso corporal (g) al día 60 post-infección.

Todos los valores corresponden a la media aritmética ± error estándar.

a,b: para cada columna, valores con diferente letra difieren al menos al 0,05.

(*) Los valores para la línea *h* corresponden al día en el que se les aplicó el punto final humanitario.

Los pesos corporales presentaron distribución normal ($p > 0,05$). Sólo se observó diferencia significativa entre los pesos promedio pre y post-infección en la línea *h* ($p < 0,05$) que mostró en el momento del sacrificio, una disminución de aproximadamente el 22% del peso inicial, a lo que se sumaron los signos de deterioro mencionados anteriormente. En el resto de las líneas no se observaron diferencias significativas en los pesos ni tampoco se registraron signos atribuibles a la enfermedad parasitaria a los 60 dpi.

El número de larvas por gramo en diafragma y lengua a los 60 dpi y los índices de la capacidad reproductiva relativa se presentan en las Tablas 6 y 7 respectivamente.

El número de larvas en diafragma y lengua presentó distribución normal ($p > 0,05$).

Tabla 6. Carga parasitaria relativa media de larvas musculares en diafragma (*CPr*) e índices de la capacidad reproductiva relativa de *T. spiralis* a los 60 días post-infección, por línea de ratones, con respecto a la dosis infectante (*ICRr*) y adultos establecidos (*ICRr(NA3)*)

| Líneas | <i>CPr</i> | <i>ICRr</i> | <i>ICRr(NA3)</i> |
|--------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>t</i> | 20.715±616 ^a | 51,8±1,5 ^a | 73,8±2,2 ^a |
| <i>s</i> | 25.046±1414 ^b | 62,6±2,2 ^b | 87,2±3,1 ^b |
| <i>s'</i> | 23.905±411 ^{a,b} | 59,8±1,0 ^{a,b} | 83,2±1,4 ^{a,b} |
| <i>h</i> (*) | 31.325±1011 ^c | 78,3±2,5 ^c | 106,8±3,4 ^c |
| <i>h'</i> | 21.074±754 ^a | 52,7±1,9 ^a | 75,7±2,7 ^a |

CPr: número de larvas por gramo.

ICRr = número de larvas musculares recuperadas a los 60 dpi / dosis infectante.

ICRr(NA3) = número medio de larvas musculares recuperadas a los 60 dpi / número medio de adultos establecidos a los 3 dpi.

Todos los valores corresponden a la media aritmética ± error estándar

a,b,c: para cada columna, valores con diferente letra difieren al menos al 0,05.

(*) Los valores para la línea *h* corresponden al día en el que se les aplicó el punto final humanitario.

Tabla 7. Carga parasitaria relativa media de larvas musculares en lengua (*CPr*) e índices de la capacidad reproductiva relativa de *T. spiralis* a los 60 días post-infección, por línea de ratones, con respecto a la dosis infectante (*ICRr*) y adultos establecidos (*ICRr(NA3)*)

| Líneas | <i>CPr</i> | <i>ICRr</i> | <i>ICRr(NA3)</i> |
|--------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>t</i> | 9.249±456 ^a | 32,6±1,6 ^a | 51,8±1,5 ^a |
| <i>s</i> | 12.192±239 ^{b,c} | 43,2±1,1 ^{b,c} | 62,6±2,2 ^{b,c} |
| <i>s'</i> | 10.473±906 ^{a,b} | 34,3±2,9 ^{a,b} | 59,8±1,0 ^{a,b} |
| <i>h</i> (*) | 14.727±886 ^c | 47,7±2,8 ^c | 78,3±2,5 ^c |
| <i>h'</i> | 8.533±296 ^a | 28,9±1,6 ^a | 52,7±1,9 ^a |

CPr: número de larvas por gramo.

ICRr = número de larvas musculares a los 60 dpi / dosis infectante;

ICRr(NA3) = número de larvas musculares a los 60 dpi / número medio de adultos establecidos a los 3 dpi.

Todos los valores corresponden a la media aritmética ± error estándar.

a,b,c: para cada columna, valores con diferente letra difieren al menos al 0,05.

(*) Los valores para la línea *h* corresponden al día en el que se les aplicó el punto final humanitario.

El número promedio de larvas en ambos músculos difirió entre líneas ($p < 0,05$).

Para el caso de las larvas enquistadas en diafragma, las cargas relativas fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) en la línea liviana *h*, y menores en *t* y *h'*, manteniendo esta relación los ICRr, no encontrándose esta diferencia en el par *s*. Las variables *ICRr* y *ICRr(NA3)* presentaron el mismo orden para las líneas porque no hubo diferencias significativas en el *NA3* entre líneas (Tabla 6).

También en el caso de la lengua, las líneas *t* y *h'* fueron las que presentaron menor carga relativa, mientras que en las otras tres la diferencia no fue tan evidente. Al igual que para el diafragma, las variables *ICRr* y *ICRr(NA3)* determinaron el mismo orden para las líneas dada la ausencia de diferencias significativas en el *NA3* entre líneas (Tabla 7).

La proporción de ratones que eliminaron el 50% de los gusanos adultos establecidos al día 15 dpi se observa en la Tabla 8. En la misma se pone en evidencia una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre líneas.

El 80 % de los animales de la línea *t* eliminaron el 50 % de los parásitos para el día 15 dpi. En la línea *h'*, solamente un animal presentó esta característica. En el resto de las líneas ningún animal eliminó el 50% de los parásitos en esta etapa.

Tabla 8. Proporción de ratones que eliminaron el 50 % de los adultos al día 15 post-infección, por línea

| | <i>t</i> | <i>s</i> | <i>s'</i> | <i>h</i> | <i>h'</i> |
|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| <i>PR50</i> (%) | 80% ^b | 0% ^a | 0% ^a | 0% ^a | 20% ^a |

a,b: valores con diferente letra difieren al menos al 0,05.

La razón entre la expulsión y el número de larvas enquistadas en los músculos se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Razón entre el número medio de larvas en diafragma y lengua, y adultos intestinales recuperados al día 15 post-infección, por línea de ratones

| | <i>t</i> | <i>s</i> | <i>s'</i> | <i>h</i> | <i>h'</i> |
|-----------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| <i>RD</i> | 163,1±4,8 ^b | 133,5±4,8 ^a | 140,3±2,4 ^a | 130,8±4,2 ^a | 136,1±4,9 ^a |
| <i>RL</i> | 72,8±3,6 ^b | 65,0±1,3 ^{a,b} | 61,4±5,3 ^{a,b} | 61,5±3,7 ^{a,b} | 55,1±1,9 ^a |

RD: número de larvas por gramo de diafragma / número de adultos intestinales recuperados a los 15 dpi.

RL: número de larvas por gramo de lengua / número de adultos intestinales recuperados a los 15 dpi.

Todos los valores corresponden a la media aritmética ± error estándar.

a,b: para cada fila, valores con diferente letra difieren al menos al 0,05.

De todas las líneas, *h* fue la que presentó la mayor carga parasitaria en el diafragma. En contraste, la línea *t* presentó el menor valor. Sin embargo, al relativizar dicha carga al número de adultos encontrados al día 15 dpi, la relación se invirtió de manera tal que el número de larvas enquistadas en diafragma por cada adulto presente en el intestino fue mayor en *t* que en *h*.

A pesar de que el 80 % de los ratones de la línea *t* expulsaron más del 50% de los gusanos adultos al día 15 post-infección, situación que no se produjo en las otras líneas, su carga de larvas musculares en relación a dicha expulsión fue mayor (Tabla 5).

4.2. EFECTO DE LA INFECCIÓN CON *Trichinella spiralis* EN LA COMPOSICIÓN SANGUÍNEA DE LAS LÍNEAS DERIVADAS DE LA CEPA CF1

DETERMINACIÓN DE LA FÓRMULA LEUCOCITARIA RELATIVA Y HEMATOCRITO

Los valores relativos de los porcentajes de eosinófilos, linfocitos y hematocrito por línea y por tiempo de infección se presentan en las Tablas 10, 11 y 12 y en las Figuras 18, 19 y 20 respectivamente.

Tabla 10. Variación del porcentaje de eosinófilos periféricos por línea y tiempo de infección

| Líneas | E0 | E3 | E15 | E30 | E45 | E60 |
|--------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| <i>t</i> | 4 ^a (2-5) | 2 ^a (0-2) | 2 ^a (0-6) | 7 ^b (5-10) | 7 ^b (4-10) | 4 ^b (4-9) |
| <i>s</i> | 2 ^a (0-3) | 1 ^a (0-3) | 4 ^a (1-8) | 1 ^a (0-5) | 2 ^a (0-8) | 1 ^a (0-4) |
| <i>s'</i> | 1 ^a (0-4) | 0 ^a (0-2) | 6 ^a (2-8) | 4 ^{a,b} (1-6) | 6 ^b (4-8) | 4 ^{a,b} (2-6) |
| <i>h</i> (*) | 3 ^a (0-5) | 2 ^a (0-4) | 7 ^a (3-16) | 11 ^b (8-13) | 8 ^b (7-10) | - |
| <i>h'</i> | 5 ^a (1-9) | 1 ^a (0-3) | 6 ^a (5-9) | 2 ^a (1-2) | 4 ^{a,b} (0-11) | 2 ^a (0-6) |

E: mediana (mínimo-máximo) del porcentaje de eosinófilos periféricos, por tiempo.

0: pre infección; 3, 15, 30, 45 y 60: dpi.

a,b: para cada columna, valores con diferente letra difieren al menos al 0,05.

(*) No se contó con los valores de eosinófilos para el día 60 debido a que se les aplicó el punto final humanitario antes de alcanzar ese momento.

No se observaron diferencias significativas en los valores medianos del porcentaje de eosinófilos en los tiempos 0, 3 y 15 entre las cinco líneas, pero sí entre las líneas para los días 30, 45 y 60 post-infección ($p < 0,05$). Al día 30 dpi las líneas *t* y *h* presentaron los mayores valores, mientras que los menores valores correspondieron a las líneas *s* y *h'* con un comportamiento intermedio de *s'*. A los 45 dpi, *t* y *h* mantuvieron un comportamiento similar al de los 30 días, incluyendo en este caso también a la línea *s'*, que presentó su valor más elevado en este momento. La línea *s* presentó el menor valor y *h'* valores intermedios. En la última etapa, la línea *t* se mantuvo con el valor más elevado, como en los dos momentos previos, mientras que *s* y *h'* presentaron los menores valores y *s'* tuvo un comportamiento intermedio.

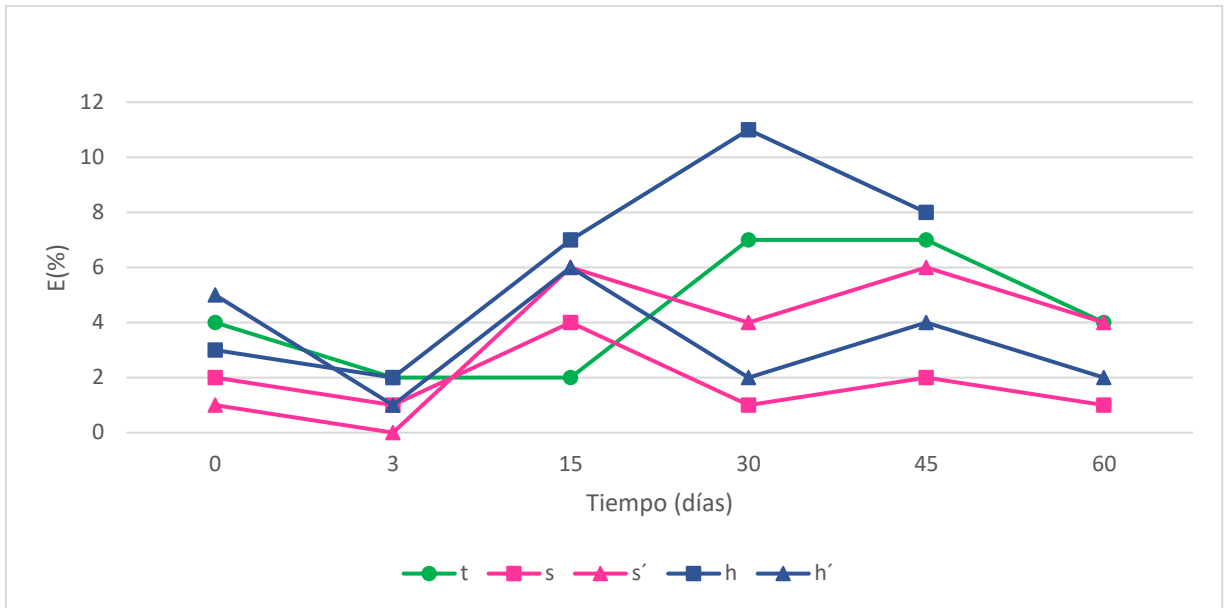


Figura 18. Variación del porcentaje de eosinófilos periféricos por línea a lo largo del tiempo

Los porcentajes medianos de eosinófilos circulantes de cada línea a lo largo de los diferentes tiempos, difirieron significativamente ($p < 0,05$). Las líneas *t*, *s'*, *h* y *h'* disminuyeron en forma significativa los valores de esta variable al día 3 post-infección, siendo estos los menores valores de todo el estudio. De la misma manera, las líneas *s'* y *h'* alcanzaron su pico máximo al día 15 post-infección mientras que *t* y *h* lo hicieron al día 30. La línea *s* no mostró diferencias significativas a lo largo del tiempo en el período estudiado ($p > 0,05$).

La línea liviana *h* mostró los mayores valores porcentajes de eosinófilos circulantes en coincidencia con la mayor carga muscular relativa de larvas enquistadas y con la decisión de optar por el punto final humanitario de los individuos.

En la Tabla 11 se observa que los animales de la línea *s'* presentaron, en general, el menor valor de la variable en comparación con el resto de las líneas, si bien las diferencias no fueron en todos los casos estadísticamente significativas. Los porcentajes de linfocitos post-infección observados en todas las líneas para cada tiempo de infección son similares, a excepción del día 45, momento en el que línea *h* mostró el menor valor. Los valores informados en esta línea fueron registrados previo a la eutanasia de los individuos.

Tabla 11. Variación del porcentaje de linfocitos periféricos por línea y tiempo de infección

| Líneas | L0 | L3 | L15 | L30 | L45 | L60 |
|--------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| <i>t</i> | 70 ^{a,b} (35-78) | 59 ^a (50-67) | 43 ^a (29-67) | 46 ^a (35-71) | 47 ^b (20-67) | 48 ^a (43-54) |
| <i>s</i> | 61 ^{a,b} (40-74) | 64 ^a (57-72) | 48 ^a (33-59) | 52 ^a (39-55) | 38 ^b (28-43) | 42 ^a (24-47) |
| <i>s'</i> | 57 ^a (36-75) | 56 ^a (54-59) | 49 ^a (31-54) | 50 ^a (30-58) | 30 ^{a,b} (21-32) | 39 ^a (36-43) |
| <i>h</i> (*) | 69 ^{a,b} (37-81) | 62 ^a (54-65) | 52 ^a (29-66) | 34 ^a (31-45) | 18 ^a (12-23) | - |
| <i>h'</i> | 69 ^b (54-81) | 64 ^a (50-67) | 53 ^a (43-60) | 53 ^a (40-56) | 39 ^b (32-44) | 46 ^a (39-54) |

L: mediana (mínimo-máximo) del porcentaje de linfocitos periféricos, por tiempo.

0: pre infección; 3, 15, 30, 45 y 60: dpi.

a,b: para cada columna, valores con diferente letra difieren al menos al 0,05.

(*) No se cuenta con los valores de eosinófilos para el día 60 debido a que se les aplicó el punto final humanitario antes de alcanzar ese día.

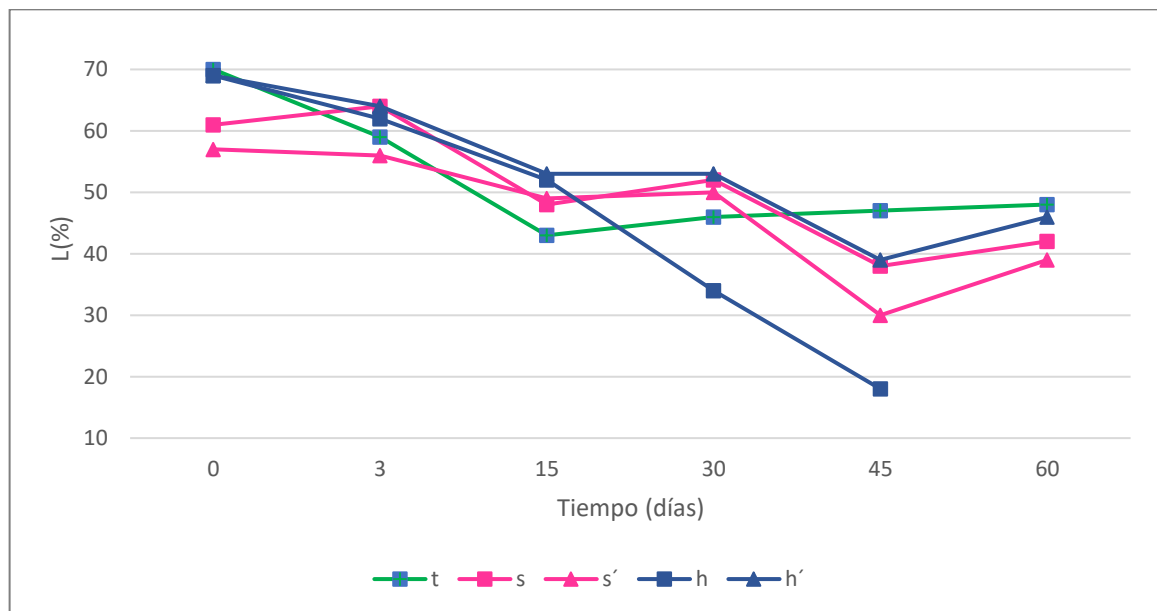


Figura 19. Variación del porcentaje de linfocitos periféricos por línea a lo largo del tiempo

La línea *t* presentó su máximo valor de linfocitos previo a la infección y el valor mínimo a los 15 días, sin diferencias significativas en el resto de los períodos ($p > 0,05$).

Las líneas *s'*, *h* y *h'* mostraron el menor valor al día 45, mientras que la línea *s* no mostró diferencias significativas entre los días 0 y 3 y entre los días 15, 30, 45 y 60 respectivamente (Figura 19).

Si bien las líneas *t*, *s*, *s'* y *h'*, no presentaron diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos periféricos entre ellas al día 60 post-infección, no alcanzaron a recuperar los valores observados previo al desafío con el parásito.

Los valores del hematocrito presentaron distribución normal ($p > 0,05$). La Tabla 12 resume los valores de esta variable por línea y por tiempo de infección.

Tabla 12. Variación del hematocrito entre líneas, por tiempo de infección

| Líneas | HTO.0 | HTO.3 | HTO.15 | HTO.60 |
|--------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>t</i> | 47,6±1,6 ^a | 44,3±2,0 ^{a,b} | 28,0 ± 3,5 ^a | 47,0±2,5 ^a |
| <i>s</i> | 50,2±2,0 ^a | 47,94± 4,9 ^b | 43,6±1,7 ^b | 50,7 ± 2,7 ^a |
| <i>s'</i> | 50,8±3,2 ^a | 43,6±0,7 ^{a,b} | 41,6±0,4 ^{a,b} | 51,6±2,9 ^a |
| <i>h</i> (*) | 45,9±2,0 ^a | 41,1±0,9 ^a | 35,9±4,4 ^{a,b} | - |
| <i>h'</i> | 48,1± 1,5 ^a | 46,46±1,5 ^{a,b} | 34,6±3,5 ^{a,b} | 49,2± 1,2 ^a |

HTO: media del hematocrito ± error estándar, por tiempo.

0: pre infección; 3, 15 y 60: dpi.

Todos los valores corresponden a la media aritmética ± error estándar.

a,b: para cada columna, valores con diferente letra difieren al menos al 0,05.

(*) No se cuenta con los valores del hematocrito para el día 60 por las razones explicadas anteriormente.

Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las líneas en el valor del hematocrito en los tiempos 3 y 15 de infección. La línea *t* presentó el menor valor y la línea liviana *s* el mayor valor a los 15 dpi.

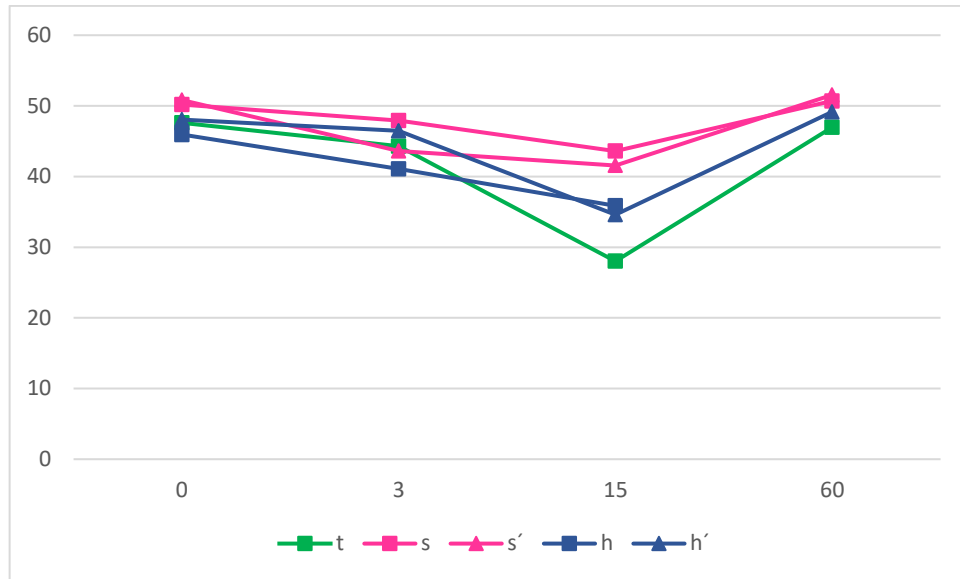


Figura 20. Variación del hematocrito por línea a lo largo del tiempo

Con respecto a los valores medios del hematocrito a lo largo del tiempo, se observó que al día 15 post-infección, los ratones infectados de todas las líneas mostraron una disminución significativa con respecto a los animales sin infectar ($p < 0,05$) (Figura 20).

4.3. EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA DEL INTESTINO

En la evaluación histopatológica cualitativa, los intestinos de los ratones mostraron la estructura clásica de este órgano de los mamíferos compuesta por mucosa, submucosa, capas musculares y un revestimiento seroso (Figura 21). La mucosa, conformada por epitelio de revestimiento, lámina propia y muscular de la mucosa, se encuentra dispuesta proyectándose hacia la luz en forma de vellosidades. Entre cada vellosidad se encuentran las criptas o glándulas de Lieberkühn.



Figura 21. Microfotografía de la arquitectura histológica normal del intestino delgado de los ratones. Barra: 100 μ m.

Tabla 13. Evaluación histopatológica de los intestinos por línea, control y tiempo de infección

| | Atrofia/Fusión Vellosidades | | | | Infiltrado inflamatorio | | | | Glándulas | | | |
|-----------|-----------------------------|----|----|---|-------------------------|---------------|-----|---|-----------|----|----|---|
| | 3 | 15 | 60 | C | 3 | 15 | 60 | C | 3 | 15 | 60 | C |
| <i>t</i> | + | + | - | - | ++ (LP) | +(mixto) | 0/+ | - | R | R | N | N |
| <i>s</i> | - | + | - | - | ++ (LP/E) | + | + | - | R | N | N | N |
| <i>s'</i> | ++ | ++ | - | - | ++ | ++ (mixto) | - | - | R | H | R | N |
| <i>h*</i> | + | + | - | - | +++ | ++ (mixto) | ++ | - | R | H | H | N |
| <i>h'</i> | + | - | - | - | ++ (LP/E) | +(LP) | + | - | N | R | N | N |

- Atrofia/Fusión de vellosidades: - no evidente; + leve; ++ moderada
 - Infiltrado inflamatorio: + discreto, ++ leve; +++ moderado. LP: linfoplasmocítico; mixto: predominantemente linfoplasmocítico con polimorfonucleares neutrófilos; LP/E: predominantemente linfoplasmocítico con eosinófilos.
 - 3,15 y 60: tiempos de infección. C: control
 - Glándulas: N: normales; R: reactivas; H: hiperplásicas.
- * la evaluación de la línea *h* a los 60 días corresponde al día en que fueron en el que se les aplicó el punto final humanitario.

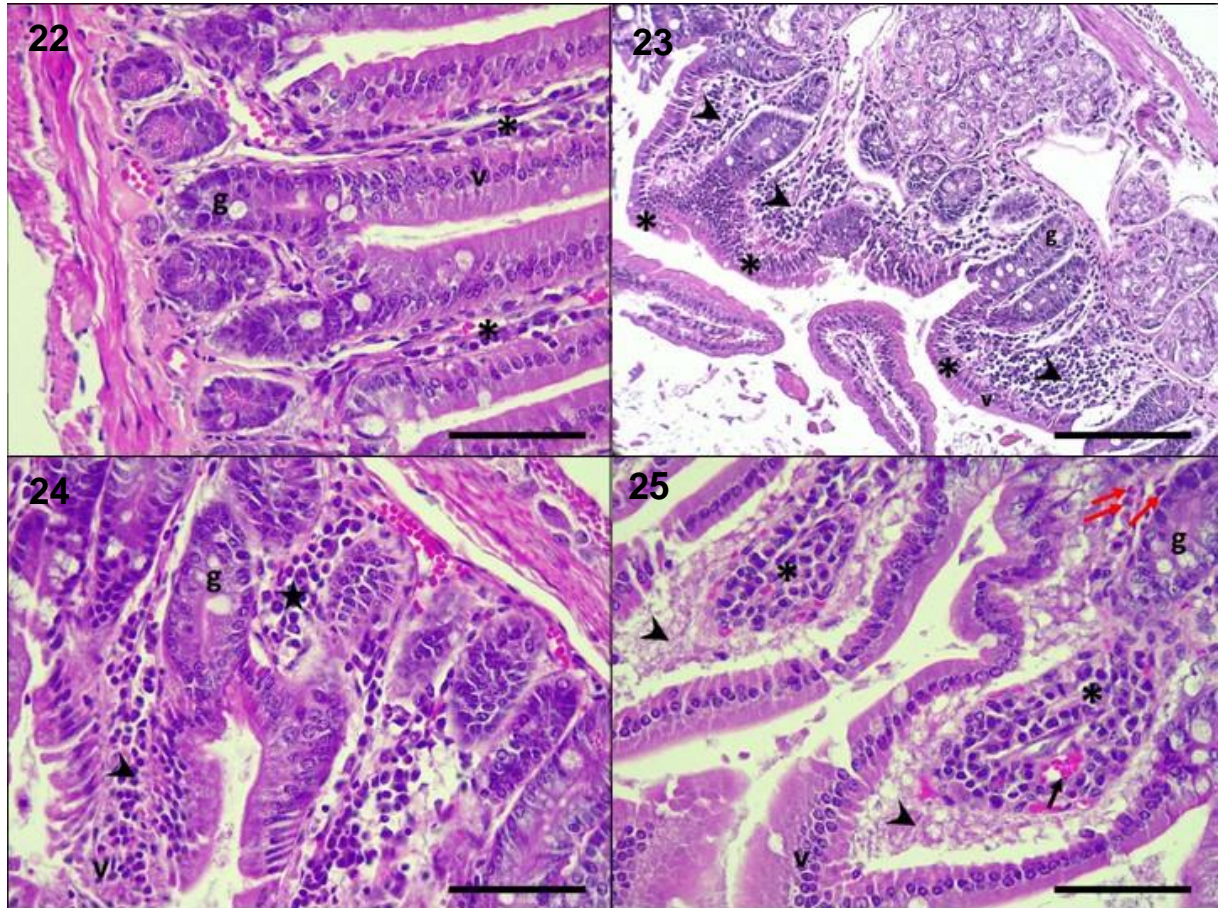
La evaluación mostró alteraciones similares en las líneas *t*, *s* y *h'* a lo largo de los diferentes momentos de infección. A los 3 dpi se observaron áreas con leve atrofia

y fusión de vellosidades, caracterizadas por un leve acortamiento de la longitud y aumento del ancho de las mismas. En la lámina propia de las vellosidades y en el espacio interglandular se observó un leve infiltrado inflamatorio difuso, compuesto principalmente por linfocitos y células plasmáticas, constituido en la mayoría de las regiones por 2 a 4 filas de células inflamatorias. En algunos casos se observaron pequeños agregados de eosinófilos multifocales. Las glándulas de Lieberkühn se advirtieron reactivas con abundantes figuras mitóticas. A los 15 dpi, los ratones mostraron ocasionalmente leve atrofia y fusión de vellosidades, discreto infiltrado inflamatorio (0 a 1 filas de células) (Figura 22) predominantemente linfoplasmocítico con esporádicos polimorfonucleares (neutrófilos/eosinófilos) diseminados. Las glándulas se encontraron ligeramente alargadas y reactivas. A los 60 dpi se observó un leve infiltrado inflamatorio linfoplasmocítico, con menor densidad de células inflamatorias respecto a los 3 y 15 dpi. En este momento no se observaron alteraciones microscópicas evidentes en la longitud y forma de las vellosidades.

La línea *s* mostró un mayor grado de severidad de las lesiones respecto a las líneas anteriormente descritas. A los 3 y 15 dpi se observaron áreas con moderada atrofia y fusión de vellosidades (mayor que en las líneas *t*, *s* y *h*) (Figura 23). Las glándulas se encontraron reactivas. A los 3 dpi se observó en la lámina propia un leve infiltrado inflamatorio linfoplasmocítico en vellosidades e interglandular (Figura 24). A los 15 dpi, junto con el infiltrado linfoplasmocítico, se observaron esporádicos polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) diseminados. A los 60 dpi, los ratones presentaron un mínimo infiltrado inflamatorio linfoplasmocítico, sin alteraciones microscópicas evidentes de forma y/o tamaño de las vellosidades y glándulas.

Los mayores cambios histopatológicos se observaron en la línea *h*. A los 3 dpi las vellosidades presentaron una leve atrofia y las glándulas estaban reactivas. En la lámina propia había un moderado infiltrado inflamatorio linfoplasmocítico en vellosidades (constituido en la mayoría de las regiones por 5 a 10 filas de células inflamatorias) con escasos eosinófilos. A los 15 dpi y al momento del punto final humanitario se observó descamación de células epiteliales de revestimiento de las vellosidades, las glándulas estaban reactivas y levemente hiperplásicas, ligeramente alargadas e irregulares. En la lámina propia se evidenció congestión y edema

intersticial, y un moderado infiltrado inflamatorio mixto, predominantemente linfoplasmocítico, pero con elevada densidad de PMNs y eosinófilos (Figura 25).



Figuras 22 a 25. Microfotografías de la mucosa intestinal de los ratones infectados. g: glándula, v: vellosidad. Figura 22. Discreto infiltrado inflamatorio en la lámina propia de las vellosidades (*). Barra: 50 μ m. Figura 23. Moderada atrofia y fusión de las vellosidades (*). Moderado infiltrado inflamatorio (punta de flecha). Barra: 100 μ m. Figura 24. Leve infiltrado inflamatorio en las vellosidades (punta de flecha) e interglandular (estrella). Barra: 50 μ m. Figura 25. Moderado infiltrado inflamatorio mixto predominantemente linfoplasmocítico (*) con PMNs (flechas rojas), congestión (flecha) y edema intersticial (punta de flecha). Barra: 50 μ m.

En todos los ratones evaluados, la densidad de células mucosas o de Goblet fue moderada. No se observaron cambios significativos evidentes en la densidad relativa de éstas entre las líneas de ratones, tanto para los grupos de las seleccionadas como para el grupo control.

En las líneas seleccionadas de ratones en cada tiempo de muestreo, la densidad de células inflamatorias fue mayor en las vellosidades que en la región

interglandular. En los ratones controles no se observaron alteraciones microscópicas significativas en las secciones de intestinos evaluadas.

Las lesiones observadas en los ratones infectados de las líneas evaluadas corresponden a una enteritis superficial catarral con grados variables de infiltrado inflamatorio intersticial (de mínimo a moderado) predominantemente linfoplasmocítico. En la línea *h* se observaron cambios vasculares más evidentes y un proceso inflamatorio más activo que en el resto de las líneas.

Los resultados de la morfometría de las vellosidades y de las glándulas se muestran en la Tabla 14.

A los 3 días del desafío con el parásito las líneas *s* y *h'* presentaron la menor longitud de glándulas mientras que la *t* y *s'* presentaron el mayor valor. En cambio, con respecto a las vellosidades, las líneas *s'* y *h* presentaron las vellosidades más cortas mientras que en el resto de las líneas las vellosidades fueron las más largas. En cuanto a la longitud de las vellosidades a nivel del ápice, la línea *s* y el par *h* tuvieron los menores valores y la línea *s'* el más mayor. Las vellosidades a nivel del centro fueron de menor tamaño en la línea *s* y más grandes en *t* y *h*. No hubo diferencias significativas en las longitudes de las bases de las vellosidades de todas las líneas.

A los 15 días post-infección las glándulas de menor longitud las presentó la línea *s*, mientras que fueron las más largas en *s'* y *h*. El par *s* y la línea *h* presentaron las vellosidades más cortas mientras que las dos líneas restantes las más largas. El ápice de las vellosidades de la línea testigo y del par *h* fue el menor en longitud, mientras que el de *s'* fue el mayor. A nivel del centro, las vellosidades fueron más anchas en el par *s* y en la línea liviana *h*, mientras que, en la base se presentaron más angostas en *h'* y más anchas en *s'*.

Pasados los 60 días desde la infección, la única línea que presentó diferencias significativas en la longitud de sus glándulas con respecto a las demás, fue *s'*. En cuanto a las vellosidades, las líneas livianas no se diferenciaron entre sí, presentando la menor longitud, mientras que *h'* presentó la mayor. No se presentaron diferencias

significativas en las medidas de las vellosidades en su base, centro y ápice para todas las líneas.

En los animales controles las longitudes de las glándulas no mostraron diferencias entre las líneas livianas, presentando estas los menores valores, ni tampoco entre la línea testigo y la *s'*. A su vez, tampoco se presentaron diferencias en las líneas *s* y *h* para la longitud de sus vellosidades, siendo estas las más cortas. El mayor tamaño de vellosidades lo presentaron las líneas pesadas junto con la línea *t*. En cuanto al ápice, no hubo diferencias, salvo en la línea *h* que presentó el ápice más angosto. En relación al centro y base de las vellosidades, no hubo diferencias significativas en todas las líneas.

Al analizar las relaciones de la longitud de las vellosidades y de las glándulas con los respectivos controles de cada línea se evidenciaron diferencias significativas entre las líneas ($p < 0,05$) (Tabla 15). Los mayores cambios se manifestaron a los 15 dpi. Las líneas *s'* y *h* fueron las que mayor reacción mostraron a nivel de las glándulas, con un crecimiento que casi duplicó de la longitud en relación a los animales controles (1,90 y 1,91 respectivamente). La longitud de las vellosidades disminuyó marcadamente en la línea *s'* (0,6) difiriendo significativamente de las demás líneas. El espesor de las vellosidades, variable que refleja la fusión de las mismas, aumentó significativamente en las líneas *s'* y *h*. Las líneas *s* y *h'* fueron las que menor variación tuvieron con respecto a sus controles, mostrando una reacción inflamatoria menos marcada. En general, los valores obtenidos del análisis coinciden con lo observado en la valoración histopatológica y descritos en la Tabla 13.

Tabla 14. Longitudes de las vellosidades y glándulas del duodeno por línea, control y tiempo de infección

| | | <i>t</i> | <i>s</i> | <i>s'</i> | <i>h</i> | <i>h'</i> |
|----|----|---------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 3 | G | 192,9±6,8 ^b | 161,0±5,2 ^a | 195,6±7,9 ^b | 172,4±8,9 ^{a,b} | 155,0±9,5 ^a |
| | V | 460,6±14,6 ^b | 466,2±12,2 ^b | 313,1±24,6 ^a | 363,0±15,3 ^a | 503,3± 5,9 ^b |
| | A | 28,8±2,5 ^{a,b} | 21,4±2,6 ^a | 35,5±3,4 ^b | 25,6±2,1 ^a | 27,4±2,4 ^{3a} |
| | Ce | 63,9±3,9 ^b | 41,6±3,6 ^a | 55,1±2,8 ^{a,b} | 62,6±3,0 ^b | 54,0±7,5 ^{a,b} |
| | B | 71,7±7,3 ^a | 57,6±3,6 ^a | 72,8±5,6 ^a | 68,5±3,9 ^a | 75,0±7,6 ^a |
| 15 | G | 228,7±11,3 ^{b,c} | 160,2±8,8 ^a | 290,4±11,9 ^c | 251,9±7,5 ^c | 182,1±10,6 ^{a,b} |
| | V | 455,4±21,6 ^b | 358,2±16,4 ^a | 349,9±25,2 ^a | 360,2±14,0 ^a | 554,0±16,9 ^b |
| | A | 27,6±6,1 ^a | 35,4±2,9 ^{a,b} | 46,0±2,5 ^b | 31,4±3,4 ^a | 24,6±5,0 ^a |
| | Ce | 65,5±6,1 ^{a,b} | 72,2±2,3 ^b | 76,3±5,9 ^b | 81,2±4,4 ^b | 48,8±4,9 ^a |
| | B | 77,8±5,0 ^{a,b} | 89,1±4,0 ^{b,c} | 99,6±4,1 ^c | 89,4±7,2 ^{b,c} | 66,2±4,2 ^a |
| 60 | G | 148,4±6,8 ^a | 142,9±9,2 ^a | 180,6±6,8 ^b | 146,2±6,3 ^a | 143,8±7,0 ^a |
| | V | 535,7±30,7 ^{a,b} | 469,6±18,4 ^a | 515,3±28,2 ^{a,b} | 461,7±21,2 ^a | 568,6±20,2 ^b |
| | A | 22,9±2,9 ^a | 23,3±1,7 ^a | 26,8±4,5 ^a | 20,0±2,1 ^a | 23,2±2,1 ^a |
| | Ce | 42,4±5,1 ^a | 42,9±2,5 ^a | 42,0±7,4 ^a | 48,2±3,3 ^a | 52,8±6,7 ^a |
| | B | 58,1±14,4 ^a | 53,0±3,3 ^a | 59,3±3,2 ^a | 57,2±6,3 ^a | 67,1±7,3 ^a |
| C | G | 154,1±6,6 ^{3b} | 144,9±6,4 ^a | 153,2±9,7 ^b | 131,6±6,9 ^a | 147,8±5,7 ^{a,b} |
| | V | 556,0±11,7 ^b | 442,5±35,7 ^a | 581,5±18,9 ^b | 432,2±24,6 ^a | 576,2±21,3 ^b |
| | A | 21,3±0,9 ^b | 22,3±2,3 ^b | 23,7±2,7 ^b | 17,3±1,6 ^a | 21,3±1,3 ^b |
| | Ce | 47,8±4,7 ^a | 47,0±4,8 ^a | 36,3±3,9 ^a | 45,1±2,7 ^a | 40,0±2,8 ^a |
| | B | 59,3±8,8 ^a | 62,1±4,5 ^a | 45,5±4,5 ^a | 48,6 ±3,1 ^a | 52,9±4,0 ^a |

3,15 y 60 días post-infección; C: controles; G: longitud en μm de las glándulas; V: longitud en μm de las vellosidades; A: longitud en μm de la vellosidad a nivel del ápice; Ce: longitud en μm de la vellosidad a nivel del centro; B: longitud en μm de la vellosidad a nivel de la base.

Todos los valores corresponden a la media aritmética \pm error estándar.

a,b,c. Valores con diferente letra difieren al menos al 0,05 para las comparaciones dentro de fila.

Tabla 15. Longitudes de las vellosidades y glándulas, relativas al promedio de los controles, por línea y tiempo de infección

| | 3 días | | | | | 15 días | | | | | 60 días | | | | |
|--------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | <i>RLG</i> | <i>RLV</i> | <i>RLA</i> | <i>RLCe</i> | <i>RLB</i> | <i>RLG</i> | <i>RLV</i> | <i>RLA</i> | <i>RLCe</i> | <i>RLB</i> | <i>RLG</i> | <i>RLV</i> | <i>RLA</i> | <i>RLCe</i> | <i>RLB</i> |
| <i>t</i> | 1,25 ^{ab} | 0,83 ^b | 1,35 ^{ab} | 1,34 ^b | 1,51 ^a | 1,48 ^b | 0,82 ^{bc} | 1,29 ^{ab} | 1,37 ^{ab} | 1,31 ^a | 0,96 ^b | 0,96 ^a | 1,07 ^a | 0,89 ^a | 0,98 ^a |
| <i>s</i> | 1,11 ^{ab} | 1,05 ^c | 0,96 ^a | 0,88 ^a | 0,93 ^a | 1,11 ^a | 0,81 ^b | 1,58 ^{ab} | 1,54 ^{ab} | 1,43 ^a | 0,99 ^a | 1,06 ^a | 1,04 ^a | 0,91 ^a | 0,85 ^a |
| <i>s'</i> | 1,28 ^b | 0,54 ^a | 1,50 ^b | 1,52 ^b | 1,60 ^a | 1,90 ^c | 0,60 ^a | 1,94 ^b | 2,10 ^c | 2,19 ^b | 1,18 ^b | 0,89 ^a | 1,13 ^a | 1,16 ^a | 1,30 ^a |
| <i>h</i> (*) | 1,31 ^b | 0,84 ^b | 1,48 ^b | 1,39 ^b | 1,41 ^a | 1,91 ^c | 0,83 ^{bc} | 1,81 ^{ab} | 1,80 ^{bc} | 1,84 ^b | 1,11 ^{ab} | 1,07 ^a | 1,14 ^a | 1,07 ^a | 1,18 ^a |
| <i>h'</i> | 1,05 ^a | 0,87 ^b | 1,29 ^{ab} | 1,35 ^b | 1,42 ^a | 1,23 ^{ab} | 0,96 ^c | 1,16 ^a | 1,22 ^a | 1,25 ^a | 0,97 ^a | 0,99 ^a | 1,09 ^a | 1,32 ^a | 1,27 ^a |

RLG: longitud media de la glándula de los ratones infectados / longitud media de la glándula de los controles; *RLV*: longitud media de la vellosidad de los ratones infectados / longitud media de la vellosidad de los controles; *RLA*: longitud media de la vellosidad de los ratones infectados / la longitud media de la vellosidad a nivel del ápice de los controles; *RLCe*: longitud media de la vellosidad de los ratones infectados a nivel del centro / longitud media de la vellosidad a nivel del centro de los controles; *RLB*: longitud media de la vellosidad de los ratones infectados a nivel de la base / longitud media de la vellosidad a nivel de la base de los controles

a,b,c: para cada columna, valores con diferente letra difieren al menos al 0,05.

(*) Los valores para la línea h corresponden al día en el que se les aplicó el punto final humanitario.

4.4. ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DE *Trichinella spiralis* EN C57BL/6 LUEGO DE UN PASAJE POR LAS LÍNEAS SELECCIONADAS

El número de larvas musculares encontradas en diafragma en ratones C57BL/6 infectados con larvas provenientes de las cinco líneas difirieron según la procedencia de las larvas infectantes (Tabla 16).

Tabla 16. Carga parasitaria relativa media de larvas en diafragma de ratones C57BL/6 (CPrDC57) infectados con larvas provenientes de cinco líneas distintas y el control infectado con larvas provenientes de C57BL/6

| <i>L</i> | <i>CPrDC57</i> | <i>ICRrC57</i> |
|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| <i>t</i> | 10.458,6±455,3 ^{b,c} | 34,9±1,5 ^{b,c} |
| <i>s</i> | 5.849,9±225,8 ^a | 19,5±0,7 ^a |
| <i>s'</i> | 12.228,1±589,6 ^{c,d} | 40,8±1,9 ^{c,d} |
| <i>h</i> | 10.477,6±319,4 ^{b,c} | 34,9±1,1 ^{b,c} |
| <i>h'</i> | 14.075,4±501,2 ^d | 46,9±1,7 ^d |
| <i>C57BL/6</i> (Control) | 10.044,7±403,9 ^b | 33,5±1,3 ^b |

L: líneas de donde se extrajeron larvas musculares para realizar la infección.

CPrDC57: número de larvas por gramo de diafragma de ratones C57BL/6 a los 30 dpi.

ICRrC57: número de larvas musculares a los 30 dpi / dosis infectante.

Todos los valores corresponden a la media aritmética ± error estándar.

a,b,c,d: para cada columna, valores con diferente letra difieren al menos al 0,05.

Al analizar la infección en los ratones C57BL/6 producida por larvas provenientes de la línea testigo y de las seleccionadas por peso, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en las cargas de larvas musculares en el diafragma. Los ratones infectados con larvas provenientes de las líneas *t* y *h* no mostraron diferencias significativas en la carga muscular relativa con los ratones control. El *ICRrC57* de los animales *h'* fue el mayor del estudio. Los ratones infectados con larvas provenientes de la línea *s*, presentaron una marcada disminución del número de larvas musculares encontradas en el diafragma con respecto a las demás líneas y los controles.

4. DISCUSIÓN

La intensidad de la infección muscular por *T. spiralis* es multicausal y está determinada por la relación parásito–hospedador. El proceso que caracteriza a esta interacción puede ser dividido en dos etapas: la fase intestinal, que incluye el tiempo de permanencia y fecundidad de los gusanos hembra en el intestino; y la etapa sistémica comprendida por la migración de las larvas recién nacidas hacia los músculos esqueléticos y la sobrevivencia larval en dichos órganos. Diferentes estudios (Vallance y col., 2000; Fabre y col., 2009) han demostrado que estas etapas se encuentran influenciadas directamente por el genotipo del hospedador, siendo regidas por diferentes mecanismos inmunitarios.

El modelo murino permite por su corto intervalo generacional, fácil mantenimiento y alto potencial biótico (Hinrichsen y Di Masso, 2010) estudiar exhaustivamente a la infección por *T. spiralis* y a los variados componentes que interactúan para producir el resultado de la relación parásito-hospedador. Las líneas de ratones endocriadas, entre otros enfoques, han sido herramientas valiosas para determinar los efectos de los genes del hospedador en situaciones complejas, como enfermedades infecciosas (Peters y col., 2007). Las diferencias genéticas exhibidas entre líneas de ratones controlarían o al menos contribuirían a evidenciar un amplio rango de procesos que influyen el desarrollo de una enfermedad parasitaria (Longley y col., 2011).

Para analizar los componentes de la respuesta en la interacción con el hospedador ante una infección por *Trichinella*, se deben realizar estudios basados en primera instancia en la determinación de la o las dosis infectivas a utilizar. En este trabajo se utilizó una única dosis infectiva de 400 larvas musculares. Este valor fue elegido por encontrarse dentro del rango de dosis que se ha demostrado constituye la base experimental para diferenciar los fenotipos de ratones de acuerdo a su capacidad de rechazo del nematodo *T. spiralis* (Bell y Liu, 1988). En tal sentido, Bell y Liu (1988) definieron las dosis infectivas según el comportamiento de los hospedadores como: 1) dosis baja, cualquier dosis por debajo del tiempo de rechazo más rápido (de 50 a 100 larvas musculares); 2) dosis intermedia, entre 50 larvas musculares hasta el número que produce la primera muerte y 3) dosis alta, cualquier dosis dentro del rango

letal. Estos parámetros son dependientes de la línea utilizada y no pueden ser especificados sino empíricamente. De acuerdo a esta clasificación, la dosis de 400 larvas utilizada en las líneas *t*, *s*, *s'* y *h'* podría categorizarse como una dosis intermedia, mientras que, tomando en consideración lo ocurrido con la línea *h*, la dosis suministrada en este caso podría considerarse alta, dadas las alteraciones del estado sanitario que manifestaron los individuos, es decir, dosis dentro del rango letal.

Una vez suministrada la dosis infectiva, dentro del sistema digestivo, no todas las larvas musculares logran establecerse en el intestino de los ratones. Bell y Liu (1988) utilizaron el conteo de gusanos al día 3 post-infección como punto de partida de sus estudios, considerándolos como los efectivamente establecidos de la dosis total administrada y, por ende, los responsables de la infección en el hospedador. Cuando la medición a los 3 días no fue factible, utilizaron la tasa de establecimiento del 65% de la dosis administrada. En las líneas de ratones derivadas de la cepa CF1 seleccionadas por peso y en la línea testigo los valores de establecimientos se ubicaron alrededor del 70 % en concordancia con lo mencionado en la bibliografía. La ausencia de diferencias significativas en el establecimiento de los parásitos a los 3 días post-infección en las diferentes líneas de ratones incluidas en este estudio, demuestra la homogeneidad en el comportamiento en la etapa de instalación, e indica ausencia de efecto del genotipo de las líneas en la respuesta al desafío con el parásito.

A su vez, la homogeneidad en los resultados del establecimiento de los nematodos confirma que la técnica utilizada para inocular a los animales permitió administrar la misma dosis infectiva en cada una de las líneas, asegurando consistencia de las comparaciones realizadas a partir de esta etapa.

La ausencia de diferencias significativas en el número de gusanos adultos a los 3 días post-infección, limita la trascendencia de su medición en este estudio, pero de encontrarse diferencias, por ejemplo, a otras dosis, es un valor más importante para relativizar el resto de los índices a este valor ya que elimina de la consideración aquellos individuos que no pudieron establecerse en la mucosa intestinal y, por ende, no formaron parte del proceso infeccioso.

Dlugosz y col. (2013) estudiaron la presentación de la enfermedad en líneas de ratones HR y C. Las primeras fueron seleccionadas por su instinto de utilizar la rueda

de ejercicio, mientras que las segundas no fueron seleccionadas para dicho carácter. En este caso, todos los animales fueron infectados con 300 larvas musculares. Debido a que las líneas HR eran, en promedio, más pequeñas que los ratones C, y recibieron mayor cantidad de larvas por gramo de peso corporal, se esperaba que la carga de larvas enquistadas en los músculos fuera mayor en ellas. Contrariamente a esta predicción, el resultado de la infección no mostró diferencias estadísticamente significativas en las cargas parasitarias encontradas en el diafragma en las líneas seleccionadas y no seleccionadas. Algo similar a esto ocurrió en nuestro estudio, en donde la línea liviana *s* recibió mayor cantidad de larvas infectivas por gramo de peso corporal que la línea pesada *s'*, no observándose diferencias significativas en relación a la carga parasitaria encontrada en el diafragma en dicho par. Contrariamente a esto, las diferencias significativas encontradas entre las líneas *h* y *h'*, en las cargas parasitarias musculares reafirman la idea de que, si bien el criterio de selección por peso en cada par fue el mismo, las líneas presentaron distintas respuestas al mismo estímulo, en este caso, la infección con *T. spiralis*.

Según lo descrito por Luebke (2007), una eficaz respuesta adaptativa del hospedador para limitar la infectividad del parásito puede estimarse determinando el número de parásitos intestinales adultos, como un indicador de la capacidad del hospedador para expulsar gusanos.

Bell y Liu (1988) demostraron que existe una correlación positiva entre la dosis administrada en ratones y, el tiempo de expulsión, asociación que puede deberse a una tasa de rechazo más lenta a mayor dosis o a un retraso en la iniciación del rechazo. En su estudio observaron que el día en que la expulsión comienza es variable y se retrasa al incrementar la dosis, hecho no observable con dosis menores. La dosis suministrada de 400 larvas musculares permitió analizar la variabilidad observada en los porcentajes de expulsión de los nematodos del intestino a los 15 días post-infección. Todos los animales de las cinco líneas presentaron adultos intestinales en este momento. Según el estudio realizado por Bell y Liu (1988), las líneas que recibieron dosis de 100 larvas ya no albergaban adultos en el intestino para el día 15 del experimento y en aquellas líneas que recibieron 200 larvas musculares, solo una presentó adultos para ese momento de la infección. Con dosis de 400 larvas, de las 7 líneas estudiadas, cuatro no presentaron adultos en el intestino a los 15 días. El patrón

fenotípico de expulsión fue clasificado previamente como fuerte, intermedio y débil, haciéndose evidente esta diferencia en los ratones al suministrar una dosis de 200 larvas y pronunciándose a dosis mayores. Algo similar demostró Wakelin (1980) quien observó que ratones inmunológicamente normales muestran un patrón de expulsión genéticamente determinado y variable en cada línea. Esto fue comprobado con las líneas derivadas CF1 seleccionadas por peso y la testigo. Si bien estas diferencias fueron marcadas entre las líneas h y h' , el par s no mostró diferencias significativas indicando, en este caso, que poseen una similar capacidad de expulsión a los 15 días dpi. Además, la línea s demostró, al presentar un porcentaje de expulsión mayor, ser más eficiente que la línea negativa h . En cuanto al par h , la línea h' fue mucho más eficiente que su contraparte liviana h para expulsar a los nematodos adultos. En este último caso, la selección por peso modificó sus características en la respuesta intestinal ante *T. spiralis*, demostrando que a pesar de que los procesos de selección por peso en ambos pares fueron realizados de la misma manera, modificaron caracteres de manera diferenciada y estos no afectaron su genotipo en el mismo sentido. Si bien este efecto puede ser asignado a la selección también podría deberse al accionar de procesos dispersivos asociados al bajo tamaño efectivo de las poblaciones. Este tipo de procesos llevan a la fijación de alelos y podrían ser responsables de las diferencias mencionadas.

Bell (1992) comparó dos cepas idénticas en el loci MHC y observó grandes diferencias en el rechazo intestinal de *T. spiralis*, lo que sugiere que los genes no MHC juegan un rol importante en el rechazo intestinal de los gusanos adultos.

Como se vio previamente, los principales efectores que participan en el proceso de expulsión de parásitos gastrointestinales en una primera infección son resultado del desencadenamiento de una respuesta Th2 antígeno específica, y están regulados por diferentes vías que aseguran que el proceso ocurra a pesar de la existencia de posibles deficiencias inmunes. La línea t demostró ser más eficiente en la etapa de expulsión como lo demuestra el 54,7% de expulsión de gusanos adultos a los 15 días post-infección, mientras que en la línea h dicho porcentaje fue de un tercio (PE=18,3%). La línea h tuvo mayores problemas para eliminar los gusanos en relación al resto de las líneas lo que demuestra una susceptibilidad al parásito en la etapa intestinal y un aspecto que podría explicarlo sería una respuesta Th2 deficiente ante

la dosis suministrada del nematodo en esta línea. El rechazo de los nematodos gastrointestinales depende de una combinación de mecanismos fisiológicos que involucran un aumento de la secreción de moco por las células de Goblet, liberación de proteínas neutralizantes por los granulocitos y células epiteliales, hiper proliferación y aumento del peristaltismo intestinal (Sorobetea y col., 2018). Los ratones deficientes inmunológicamente no muestran este patrón, pero incluso en estos casos son capaces de expulsar a los gusanos. Los ratones inmunológicamente normales responden mayormente con un grupo de respuestas inflamatorias e inmunes similares, algunos de las cuales son dependientes de células T y otras no; pero hay una variación considerable dependiente de cepa en tiempo, grado y secuencia de estas respuestas (Kamal y col., 2001). La expulsión de los adultos en una infección natural por *T. spiralis*, que normalmente comienza a los 6 a 8 días y se completa para los 12 a 15 dpi, se ve alterada en ratones sin células T, que no muestran disminución del número de gusanos durante los primeros 15 días de infección (Manson-Smith y col., 1979).

Si bien los eosinófilos juegan un rol en la defensa del hospedador frente a *T. spiralis* en la etapa de expulsión intestinal, su contribución se ha vuelto controversial. Las cinco líneas no presentaron diferencias significativas en el porcentaje de eosinófilos a los 15 dpi, pero sí presentaron diferencias en los porcentajes de expulsión de los adultos en ese momento de infección. O'Connell y col., (2011) expresan que los eosinófilos a pesar de demostrar ser eficaces en destruir a los gusanos *in vitro* y que en modelos murinos de infección parasitaria demostraron un reclutamiento de eosinófilos a los tejidos infectados y la muerte de los parásitos mediado por la liberación de gránulos citoplasmáticos tóxicos no son tan imprescindibles como se advierte en las infecciones por gusanos en ratones deficientes de eosinófilos donde la expulsión no varía de la respuesta observada en animales sin esta deficiencia (Vallance y col., 2000; Jung y Rothenberg, 2014). Este comportamiento fue constatado específicamente en la línea *h* que a pesar de presentar el valor más alto de eosinófilos circulantes a partir de los 15 días dpi, con respecto a las demás líneas, fue la que menor porcentaje de adultos logró expulsar. Esta información sugiere que, en ciertas condiciones, habría una asociación simbiótica entre los eosinófilos gastrointestinales y los parásitos que podría contribuir al

mantenimiento de la homeostasis de los tejidos permitiendo a los parásitos habitar en el intestino del hospedador con limitadas consecuencias a dicha infección (Jung y Rothenberg, 2014).

Lawrence y col. (1998) observaron cambios histopatológicos a nivel intestinal en la expulsión normal de los gusanos, pero también observaron que ratones deficientes en el receptor 1 del Factor de Necrosis Tumoral α (TNFR – 1) expulsaron eficientemente a los gusanos, sin mostrar dichos cambios a nivel intestinal. Incluso la ausencia de elementos importantes de la respuesta tales como atrofia de vellosidad o mastocitosis, no previenen la ocurrencia de la expulsión. Esta información implica que al menos ciertas alteraciones histopatológicas, no son requeridas para la expulsión de los gusanos de *T. spiralis*. La línea testigo, como fue indicado, fue la que mejor respondió a la expulsión de todas las líneas, encontrando en ella el menor número de adultos intestinales a los 15 dpi. Tal como indican Lawrence y col. (1998), esta expulsión no se condice con la evaluación histopatológica de la porción de duodeno de esta línea, donde no mostró grandes alteraciones en su arquitectura. A su vez, dichas alteraciones no se diferenciaron de las producidas en las líneas *s* y *h'*, quienes presentaron diferentes porcentajes de expulsión la *t*. Esto demuestra que grandes cambios a nivel de la porción del duodeno estudiado no son necesarios para que la expulsión se produzca. Lo que sí parece ser esencial para un patrón normal de expulsión es una respuesta Th2 antígeno específica, la liberación de citoquinas de tipo 2 (específicamente IL4) y cambios fundamentales en un repertorio de mecanismos regulatorios de mucosa: proliferación de células madres, permeabilidad vascular y epitelial, y control neuroendocrino (Kamal y col., 2001).

La infección con *T. spiralis* se caracteriza por la inducción de una respuesta Th1 al comienzo de la etapa intestinal. Luego, con la diseminación extensa de las LNB, se vuelve predominante una respuesta Th2 protectora y responsable de la expulsión del parásito. *T. spiralis* rápidamente se desarrolla y se reproduce antes de que la expulsión mediada Th2 elimine a todos los adultos del intestino. (Ilic y col., 2012). Yu y col. (2013) midieron un número considerable de citoquinas en ratones C57BL/6 infectados con 400 larvas de *T. spiralis* y observaron cómo, mientras la fase enteral progresa, el IFN- γ aumenta favoreciendo una respuesta Th1 hasta que las LNB comienzan su migración momento en que se produce un incremento paulatino de la

IL4 favoreciendo una respuesta Th2. La ineficiencia de algunos individuos para expulsar a los adultos de *T. spiralis* podría deberse a una menor producción de IL4 o una relación IFN- γ / IL4 mayor a 2 (Godoy y col., 2014) lo que estaría a su vez correlacionado con una escasa formación de atrofia de la vellosidad/hiperplasia de la cripta. Esto indica que los ratones de la línea *t* tuvieron la respuesta Th2 más importante de las líneas en estudio en la fase de expulsión, siendo la respuesta de la línea *h* la más débil hacia los nematodos lo que resultó en la ineficiencia en expulsar a un número considerable de estos a los 15 dpi.

Los antígenos de *T. spiralis* de todas las etapas inducen una red de diferentes mediadores que aumentan la población de linfocitos Treg en el hospedador y específicamente en el sitio de la inflamación muscular (Ashour, 2013). Este aumento de las células Treg sería fundamental para suprimir la respuesta inflamatoria a las células nodrizas para controlar la inflamación local al suprimir la respuesta Th1. Así, los helmintos pueden disminuir la respuesta inmune a través de la inducción de células Treg o de sus citoquinas antiinflamatorias IL10 y TGF- β (Ashour, 2013). Sin embargo, solo es necesario que ocurra una pobre respuesta Th1 para destruir a las larvas en el proceso de enquistamiento, algo que no sucede en una respuesta Th2 óptima (Beiting y col., 2007). Esto se correlaciona con lo observado en la razón que relaciona las larvas en diafragma y lengua con los adultos en intestino al día 15 (RD y RL). Hasta el momento de su expulsión, los adultos continúan liberando LNB que van a determinar el número final de larvas enquistadas en los músculos. Por lo que, cuanto antes un individuo se deshaga de los gusanos intestinales, el número de LNB que alcanzarán los músculos será menor en comparación con otro hospedador cuya capacidad de expulsión sea menos eficiente. Es por esto que el RD mide de manera relativa el número de larvas enquistadas por cada adulto presente en el intestino a los 15 días, lo que habla de la capacidad del hospedador de controlar la fase de enquistamiento. Cuanto mayor es el RD, menor es la eficacia de respuesta de hospedador para evitar de manera eficiente el enquistamiento. La línea *t*, que fue la más eficiente en expulsar a los nematodos del intestino y tuvo una mejor respuesta Th2, presentó un RD mayor, lo que manifiesta menor eficiencia en controlar el enquistamiento de las larvas que alcanzaron las células musculares, en relación al resto de las líneas. Ello demuestra la efectividad de una respuesta Th2 en expulsar a

los adultos del intestino, pero que esta respuesta no condiciona la capacidad de los individuos de poder controlar la etapa muscular de la infección. Las otras líneas mostraron un comportamiento significativamente similar en el RD, lo que marcaría la relevancia, al menos en este estudio, de la fase de expulsión en el resultado final de la enfermedad.

Con respecto al número de larvas de *T. spiralis* enquistadas en los músculos, se vio un elevado conteo en todas las líneas lo que demuestra que resultaron ser susceptibles a la dosis de 400 larvas musculares, pero dicha dosis permitió analizar diferencias significativas en los demás índices en el marco de la susceptibilidad.

Si bien todas las líneas resultaron ser susceptibles a la infección con *T. spiralis* de acuerdo a la dosis administrada, al analizar las cargas de larvas musculares y los ICRr tanto en diafragma como en lengua se observó que la línea *h* fue la más débil en su respuesta a la infección, lo que se confirma con la alteración en su estado de salud, y la decisión de optar por aplicar el punto final humanitario. Las líneas *t* y *h'* mostraron los menores valores de larvas en los músculos y de ICRr lo que marca una respuesta más fuerte a la parasitosis con la dosis suministrada con respecto a las demás líneas. Este índice muestra la susceptibilidad/resistencia de los ratones al expresar el resultado de la interacción parásito-hospedador en su totalidad, es decir desde el inicio hasta el final, incluyendo los diferentes momentos de la infección.

Como se mencionó anteriormente, en las líneas derivadas de la cepa CF1 se advirtieron alteraciones en los individuos de la línea *h*, los cuales comenzaron a mostrar un deterioro de su estado general alrededor de los 45-50 dpi. Unos de los signos observados fue una disminución significativa del peso corporal durante la etapa parenteral de la infección, con respecto a las demás líneas. Su escasa capacidad para expulsar a los adultos del intestino habría resultado en una migración excesiva de LRN hacía la circulación sistémica y acantonamiento en músculos lo que habría generado una reacción inflamatoria generalizada pudiendo ser la causa del síndrome presentado, que además de la pérdida de peso mencionada, incluyó mal aspecto del manto, disminución en la actividad y descarga ocular. Debido a esto, se decidió optar por el punto final humanitario en esta línea. El resto de los individuos en estudio, pertenecientes a las demás líneas, no manifestaron ningún signo de distrés general

como los antes mencionados durante el período analizado. Las etapas migratoria y sistémica son las más dañinas y traumáticas de la infección por *T. spiralis*. Bell y Liu (1988), en un estudio realizado con diferentes líneas endocriadas con dosis crecientes a partir de 1000 larvas por ratón, contabilizaron las muertes de ratones ocasionadas por las altas cargas. De las 5 líneas de ratones en estudio, solo una presentó muertes con todas las dosis, mientras que para las otras cuatro las muertes ocurrieron solo a dosis más elevadas, lo que demuestra la gran variabilidad en la resistencia/tolerancia a la infección de esta especie. Estos comportamientos acuerdan con lo informado en la bibliografía acerca de que el genotipo del hospedador influye fuertemente en la mortalidad y en el tiempo en que esta ocurre por efectos de la infección (Bell y Liu, 1988). Este comportamiento diferente demuestra la marcada susceptibilidad que presenta la línea *h* ante la misma dosis de larvas infectivas de *T. spiralis* en relación a las demás líneas, y reafirma la idea de que la selección por peso y los procesos dispersivos asociados al bajo tamaño efectivo de las poblaciones, produjeron cambios en el genotipo de las líneas, haciendo que no sólo respondan de manera diferente a la expulsión de los adultos intestinales, como se mencionó anteriormente, sino que también genere respuestas marcadas en las etapas de migración y enquistamiento que lleven como en este caso, al desmejoramiento de estado de salud de la línea *h*.

Es válido remarcar que estas cuestiones refieren a las infecciones primarias, mayormente aquellas que cursan con una alta carga infecciosa. Se debe recordar, también que, a diferencia de lo que ocurre en las infecciones experimentales, las infecciones naturales por estos parásitos se presentan a través de desafíos repetidos con baja carga y esto posiblemente afecte tanto el desencadenamiento de la respuesta del hospedador como las contribuciones relativas de los diferentes componentes inmunes a la resistencia parcial usualmente generada (Sorobetea y col., 2018).

Como se mencionó anteriormente, la interacción parásito-hospedador es una relación compleja, que puede analizarse en diversos sentidos. Existen mecanismos del hospedador especializados en eliminar a los parásitos y también mecanismos del parásito especializados en evitar la respuesta inmune del hospedador.

Dentro de estos mecanismos, se encuentra el rol controversial que cumplen los eosinófilos en una infección con *T. spiralis*, los cuales se pensaba que jugaban un rol preponderante en la lucha del hospedador contra los parásitos.

En un estudio realizado en 1977, Grove y col. hallaron que ratones tratados con suero antieosinófilos mostraron mayor carga de larvas musculares que los ratones cuya actividad eosinofílica no estaba modificada. Esto coincide con lo hallado por Hamada y col. (1992), quienes estudiaron la presencia de eosinófilos hipodensos en el tejido infectado con larvas de *T. spiralis* y observaron el aumento de la actividad citotóxica de estas células contra los parásitos. Sin embargo, nuevos estudios han dilucidado un poco más el verdadero rol de los eosinófilos en la respuesta inmune, como aquellos de Vallance y col. (2000) y Fabre y col. (2009). Asimismo, se explica la poca relevancia de la IL5 en la defensa ante los parásitos helmintos, ya que su mayor función está centrada en el reclutamiento de eosinófilos y la estimulación de su producción. Vallance y col. (2000) observaron que los ratones deficientes en IL 5 y los controles rechazan a su carga de gusanos de manera similar en una primera infección. Esto sugiere que cualquier rol que la IL 5 y los eosinófilos pueden jugar en la defensa del hospedador frente a una primera infección a *T. spiralis*, es menor. Poca a ninguna alteración en la sobrevivencia del parásito durante una primera infección ha sido encontrada en ratones deficientes de IL5, ratones transgénicos de IL5 ni en ratones con una depleción de eosinófilos por anticuerpos específicos (Fabre y col., 2009). En otro estudio, Gebreselassie y col. (2012) determinaron que en ratones infectados con *T. spiralis*, la marcada muerte de las larvas musculares del parásito es debida a la inducción de neutrófilos y macrófagos productores de sintetasa de óxido nítrico, y una excesiva respuesta inflamatoria está vinculada con cambios patológicos del músculo infectado. Debido a que la transferencia de eosinófilos a los ratones resultó en una sobrevivencia larval, los eosinófilos son vistos paradójicamente implicados en la sobrevivencia del parásito, específicamente a través de la promoción de un reclutamiento de células Th2 y la prevención de la muerte parasitaria inducida por macrófagos y neutrófilos.

En su estudio Fabre y col. (2009) utilizaron individuos C57BL/6 divididos en dos grupos, uno PHIL (deficientes en eosinófilos) y otro control. Ambos grupos fueron infectados con 300 larvas y se revisaron sus intestinos a los 15 dpi y sus músculos a los 28 dpi. Todos los individuos mostraron la misma tasa de expulsión a los 15 días

demostrando la poca participación que tienen los eosinófilos en la expulsión de los adultos. Sin embargo, los ratones PHIL mostraron menor carga muscular lo que implicaría a los eosinófilos más en la protección de las larvas enquistadas que en su destrucción. En nuestro estudio, hasta el día 15 inclusive, no se presentaron diferencias significativas en los valores de eosinófilos en las líneas, pero como se mencionó, si se presentaron diferencias en los porcentajes de expulsión. Esto reafirma la idea de Fabre y col. (2009) de la poca participación de los eosinófilos en la expulsión. A su vez, la línea *h* fue la que presentó un mayor número de eosinófilos a partir del día 15 hasta que se decidió optar por el punto final humanitario. Esto podría correlacionarse con la alta carga de larvas de *T. spiralis* recuperadas de los músculos de esta línea. Esta relación no se demostró al analizar la línea *s* que presentó los menores valores de eosinófilos, pero cuyo conteo de larvas enquistadas no fue de los más bajos. Esto marcaría la influencia de otros factores inmunitarios en la defensa del organismo contra las larvas una vez acantonadas dentro de las células musculares.

En humanos se observa que la exposición crónica a eosinófilos activados puede ocasionar daño tisular en músculo, miocardio y sistema nervioso central, lo que conduce a la forma más severa de trichinellosis (Bruschi y col., 2008) y la eosinofilia es el hallazgo de laboratorio más temprano y característico de la patología (Pawlowski, 1983) y está correlacionado con la intensidad de la infección (Oltean y col., 2012).

Tal como se evidencia en la bibliografía, el controversial papel que juegan los eosinófilos también fue apreciado en este estudio. La línea *h* fue la que presentó el mayor valor de eosinófilos circulantes, y fue la que tuvo mayores problemas en la expulsión de los adultos intestinales, la que registró la mayor carga de larvas musculares y la que presentó signos de deterioro de su salud. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Vallance y col. (2000), Fabre y col. (2009) y Gebreselassie y col. (2012), y remarcan el rol protector de los eosinófilos hacia el parásito y su acción perjudicial para el hospedador.

La línea *t*, si bien fue, luego de la *h*, la segunda con mayores niveles de eosinófilos circulantes, fue la que mejor respondió a la parasitosis con los mejores índices de expulsión intestinal y de carga parasitaria muscular, marcando que el resultado de la infección con *T. spiralis* no está supeditado solo a la actividad de los

eosinófilos y que tal vez en ciertas condiciones estos puedan cumplir un papel en la infección parasitaria. Sumado a esto, las líneas *t* y *h* mostraron, igualmente entre sí, un pico retrasado en el número de eosinófilos, es decir a los 30 dpi, lo que puso en evidencia una respuesta diferente de eosinófilos de las demás líneas donde dicho pico ocurrió en el día 15.

Con respecto a los linfocitos, estos son fundamentales ya que son las únicas células en el organismo capaces de reconocer específicamente y de distinguir diferentes determinantes antigénicos (Abbas, 2008), lo que les otorga un papel clave en la activación de la respuesta inmune adaptativa una vez que las células presentadoras de antígeno migran hacia los linfonódulos mesentéricos. La similitud en la disminución de sus valores en todas las líneas para el día 15 post-infección podría estar relacionada con lo que expresado por Dupouy-Camet y col. (1994), quienes afirman, en humanos, que esa disminución en una infección por *T. spiralis* se debería a la destrucción de los linfocitos por factores parasitarios o al secuestro de linfocitos en un área peri larvaria. Vale la pena marcar la caída de esta estirpe celular en los ratones de la línea *h* al día 30, hecho que estaría relacionado con la consolidación de los quistes musculares. Esto puede explicarse con el estudio realizado por Magnaval y Leclerc (2000), en donde se analizaron diferentes brotes en humanos, presentándose diferentes grados de linfopenia, pero el grado fue más marcado cuanto mayor fue la carga parasitaria.

Otra variable a analizar para evaluar la interacción parásito-hospedador es el hematocrito. Si bien estudios como los de Meagher (1998) y Dlugozs y col. (2013) indican que hay un aumento del hematocrito ante una infección parasitaria con *Capillaria hepatica* y *T. spiralis* respectivamente, el aumento en el segundo caso se produjo 7 días luego de ocurrida la infección. En las líneas seleccionadas y testigo derivadas de la cepa CF1 no se evaluó el hematocrito a los 7 días de infección, por lo tanto, no pudo conocerse si tal aumento tuvo lugar. Si se lo evaluó a los 15 días post-infección, en donde la disminución significativa del hematocrito en todas las líneas concuerda con lo también expresado por Dlugozs y col. (2013) quienes describieron que la disminución del hematocrito dos semanas luego de la infección con *T. spiralis* podría deberse al daño y pérdida de sangre intestinal que producen los adultos y las larvas recién nacidas en el hospedador.

Para realizar una valoración más completa de la respuesta de las cinco líneas al desafío con *T. spiralis* se evaluaron los cambios histopatológicos a nivel del duodeno en las diferentes etapas de la infección. Este enfoque permitió determinar si las posibles diferencias en la resistencia/tolerancia de los ratones se ven reflejadas en los cambios histopatológicos característicos de la enfermedad tales como atrofia y fusión de vellosidades, hiperplasia de criptas o glándulas de Lieberkühn y células mucosas o de Goblet (Manson-Smith y col., 1979; Garside y col., 1992).

En ratones inmunológicamente normales, la inflamación se caracteriza por atrofia de la vellosidad, hiperplasia de la cripta, hiperplasia de las células de Goblet y aumento de la permeabilidad de la mucosa (Garside y col., 1992). Estos cambios reflejan el aumento de la actividad de las células madre y una sobrevida de las células epiteliales reducida. Dehlawi y Wakelin (2002) demostraron que, a excepción del aumento de la permeabilidad de la mucosa, estos componentes de la respuesta inflamatoria están relacionados con cambios en el estímulo de las células madres epiteliales y están influenciados por células T. El aumento de la división celular en las criptas medido aquí en términos de índice mitótico, lleva a una mayor transición de las células epiteliales a través de la superficie de la vellosidad y a una tasa aumentada de pérdida celular en la punta de la vellosidad. En consecuencia, las vellosidades se vuelven más cortas y las criptas más largas produciendo una disminución de la relación vellosidad cripta (Kamal y col, 2001).

Las similares características histopatológicas del duodeno en los diferentes momentos de la infección de las líneas *t*, *s* y *h'*, con discretas modificaciones de la arquitectura normal intestinal (leve atrofia y fusión de vellosidades, y glándulas ligeramente alargadas y reactivas) marca una respuesta intestinal análoga entre las líneas. Esto difiere de lo observado en el porcentaje de expulsión a los 15 días, cuando cada línea tuvo valores significativamente distintos, siendo en orden la línea *t* la más eficiente y la línea *s* la menos eficiente de estas tres. Trabajos previos han demostrado que las alteraciones en la relación vellosidad-cripta son reguladas a través de la actividad de varias citoquinas incluyendo IL4 y TNF- α (Lawrence y col., 1998) lo que supone un aumento en su expresión en animales con respuesta Th2 potente. Sin embargo, animales con una deficiencia de TNFR-1 no mostraron atrofia de la vellosidad, pero si fueron igual de eficientes en la expulsión (Lawrence y col., 1998).

Esto marcaría que al menos esta característica regulada por TNF α e IL4 no es imprescindible para que ocurra la expulsión (Kamal y col., 2001). Por otro lado, la línea *s*´ mostró mayor grado de severidad de las lesiones respecto a las líneas antes mencionadas con una hiperplasia de las glándulas casi del doble en relación a los controles (1,90) y una atrofia de las vellosidades del 40 % (0,6). Estas diferencias histopatológicas (mayor atrofia y fusión de vellosidades, criptas hiperplásicas) no mostraron asociación con el porcentaje de expulsión observado en el estudio, ya que esta línea tuvo valores de expulsión a los 15 días significativamente similares a las líneas *s* y *h*´. Es decir que, al menos en la porción del intestino estudiada, la magnitud de la respuesta inflamatoria no condiciona el resultado de la expulsión ya que la línea *s*´ tuvo mayor reacción histopatológica que la línea *t*, pero menor porcentaje de expulsión.

La reacción, más exacerbada a nivel histopatológico de la porción del duodeno analizada, con incluso congestión y edema de la lámina propia, la presentó la línea *h* sobre todo a los 15 y 60 dpi. Este hecho discrepa con lo observado en otros estudios, en donde las líneas con menor índice de expulsión mostraron menor reacción inflamatoria (Lawrence y col., 1998). A su vez, supondría una respuesta Th2 más fuerte. Este comportamiento podría tener alguna relación con lo observado en el trabajo de Dehlawi y Wakelin (2002) quienes demostraron que los cambios en los índices mitóticos y la relación vellosidad-cripta es dependiente de la dosis suministrada, y como se remarcó anteriormente, por la alteración del estado de salud de los animales, la línea *h* fue la única sometida, en relación a lo expresado por Bell y Liu (1988), a una dosis alta en comparación con las demás líneas.

Con respecto a las células mucosas de Goblet, en la evaluación histopatológica no se observaron modificaciones de consideración en ninguna de las líneas lo que podría deberse a la relativa susceptibilidad de todos los animales y a una mayor actividad de estas células en yeyuno.

Es de relevancia remarcar que a los 60 dpi todas las líneas recuperaron la arquitectura histológica normal del duodeno, a excepción de la línea *h* que en el momento del punto final humanitario aún presentaba un infiltrado inflamatorio linfoplasmocítico en la lámina propia y vellosidades, glándulas reactivas y congestión.

En el trabajo de Kamal y col. (2001) se observó que ratones inmunológicamente normales infectados con 300 larvas de *T. spiralis* mostraron el patrón característico de respuesta inflamatoria intestinal, algo que no fue observado en ningunas de las líneas seleccionadas por peso de forma tan marcada. A su vez, advirtieron que los cambios histopatológicos se encuentran disminuidos en ratones deficientes en células T lo que indica una dependencia de ellas, y un incremento en la sobrevivencia de los gusanos adultos. Esto coincide con lo observado en las líneas en estudio donde ninguna fue capaz de eliminar la totalidad de los gusanos adultos al día 15 post-infección lo que podría estar marcando una deficiencia de células T de estos ratones y brindaría más evidencia acerca de la susceptibilidad a la infección por *T. spiralis* a la dosis suministrada.

Está claro que la expulsión no es un proceso único, con un único efector encargado en producirla. Animales cuyo sistema inmunológico no presenta alteraciones muestran un patrón de expulsión genéticamente determinado y variable entre cepas (Wakelin, 1980). Los ratones inmunológicamente deficientes no muestran este patrón, pero en la mayoría de los casos expulsan de igual modo a los gusanos. Mayormente los ratones inmunológicamente normales responden con un grupo de respuestas inflamatorias e inmunes similares, algunas de las cuales son dependientes de células T y otras no; pero hay una variación considerable dependiente de cada cepa en el tiempo, grado y secuencia de estas respuestas. Una conclusión que puede surgir de esto es que el intestino tiene una respuesta estándar (de multicomponentes y no selectiva) a la infección con *T. spiralis* (y otros nematodos), y que varios de estos componentes solos o en combinación pueden producir la expulsión de los gusanos habiendo una considerable redundancia en el sistema. Incluso la ausencia de elementos importantes de la respuesta (atrofia de vellosidad o mastocitosis) no previenen la ocurrencia de la expulsión. Lo que sí parece ser esencial para un patrón normal de expulsión es una respuesta Th2 antígeno específica, la liberación de citoquinas de tipo 2 (específicamente IL4) y cambios fundamentales en un número de mecanismos regulatorios de mucosa (proliferación de células madres, permeabilidad vascular y epitelial, y control neuroendocrino), si bien ello no se demostró en este trabajo. Cualesquiera que sean los eventos precisos que llevan a los gusanos a abandonar el intestino, en general, parece aceptarse que estos no incluyen

mecanismos efectores antígeno específicos que ocasionen daños directos e irreversibles en los gusanos. La inflamación en el más amplio de los sentidos aún parece ser la primera causa de la expulsión de los gusanos de *Trichinella* (Kamal y col., 2001).

Las respuestas informadas hasta este punto se enfocaron mayormente en las diferencias observadas entre las distintas líneas ante el desafío con *T. spiralis*. También se analizó el efecto que podría tener sobre la capacidad infectante del nematodo, el realizar un pasaje por cada línea derivada de CF1 y luego infectar con las larvas musculares obtenidas a una única línea, la C57BL/6 que es la cepa en la que se mantiene el parásito. Este ensayo fue llevado a cabo con la dosis única de 300 larvas infectivas, tal como fue realizado por Fabre y col. (2009).

Al analizar los resultados de la digestión enzimática del diafragma de los ratones C57BL/6 infectados con larvas provenientes de las diferentes líneas derivadas de CF1, se encontraron diferencias significativas en las cargas de larvas musculares. Estas variaciones, debido a que el genotipo hospedador es el mismo, deben estar dadas por algún cambio en el fenotipo del parásito luego del pasaje por las líneas derivadas CF1. Una diferencia encontrada en estas líneas es que la línea liviana se presentó el menor valor de eosinófilos circulantes con respecto a las demás líneas y a su vez no mostró diferencias significativas en sus valores a lo largo del tiempo de infección. Fabre y col. (2009) observaron que las larvas infectantes provenientes de ratones C57BL/6 deficientes de eosinófilos (PHIL) resultaron menos eficientes en propagar la infección que los ratones C57BL/6 normales, aunque no realizaron estudios para dilucidar de qué manera se ejerce esta modificación. Son necesarios mayores estudios para poder aseverar que el pasaje de *T. spiralis* por la línea se produjo modificaciones en el parásito y de qué manera eso puede influenciar en la capacidad infectante del mismo.

5. CONCLUSIONES

Las simbiosis consisten en relaciones de diferente tipo entre diferentes especies. El parasitismo es un caso particular de simbiosis y las enfermedades asociadas se manifiestan como fenotipos particulares y complejos del hospedador, uno de los participantes de la relación. Como todo fenotipo la enfermedad parasitaria reconocible en el hospedador es el resultado de las acciones conjuntas del genotipo del individuo que la padece, del ambiente en que dicho genotipo se expresa y las potenciales relaciones genotipo-ambiente tales como interacciones y correlaciones. Sin embargo, por tratarse de un caso que involucra dos especies, el resultado de esa interacción interespecífica introduce una particularidad a este vínculo biológico en tanto, la salida del sistema resulta de las características no de un genotipo sino de dos: el del hospedador y el del parásito y de las relaciones que dichos genotipos establecen con el ambiente. En el caso de la trichinellosis, el hospedador brinda el ambiente en el que el parásito cumple los diferentes estadios y dicho ambiente está modulado por el genotipo del hospedador.

El planteo experimental utilizado en esta tesis intentó relevar algunos aspectos de este vínculo al trabajar con diferentes genotipos de *Mus musculus* e indagar en qué medida los ambientes ofrecidos por el hospedador se vinculan con las particularidades del parásito para dar como respuesta fenotipos particulares que posibiliten diferenciar grados de resistencia /susceptibilidad entre las líneas del modelo murino empleado.

La infección experimental con *T. spiralis* permitió determinar que la línea *t*, sin seleccionar, fue la que más eficientemente expulsó los adultos intestinales y la que, junto con la *h'*, presentó la menor carga relativa de larvas enquistadas en los músculos. Por este motivo, esta línea se clasifica como resistente a la dosis suministrada, en comparación con las demás líneas. Por el contrario, la línea *h* claramente se clasifica como susceptible a la infección, debido a que fue la que tuvo mayores problemas para expulsar a los adultos (siendo la que más gusanos intestinales presentó al día 15 post-infección), la que presentó la mayor carga de larvas enquistadas y la que manifestó una disminución significativa del peso corporal, disminución de la actividad, mal aspecto del manto y descargas oculares, lo que llevó

a la decisión de aplicar el punto final humanitario en estos animales. A su vez fue la que mostró cambios más marcados a nivel histopatológico en la porción de duodeno estudiada, presentando alteraciones de la estructura histológica normal al momento de su sacrificio, hecho que no ocurrió en el resto de las líneas.

El porcentaje de eosinófilos circulantes no mostró un patrón asociado al comportamiento de las líneas frente a la infección. Los valores fueron los más elevados precisamente en las dos líneas clasificadas como resistentes y susceptibles, demostrando el papel controversial que juegan estas células en la infección expresado en la bibliografía.

A su vez, se buscó indagar sobre la capacidad de los distintos hospedadores utilizados para generar alteraciones en el nematodo durante el transcurso de la infección. Esto se confirmó a través de la variabilidad observada en la infección en ratones C57BL/6 con larvas de *T. spiralis* recuperadas de los ratones de las distintas líneas derivadas de CF1. La línea s cuyos eosinófilos fueron los más bajos del estudio y, que mostraron la menor variación, modificó de algún modo la capacidad infectante de *T. spiralis* ya que el número de larvas recuperadas de los músculos en los ratones C57BL/6 infectados con larvas de esta línea fue significativamente menor que en los demás ratones. Esto marcaría la actividad de los eosinófilos como esenciales para producir tolerancia en el hospedador asegurando el éxito de las infecciones siguientes, lo que solo genera más interrogantes acerca de cuánto de la respuesta inmune hacia *T. spiralis* es el resultado de una defensa competente del hospedador y cuánto es orquestado por el nematodo.

La variabilidad observada en los hospedadores sería producto de la selección artificial por peso corporal que habría generado un desbalance genético en las líneas mostrando alteraciones en su aptitud biológica y produciendo cambios a nivel inmunológicos denotados en la respuesta hacia *T. spiralis*. Asimismo, no puede dejarse de mencionar el posible rol desempeñado por los procesos dispersivos asociados al bajo tamaño efectivo que podría haber llevado a la fijación de diferentes alelos en las diferentes líneas.

El estudio realizado reafirma la importancia del modelo experimental utilizado y enfatiza en su aprovechamiento para estudios que puedan ser extrapolados hacia

especies epidemiológicamente más relevantes en las diferentes enfermedades parasitarias.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK (2008). Células y Tejidos del Sistema Inmunitario. En Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (eds.) *Inmunología celular y molecular*, 6ta edición (pp. 17-35), Barcelona (España), Elsevier.
- AEC. Clinical SOP 51 (2016). Cardiac blood collection. Terminal bleed. St Vincent's Hospital, Melbourne, Australia.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783–801.
- Alizadeh H, Wakelin D. 1982. Comparison of rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in mice and rats. *International Journal of Parasitology* 12, 65- 73.
- Angkasekwinai P, Srimanote P, Wang YH, Pootong A, Sakolvaree Y, Pattanapanyasat K, Chaicumpa W, Chaiyaroj S, Dong C (2013). Interleukin-25 (IL-25) promotes efficient protective immunity against *Trichinella spiralis* Infection by enhancing the antigen-specific IL-9 response. *Infect. Immun.* 81, 3731–3741.
- Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF, Stadecker MJ, Gause WC (2007). Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol.* 7: 975–987.
- Artis D, Grecis RK (2001). T helper cytokine responses during intestinal nematode infection: Induction, regulation and effector function. *Parasitic Nematodes: Molecular Biology, Biochemistry and Immunology* (ed. Kennedy, M.W. y Haenett, H.), 311-371.
- Atías A (1999). El parásito. En Atías A (ed.) *Parasitología Médica*, 3ra edición (pp. 21-38), Santiago (Chile), Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda.
- Ashour D (2013). *Trichinella spiralis* immunomodulation: an interactive multifactorial process. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 9(7), 669–675
- AVMA (2013). Guidelines on Euthanasia of Animals.
- Bauss F, Droge W, Mannel DN (1987). Tumor-necrosis-factor mediates endotoxic effects in mice. *Infect. Immun.* 55, 1622-1625.

- Beiting DP, Bliss SK, Schlafer DH, Roberts VL, Appleton JA (2004). Interleukin-10 limits local and body cavity inflammation during infection with muscle-stage *Trichinella spiralis*. *Infect. Immun.* 72: 3129–3137.
- Beiting DP, Gagliardo LF, Hesse M, Bliss SK, Meskill D, Appleton JA (2007). Coordinated control of immunity to muscle stage *Trichinella spiralis* by IL-10, regulatory T cells, and TGF- β . *The journal of immunology.* 178(2), 1039-1047.
- Bell RG, Liu WM (1988). *Trichinella spiralis*: quantitative relationship between intestinal worm burden, worm rejection, and measurement of intestinal immunity in inbred mice. *Exp. Parasitol.*, 66, 44-56.
- Bell RG (1992). *Trichinella spiralis*: Evidence that Mice Do Not Express Rapid Expulsion. *Exp. Parasitol.*, 74, 417-430.
- Bell RG (1998). The generation and expression of immunity to *Trichinella spiralis* in laboratory rodents. *Advances in Parasitology* 41: 149-217.
- Bernardi S, Brogliatti G, Oyarzabal MI (1999). Diferencias de fertilidad en ratones seleccionados por peso. *S. Analecta Veterinaria* 19,1/2: 11-17. ISSN 1514-2590.
- Bernardi S, Brogliatti G, Oyarzabal MI (2009). Ovarian Structure in Mice Lines Selected for Weight. *Anat. Histol. Embryol.* 38, 200–203 doi: 10.1111/j.1439-0264.2008.00921.x
- Bernardi S, Brogliatti G, Oyarzabal MI (2011). Efectos de la Selección y de la Superovulación en las Pérdidas Gestacionales de Ratonas CF1. *Int. J. Morphol.*, 29(1):204-213.
- Blackwell NM, Else KJ (2002). A Comparison of Local and Peripheral Parasite-Specific Antibody Production in Different Strains of Mice Infected with *Trichuris muris*. *Parasite Immunology*, 24, 203-211.
- Bolas-Fernandez F, Wakelin D (1989). Infectivity of *Trichinella* isolates in mice is determined by host immune responsiveness. *Parasitology*.99, 83-8
- Britov VA, Boev SN (1972). Taxonomic rank of various strains of *Trichinella* and their circulation in nature. *Vestn. Akad. Nauk. SSSR*, 28, 27-32.

- Bruce RG (1974). Occurrence of hypodermal gland cells in the bacillary band of *Trichinella spiralis* during two phases of its life cycle. In: Kim, C.E. (Ed.), Proceedings of the Third International Conference of Trichinellosis, Intext Educational Publishers, New York, pp. 43–48.
- Bruschi F, Korenaga M, Watanabe N (2008). Eosinophils and *Trichinella* infection: toxic for the parasite and the host? Trends. Parasitol., 24, 462-467.
- Campbell WC (1983). *Trichinella* and Trichinosis. Plenum Press, New York, p. 582.
- Conole J, Wilkinson MJ, McKellar QA (2003). Some observations on the pharmacological properties of ivermectin during treatment of a mite infestation in mice. Contemporary Topics by the American Association for Laboratory Animal Science. 42(4):42-5.
- Capron A, Dessaint JP, Capron M, Ouma JH, Butterworth AE (1987). Immunity to schistosomes: progress toward vaccine. *Science* 238:1065.
- Carlier Y, Truyens C (1995). Influence of maternal infection on offspring resistance towards parasites. *Parasitology Today* 11: 94-99.
- Castaño Zubieta R, Ruiz M, Morici G, Lovera R, Fernández MS, Caracostantogolo J, Cavia R (2014). First report of *Trichinella spiralis* from the whiteeared (*Didelphis albiventris*) and the thick-tailed opossum (*Lutreolina crassicaudata*) in central Argentina. *Helminthologia*, 51(3): 198-202.
- De Boni U, Lenczner MM, Scott JW (1977). Autopsy of an Egyptian mummy. 6. *Trichinella spiralis* cyst. *Can Med Assoc J.*117:472
- Dea-Ayuela MA, Bolas-Fernandez F (1999). *Trichinella* antigens: a review. *Vet. Res.* 30: 559-571.
- Dehlawi MS, Wakelin D (1995). Dose-dependency of mucosal mast cell responses in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Research and Reviews in Parasitology.* 55, 21–24.
- Dehlawi MS, Wakelin D (2002). Parameters of intestinal inflammation in mice given graded infections of the nematode *Trichinella spiralis*. *J Helminthol*, Jun;76(2):113-7.

Despommier DD (1983). Biology. En *Trichinella* and trichinosis (W.C. Campbell, Ed.). Plenum Press, New York, 75-151.

Despommier DD (1990). *Trichinella spiralis*: The worm that would be virus; Parasitology Today, Vol 6 No. 6.

Despommier DD (1993). *Trichinella spiralis* and the concept of nich; J. Parasitology. 79(4), p. 472-482.

Dick TA (1983). Species, and infraspecific variation. In *Trichinella* and trichinosis (pp. 31-73). Springer, Boston, MA.

Dick TA, Pozio E (2001). *Trichinella* spp. and Trichinellosis. In: Samuel, WM, Pybus MJ, Kocan AA (Eds.), Parasitic Diseases of Wild Mammals, second ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 380–396

Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal JM, van de Vorstenbosch C (2001). A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. Journal of Applied Toxicology. 21, 15–23.

Dlugosz EM, Schutz H, Meek T H, Acosta W, Downs C J, Platzer E G, Chappell MA, Garland T (2013). Immune response to a *Trichinella spiralis* infection in house mice from lines selectively bred for high voluntary wheel running. Journal of Experimental Biology. 216 (22).

Downs C, Schutz H, Meek TH, Dlugosz EM, Acosta W, de Wolski KS, Malisch JL, Hayes JP, Garland T Jr. Within-lifetime trade-offs but evolutionary freedom for hormonal and immunological traits: evidence from mice bred for high voluntary exercise. The Journal of Experimental Biology. 215, 1651-1661.

Dupouy-Camet J, Paugam A, Picard F, Ancelle T (1994). Lymphopenia in trichinosis, Presse Med. 23, 95.

Dworkin MS, Gamble HR, Zarlenga DS, Tennican PO (1996). Outbreak of Trichinellosis Associated with Eating Cougar Jerky. Journal of Infectious Diseases, 174(3), 663–666. doi:10.1093/infdis/174.3.663

Echchannaoui H, Frei K, Schnell C, Leib SL, Zimmerli W, Landmann R (2002). Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J. Infect. Dis.* 186:798–806.

Elin RJ, Wolff SM (1976). Biology of endotoxin. *Annu. Rev. Med.* 27, 127- 141.

Euzeby J (1994). *Revue Méd. Vét.* Une vieille Anthropozoonose toujours actuelle: la Trichinose (= *Trichinellose*). Vol 14, 11: 795-818.

Fabre V, Beiting DP, Bliss SK, Gebreselassie NG, Gagliardo LF, Lee NA, Lee JL, Appleton JA (2009). Eosinophil Deficiency Compromises Parasite Survival in Chronic Nematode Infection. *The Journal of Immunology.* 182(3):1577-83.

Fariña F, Pasqualetti MI, Bessi C, Ercole ME, Vargas C, Arbusti P, Ayesa G, Ribicich MM (2020). Comparison between *Trichinella patagoniensis* and *Trichinella spiralis* infection in BALB/c mice. *Veterinary Parasitology* 286, 109248.

Figallo, R.; Oyarzabal, M. I. (1989). Crecimiento en ratones CF1 para distintas densidades de población. Primera Jornada y IX Reunión de la Sociedad de Biología de Rosario.

Filbey KJ, Grainger JR, Smith KA, Boon L, van Rooijen N, Harcus Y, Jenkins S, Hewitson JP, Maizels RM (2014). Innate and Adaptive Type 2 Immune Cell Responses in Genetically Controlled Resistance to Intestinal Helminth Infection. *Immunology and Cell Biology*, 92, 436-448.

Finkelman FD, Madden KB, Cheever AW, Katona IM, Morris SC, Gately MK, Hubbard BR, Gause WC, Urban JF (1994). Effects of interleukin 12 on immune responses and host protection in mice infected with intestinal nematode parasites. *J Exp Med.* 179: 1563–1572.

Fruhman GJ (1966). Bacterial endotoxin: Effects on erythropoiesis. *Blood* 27:363-70

Gabay C, Kushner I (1999). Mechanisms of disease: Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.* 340, 448-454

Gamble HR (1985). *Trichinella spiralis*: Immunization of mice using monoclonal antibody affinity-isolated antigens. *Experimental Parasitology*, 59(3), 398–404.

Garkavi BL (1972). The species of *Trichinella* isolated from wild carnivores. *Veterinaria* 10, 90–91.

Garside P, Grecis RK, Mowat AM (1992). T lymphocyte dependent enteropathy in murine *Trichinella spiralis* infection. *Parasite Immunology*. 14, 217-225.

Gay NJ, Gangloff M (2007). Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 141–165.

Gebreselassie NG, Moorhead AR, Fabre V, Gagliardo LF, Lee NA, Lee JJ, Appleton JA (2012). Eosinophils preserve parasitic nematode larvae by regulating local immunity. *J. Immunol.* 188: 417–425.

Gerbe F, Sidot E, Smyth DJ, Ohmoto M, Matsumoto I, Dardalhon V, Cesses P, Garnier L, Pouzolles M, Brulin B, Bruschi M, Harcus Y, Zimmermann VS, Taylor N, Maizels RM, Jay P (2016). Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature*. 529, 226–230.

Godoy JM, Codina AV, Kopp G, Vasconi MD, Di Masso RJ, Hinrichsen LI (2014). Variación de los niveles séricos de interleuquinas (IL) durante la primoinfección con *Trichinella spiralis* (Ts) en ratones CBI-IGE susceptibles y resistentes al parásito. XVI Congreso y XXXIV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, Rosario.

Gonzalez Prous C, Gatti G, Ribicich MM, Pasqualetti M, Rosa A, Krivokapich SJ (2011). Estudio de la capacidad reproductiva de *Trichinella* T12. I Congreso Internacional de Zoonosis y Enfermedades Emergentes–VII Congreso Argentino de Zoonosis, Buenos Aires, Argentina. V92-29119. p. 223.

Gottstein B, Pozio E, Nöckler K. (2009). Epidemiology, diagnosis, treatment and control of trichinellosis. *Clinical microbiology reviews*. 22(1), 127-145.

Gould SE (1970). *Trichinosis in man and animals*. Edit. S.E. Gould y publicado por C.C. Thomas, Florida, U.S.A.

Grencis RK (1982). Immunity to *Trichinella spiralis*. Ph.D. thesis, University of Glasgow.

Grove D, Hamburger J, Warren K (1977). Kinetics of immunological responses, resistance to reinfection, and pathological reactions to infection with *Trichinella spiralis*. J. Infect. Dis. 136,562-570

Guide for the care and use of laboratory animals (2011). Institute of Laboratory Animal Research. National Research Council. USA. 8th ed. National Academy Press, Washington.

Guidelines on choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research, teaching and testing (1998). Canadian Council on Animal Care.

Gurish MF, Bryce PJ, Tao H, Kisselgof AB, Thornton EM, Miller HR, Friend DS, Oettgen HC (2004) IgE enhances parasite clearance and regulates mast cells responses in mice infected with *Trichinella spiralis*. Journal of Immunology 171: 1139-1145.

Hamada A, Watanabe N, Kobayashi A (1992). Occurrence and characteristics of hypodense eosinophils in rats infected with *Trichinella spiralis*. Parasite Immunol. 14, 503-512.

Harkness JE, Turner PV, VandeWoude S, Wheeler CL (2010). Harkness and Wagner's Biology and Medicine of Rabbits and Rodents, 5th ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell.

Hart BL (1988). Biological basis of the behavior of sick animals. Neurosci. Biobehav. Rev. 12, 123-137.

Hasnain SZ, Wang H, Ghia JE, Haq N, Deng Y, Velcich A, Grecis RK, Thornton DJ, Khan WI (2010). Mucin gene deficiency in mice impairs host resistance to an enteric parasitic infection. Gastroenterology. 138, 1763–1771.

Hasnain SZ, Evans CM, Roy M, Gallagher AL, Kindrachuck KN, Barron L, Dickey BF, Wilson MS, Wynn TA, Grecis RK, Thornton DJ (2011). Muc5ac: a critical component mediating the rejection of enteric nematodes. J. Exp. Med. 208, 893–900.

- Hinrichsen LI, Di Masso RJ (2010). Use of a Murine Model Original of Argentina to Characterize Complex Phenotypes. *Journal of Basic and Applied Genetics*, 21, 1-12.
- Hoff J (2000). Methods of Blood Collection in the Mouse. *Lab Animal* Volume 29, No. 10.
- Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, Kay AK, Rothenberg ME (2008). Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy*. 38: 709–750.
- Ilic N, Gruden-Movsesijan A, Lofronic-Milosavljevic L (2012). *Trichinella spiralis*: shaping the immune response. *Immunologic Research*, 52(1-2), 111–119.
- Jung Y, Rothenberg ME (2014). Roles and Regulation of Gastrointestinal Eosinophils in Immunity and Disease. *The Journal of Immunology*, 193(3), 999–1005.
- Kamal M, Wakelin D, Mahida Y (2001). Mucosal responses to infection with *Trichinella spiralis* in mice. *Parasite*. 8, S110-S113.
- Kapel CMO (2000). Host diversity and biological characteristics of the *Trichinella* genotypes and their effect on transmission. *Vet. Parasitol.* 93:263-278.
- Kapel CMO, Gamble HR (2000). Infectivity, persistence, and antibody response to domestic and sylvatic *Trichinella* spp. in experimentally infected pigs. *International Journal for Parasitology*. 30(2), 215-221.
- Kapel CMO (2001). Sylvatic and domestic *Trichinella* spp. in wild boars; infectivity, muscle larvae distribution, and antibody response. *Journal of Parasitology* 87, 309–314.
- Kobets T, Havelková H, Grekov I, Volkova V, Vojtíšková J, Slapničková M, Kurey I, Sohrabi Y, Svobodová M, Demant P, Lipoldová M (2012). Genetics of Host Response to *Leishmania tropica* in Mice—Different Control of Skin Pathology, Chemokine Reaction, and Invasion into Spleen and Liver. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6, e1667.

- Koedel U, Angele B, Rupprecht T, Wagner H, Roggenkamp A, Pfister HW, Kirschning CJ (2003). Toll-like receptor 2 participates in mediation of immune response in experimental pneumococcal meningitis. *J. Immunol.* 170:438–444.
- Kristian SA, Lauth X, Nizet V, Goetz F, Neumeister B, Peschel A, Landmann R (2003) Alanylation of teichoic acids protects *Staphylococcus aureus* against Toll-like receptor 2-dependent host defense in a mouse tissue cage infection model. *J. Infect. Dis.* 188:414–423.
- Krivokapich SJ, Molina V, Bergagna HFJ, Guarnera EA (2006). Epidemiological survey of *Trichinella* infection in domestic, synanthropic and sylvatic animals Argentina. *J. Helminthol.* 80, 267–269.
- Krivokapich SJ, González Prous CL, Gatti GM, Confalonieri V, Molina V, Matarasso H, Guarnera E (2008). Molecular evidence for a novel encapsulated genotype of *Trichinella* from Patagonia, Argentina. *Vet. Parasitol.* 156, 234–240.
- Krivokapich SJ, Pozion E, Gatti GM, Prous CLG, Ribicich M, Marucci G, La Rosa G, Confalonieri V (2012). *Trichinella patagoniensis* n. sp. (Nematoda), a new encapsulated species infecting carnivorous mammals in South America. *Int. J. Parasitol.* 42, 903–910.
- Krivokapich SJ, González Prous CL, Gattia GM, Saldia L (2015). First finding of *Trichinella pseudospiralis* in the Neotropical región. *Veterinary Parasitology*, 208(3-4): 268-271.
- Krivokapich SJ, Gatti GM, González Prous CL, Degese MF, Arbusti PA, Ayesa GE, Vera Bello G, Salomón MC (2019). Detection of *Trichinella britovi* in pork sausage suspected to be implicated in a human outbreak in Mendoza, Argentina. *Parasitology International*, 71: 53-55.
- Kutzer MAM, Armitage SAO (2016). Maximising fitness in the face of parasites: a review of host tolerance. *Zoology.* 119(4):281-9.
- La Rosa G, Marucci G, Zarlenga DS, Casulli A, Zarnke RL, Pozio E (2003). Molecular identification of natural hybrids between *Trichinella nativa* and *Trichinella* T6 provides evidence of gene flow and ongoing genetic divergence. *Int. J. Parasitol.* 33:209-216.

Lawrence CE, Paterson JCM, Higgins LM, MacDonald TT, Kennedy MW, Garside P (1998). IL-4 regulated enteropathy in an intestinal nematode infection. *European Journal of Immunology*. 28, 2672-2684.

Lee TDG, Wakelin D (1982). The use of host strain variation to assess the significance of mucosal mast cells in the spontaneous cure response of mice to the nematode *Trichuris muris*. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 67: 302-305.

Licona-Limón P, Henao-Mejia J, Temann AU, Gagliani N, Licona-Limón I, Ishigame H, Hao L, Herbert DR, Flavell RA (2013). Th9 cells drive host immunity against gastrointestinal worm infection. *Immunity* 39, 744–757.

Longley R, Smith C, Fortin A, Berghout J, McMorran B, Burgio G, Foote S, Gros P (2011). Host Resistance to Malaria: Using Mouse Models to Explore the Host Response. *Mammalian Genome*, 22, 32-42.

Luebke RW (2007). Nematodes as host resistance models for detection of immunotoxicity. *Methods* 41: 38-47.

Magnaval JF, Leclerc C (2000). Actualité de la trichinellose: Les épidémies de février et d'octobre 1998 dans la région midi-Pyrénées. *Revue Française des Laboratoires*, janvier/février, N° 3 19.

Manson-Smith DF, Bruce RG, Parrott DMV (1979). Villous Atrophy and Expulsion of Intestinal *Trichinella spiralis* Are Mediated by T Cells. *Cellular Immunology*. 47, 285-292.

Mayer HF (1984). *Bromatología. Higiene y Control de Alimentos*. Tomo 1. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Nordeste, pp 199-206.

McGuckin MA, Linden SK, Sutton P, Florin TH (2011). Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat Rev Microbiol*. 9: 265– 278

McRae KM, Stear MJ, Good B, Keane OM (2015). The host immune response to gastrointestinal nematode infection in sheep. *Parasite Immunology*. 37, 605–613.

Meagher S (1998). Physiological Responses of Deer Mice (*Peromyscus maniculatus*) to Infection with *Capillaria hepatica* (Nematoda). *The Journal of Parasitology*, 84(6), 1112.

Morales-Montor J, Chavarria A, De León MA, Del Castillo LI, Escobedo EG, Sanchez EN, Vargas E, Hernández Flores J, Romo-González T, Larralde C (2004). Host gender in parasitic infections in mammals: an evaluation of the female host supremacy paradigm. *Journal of Parasitology* 90: 531-546.

Murrell KD, Lieby DA, Duffy C, Schad GA (1985). Susceptibility of domestic swine to wild animal isolates of *Trichinella spiralis*. In: ICT6 Trichinellosis (C.W. Kim, ed.), pp. 301–305. Albany: The State University of New York Press.

Murrell KD, Lichtenfels RJ, Zarlenga DS, Pozio E (2000). The systematics of the genus *Trichinella* with a key to species. *Veterinary Parasitology* 93: 293-307.

Nagano I, Wu Z, Matsuo A, Pozio E, Takahashi Y (1999). Identification of *Trichinella* isolates by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial cytochrome c-oxidase subunit I gene1. *International journal for parasitology*. 29(7), 1113-1120.

National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>

Navone G, Achinelly MF, Notarnicola J, Lorena Zonta M (2017). Capítulo 9: *Phylum Nematoda* en Libros de cátedra: Macroparásitos. Diversidad y Biología. Universidad Nacional de la Plata. Editorial de la Universidad de la Plata. 1, 128-156.

Netea MG, Sutmuller R, Hermann C, Van der Graaf CAA, Van der Meer JWM, Adema G, Kullberg BJ (2004). Toll-like receptor 2 inhibits cellular responses against *Candida albicans* through pathways mediated by IL-10 and CD4₊CD25₊ regulatory T cells. *J. Immunol.* 172:3712–3718.

O'Connell AE, Hess JA, Santiago GA, Nolan TJ, Lok JB, Lee JJ, Abraham D (2011). Major basic protein from eosinophils and myeloperoxidase from neutrophils are required for protective immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice. *Infect. Immun.* 79: 2770–2778.

Oltean M, Gavrea R, Dumitrache M, Bagut T, Gherman C, Cozma V, Gyorko A (2012). Characterization of host-parasite interactions during the experimental *Trichinella spiralis* infection in pigs. *Helminthologia* 49, 139–146.

Orozco N, Oyarzabal MI (2014). Curvas de crecimiento en ratones CF1 seleccionados para alto peso. Trabajo presentado en forma de póster en XV Jornadas de Divulgación Científico Técnicas y II Jornada Latinoamericana. Facultad de Cs. Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario. Casilda.

Orozco N, Oyarzabal MI (2015). Curvas de crecimiento de ratones CF1 seleccionados para bajo peso. Trabajo presentado en forma de póster en el XVII Congreso y XXXV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario.

Orozco N, González Beltrán S, Giudici C, Oyarzabal MI (2018). Resistencia y tolerancia a oxiuros en cuatro líneas de ratones seleccionados por peso. *InVet.*, 20 (1-2): 233-240.

Ortega-Pierres MG, Yopez-Mulia L, Homan W, Gamble HR, Lim PL, Takahashi Y, Wassom DL, Appleton JA (1996). Workshop on a detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: a platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. *Parasite Immunology* 18, 273–284.

Oyarzabal MI, Rabasa S (1995). Selección divergente de peso en ratones con alta endocría seguida de 90 generaciones de cría libre. *Mendeliana* 10(2): 119 - 132.

Oyarzabal MI, Rabasa S (1999). Riqueza genética y estabilidad en ratones de la cepa CF1. *Mendeliana* 13(2): 74 - 84.

Oyarzabal M (2006). Long-term selection of body weight in mice. *Actas 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*. Belo Horizonte. 259.

Parasuraman S, Reveendran R, Kesavan R (2010). Blood sample collection in small laboratory animals. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*. July-December. Vol 1. Issue 2.

Pasqualetti M, Acerbo M, Miguez M, Rosa A, Fariña F, Cardillo N, Degregorio OJ, Ribicich M (2014). Nuevos aportes al conocimiento de *Trichinella* y trichinellosis. *Rev Med Vet (Buenos Aires)*. 95 (2):12 - 21.

Pasqualetti MI, Fariña FA, Krivokapich SJ, Gatti GM, Daneri GA, Varela EA, Lucero S, Ercole ME, Bessi C, Winter M, Ribicich MM (2018). *Trichinella spiralis* in a South American sea lion (*Otaria flavescens*) from Patagonia, Argentina. *Parasitology Research*, 117: 4033-4036.

Pawlowski ZS (1983). Clinical aspects in man, In *Trichinella and trichinellosis.*, W.C. Campbell, ed. (New York: Plenum Press).

Peters LL, Robledo RF, Bult CJ, Churchill GA, Paigen BJ, Svenson KL (2007). The Mouse as a Model for Human Biology: A Resource Guide for Complex Trait Analysis. *Nature Reviews Genetics*, 8, 58-69.

Pozio E, La Rosa G, Rossi P, Murrell KD (1992). Biological characterizations of *Trichinella* isolates from various host species and geographic regions. *Journal of Parasitology* 78, 647–653.

Pozio E, La Rosa G, Serrano FJ, Barrat J, Rossi L (1996). Environmental and human influence on the ecology of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* in western-Europe. *Parasitology*. 113: 527-533

Pozio E, Owen IL, La Rosa G, Sacchi L, Rossi P, Corona S (1999). *Trichinella papuae* n.sp. (Nematoda), a new non-encapsulated species from domestic and sylvatic swine of Papua New Guinea. *Int J Parasitol.* 29:1825–1839.

Pozio E. (2000) Factors affecting the flow among domestic, synanthropic and selvatic cycles of *Trichinella*. *Veterinary Parasitology* 93:241-262.

Pozio E, La Rosa G (2000). *Trichinella murrelli* n. sp: Etiological agent of sylvatic trichinellosis in temperate areas of North America. *Journal of Parasitology.* 86: 134-139

Pozio E (2001). New patterns of *Trichinella* infection. *Vet. Parasitol.* 98, 133–148

Pozio E, Casulli A, Bologov VV Marucci G, La Rosa G (2001). Hunting practices increase the prevalence of *Trichinella* infection in wolves from European Russia. *J. Parasitol.* 87:1498-1501.

Pozio E, Foggin CM, Marucci G, La Rosa G, Sacchi L, Corona S, Rossi P, Mukaratirwa S (2002). *Trichinella zimbabwensis* n. sp. (Nematoda), a new non-encapsulated species from crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in Zimbabwe also infecting mammals. *International Journal for Parasitology* 32, 1787–1799.

Pozio E (2005). The broad spectrum of *Trichinella* hosts: from cold-to warmblooded animals. *Veterinary parasitology*. 132(1-2), 3-11.

Pozio E, Zarlenga D S (2005). Recent advances on the taxonomy, systematics and epidemiology of *Trichinella*. *International journal for parasitology*. 35(11-12), 1191-1204.

Pozio E, Murrell KD (2006). Systematics and epidemiology of *Trichinella*. *Advances in parasitology*. 63, 367-439.

Pozio E (2007a). Taxonomy, biology and epidemiology of *Trichinella* parasites.

Pozio E (2007b). World distribution of *Trichinella* spp. infections in animals and humans. *Vet. Parasitol.* 149:3–21

Pozio E, Zarlenga DS (2013). New pieces of the *Trichinella* puzzle. *International journal for parasitology*. 43(12-13), 983-997.

Quesniaux VF, Fremond C, Jacobs M, Parida S, Nicolle D, Yeremeev V, Bihl F, Erard F, Botha T, Drennan MB, Soler MN, Le Bert M, Schnyder B, Ryffel B (2004). Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes Infect.* 6:946–959.

Råberg L, Graham AL, Read AF (2009). Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 364, 37–49

Reichels I (1955). Histologische Studien zu den Problemen der Zellkonstanz: Untersuchungen zur Mikroskopischen Anatomie im Lebenszyklus von *Trichinella spiralis*. *Zentralblatt Bakteriol.* 163, 46–84.

Reinhard EG (1958). Landmarks of Parasitology. II. Demonstration of the Life Cycle and Pathogenicity of the Spiral Threadworm. *Experimental Parasitology* 7, 108-123.

Reiterová K, Antolová D, Hurníková Z (2009). Humoral immune response of mice infected with low doses of *Trichinella spiralis* muscle larvae. *Veterinary Parasitology* 159: 232-235.

Resolución 740/99. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria SENASA. <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/55000-59999/58801/norma.htm>

Ribicich M, Gamble HR, Rosa A, Bolpe J, Franco A (2005). Trichinellosis in Argentina: An historical review. *Veterinary Parasitology*. 132, Pp 137 – 142.

Ribicich M, Rosa A, Bolpe J, Scialfa E, Cardillo N, Pasqualetti MI, Betti A, Fariña F, Vizio E, Gimenez R, Pascual G, Borrás P, Aronowicz T (2010a). Avances en el estudio del diagnóstico y la prevención de la trichinellosis. Jornadas de la Asociación Argentina de Parasitología Veterinaria. XIX Encuentro Rioplatense de Veterinarios Endoparasitólogos. Mar del Plata, Argentina.

Ribicich M, Gamble HR, Bolpe J, Scialfa E, Krivokapich S, Cardillo N, Betti A, Cambiaggi Holzmán ML, Pasqualetti M, Fariña F, Rosa A (2010b). *Trichinella* infection in wild animals from endemic regions of Argentina. *Parasitol Res*. 107:377-380.

Ribicich M, Krivokapich S, Pasqualetti M, Prous CG, Gatti GM, Falzoni E, Aronowicz T, Arbusti P, Farina F, Rosa A (2013). Experimental infection with *Trichinella* T12 in domestic cats. *Veterinary parasitology*. 194(2-4), 168-170.

Rivera-Ortiz CL, Nussenzweig R (1976). *Trichinella spiralis*: Anaphylactic antibody formation and susceptibility in strains of inbred mice. *Exp Parasitol* 39: 7 – 17.

Robinson M, Wahid F, Behnke JM, Gilbert FS (1989). Immunological relationships during primary infection with *Heligmosomoides polygyrus* (*Nematosporoides dubius*): dose-dependent expulsion of adult worms. *Parasitology*, 98, 1-5.

Rodríguez H, Noemí I, Cerva JL, Espinoza-Navarro O, Castro ME, Castro M (2011). Análisis Paleoparasitológico de la musculatura esquelética de la momia del Cerro el Plomo, Chile: *Trichinella* spp. *Revista de Antropología Chilena*, Volumen 43 Número Especial 1. Páginas 581-588 Chungara.

Ruitenbergh EJ, Elgersma A, Kruizinga W, Leenstra F (1977). *Trichinella spiralis* infection in congenitally athymic (nude) mice. Parasitological, serological and haematological studies with observations on intestinal pathology. *Immunology* 33, 581–587.

Sánchez VG (2009). Desarrollo de nuevos compuestos gemini con actividad antihelmíntica para aplicaciones veterinarias. Tesis presentada en la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral para la obtención del grado académico de Doctora en Ciencias Biológicas.

Santamarina MT, Leiro J, Garrido ML, Sanmartín S, Ubeira FM (1988). The effect of the intestinal worms and migrating L1 larvae of *Trichinella spiralis* on the production of antiparasitic IgE antibodies. *Parasitology Research*, 74: 581-585.

Sharma R, Thompson PC, Hoberg EP, Scandrett WB, Konecsni K, Harms NJ, Kukka PM, Jung TS, Elkin B, Mulders R, Larter NC, Branigan M, Pongracz J, Wagner B, Kafle P, Lobanov VA, Rosenthal BM, Jenkins EJ (2020). Hiding in plain sight: discovery and phylogeography of a cryptic species of *Trichinella* (Nematoda: Trichinellidae) in wolverine (*Gulo gulo*). *International Journal for Parasitology* 50. 277–287

Sing A, Rost D, Tvardovskaia N, Roggenkamp A, Wiedemann A, Kirschning CJ, Aepfelbacher M, Heesemann J (2002). Yersinia V-antigen exploits Toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin-10-mediated immunosuppression. *J. Exp. Med.* 196:1017–1024.

Sokal RR, Rohlf J (1979). *Biometría*. H. Blume Ed., Madrid.

SOP: Blood Collection in the Mouse, Intracardiac. (2017). University Veterinarian and reviewed by Virginia Tech IACUC.

Sorobetea D, Svensson-Frej M, Grecis R (2018). Immunity to gastrointestinal nematode infections. *Mucosal Immunology*. 11(2):304-315.

Soulsby EJ (1982). *Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals*. 7ma. Ed Baillie Tindall, pp. 330-333.

Takeuchi O, Hoshino K, Akira S (2000). TLR2-deficient and MyD88- deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus* infection. *J. Immunol.* 165:5392–5396.

Tolosa Palacios J, Chiaretta A, Lovera H (2006). El Parasitismo. Una asociación interespecífica. Universidad Nacional de Río Cuarto. 1ª ed.

Ullah MO, Sweet MJ, Mansell A, Kellie S, Kobe B (2016). TRIF-dependent TLR signaling, its functions in host defense and inflammation, and its potential as a therapeutic target. *Journal of Leukocyte Biology*. 100: 27-45.

Urb M, Sheppard DC (2012). The role of mast cells in the defence against pathogens. *PLoS Pathog*. 8: e1002619

Vasconi MD, Malfante P, Bassi A, Giudici C, Revelli S, Di Masso R, Font MT, Hinrichsen L (2008). Phenotypic differences on the outcome of the host-parasite relationship: behaviour of mice of the CBI stock in natural and experimental infections. *Veterinary Parasitology* 153: 157-163.

Vasconi MD, Bertorini G, Codina AV, Indelman P, Di Masso RJ, Hinrichsen LI (2015). Phenotypic Characterization of the Response to Infection with *Trichinella spiralis* in Genetically Defined Mouse Lines of the CBI-IGE Stock. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 5, 111-122

Vallance B, Mstthaei S, Sanovici I, Young I, Collins S (2000). Interleukin-5 deficient mice exhibit impaired host defence against challenge *Trichinella spiralis* infection. *Parasite. Immunol.*, 22, 487-492.

Vilella JB (1970). Life cycle and morphology. *Trichinosis in man and animals*, 19.

Wahid FN, Behnke JM (1993). Immunological relationships during primary infection with *Heligmosomoides polygyrus*. Regulation of fast response phenotype by H-2 and non-H2 genes. *Parasitology*; 107: 343-350.

Wakelin D, Wilson MM (1977). Transfer of immunity to *Trichinella spiralis* in the mouse with mesenteric lymph node cells: time of appearance of effective cells in donors and expression of immunity in recipients. *Parasitology*, 74(03), 215.

Wakelin D (1980). Genetic control of immunity to parasites. Infection with *Trichinella spiralis* in inbred and congenic mice showing rapid and slow responses to infection. *Parasite Immunology*, 2, 85-98.

Wakelin D, Donachie AM (1983). Genetic control of immunity to *Trichinella spiralis*: Influence of H-2 linked genes on immunity to the intestinal phase of the infection. *Immunology* 48, 343-350.

Walls RS, Carter RL, Leuchars E, Davies AJS (1973). The immunopathology of trichiniasis in T-cell deficient mice. *Clin. Exp. Immunol.* 13, 231–242.

Yu YR, Deng MJ, Lu WW, Jia MZ, Wu w, Qi YF (2013). Systemic cytokine profiles and splenic toll-like receptor expression during *Trichinella spiralis* infection. *Experimental Parasitology* 134, 92–101.

Zampini OA (1986). CEPANZO. Comunicación personal.

Zarlenga DS, Chute MB, Martin A, Kapel CM (1999). A multiplex PCR for unequivocal differentiation of all encapsulated and non-encapsulated genotypes of *Trichinella*. *Int. J. Parasitol.* 29, 1859–1867.

Zeller JC, Panoskaltsis-Mortari A, Murphy WJ, Ruscetti FW, Narula S, Roncarolo MG, Blazar BR (1999). Induction of CD4₊ T cell alloantigen specific hyporesponsiveness by IL-10 and TGF- β . *J. Immunol.* 163: 3684–3691.