



Variabilidad de la interacción parásito-hospedador de diferentes genotipos *Mus musculus* al desafío experimental con *Trichinella spiralis*

González Beltrán, S.^{1,2,4*} ; Orozco, N.² ; Coscelli, G.³ ; Villanueva, P.² ; Oyarzabal, M.I.² ; Giudici, C.^{1,4} 

¹Laboratorio de Trichinellosis. ²Centro de Investigación con Animales de Laboratorio (CIAL). ³Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario, Ov. Lagos y Ruta 33, Casilda (2170), Argentina. Tel: +54 (03464) 420077. ⁴CIC-UNR, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Maipú 1065, Rosario (2000), Argentina. Tel: +54 (0341) 4201243.

 gonzalezbeltransilvina@fcv.unr.edu.ar

Resumen

La interacción parásito-hospedador es una relación compleja que determina el resultado de una infección. *Trichinella spiralis* es un nematodo que afecta a una amplia gama de animales, los que pueden transmitir la infección al humano. El estudio de la interacción con su hospedador es fundamental para obtener estrategias que permitan reducir esta parasitosis. El objetivo de esta investigación fue evaluar las potenciales diferencias en la interacción parásito-hospedador frente al desafío con *Trichinella spiralis* por parte de diferentes genotipos de hospedadores, conformados por cuatro líneas de ratones seleccionadas por peso y una línea testigo derivadas de la cepa CF1 (*s*, *h*, *s'*, *h'* y *t*, respectivamente). Fueron infectados ratones macho de las líneas con una dosis de 400 larvas musculares. El índice de expulsión, a los 15 días posinfección, demostró que la línea *t* fue la más eficiente, mientras que la línea *h* fue la más ineficiente en este proceso, al presentar el mayor número de gusanos adultos en el intestino. En la etapa crónica de la infección, el número de larvas musculares enquistadas (carga parasitaria relativa) fue significativamente mayor en la línea liviana *h*, y menor en *t* y *h'*, mostrando diferencias en la interacción entre las líneas. La evaluación de los cambios histopatológicos del duodeno también mostró diferencias entre las líneas estudiadas. Esta variabilidad hallada 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.

Palabras clave: *Trichinella spiralis*, ratones, selección, peso, variabilidad genética, susceptibilidad.

Variability in parasite–host interactions among different *Mus musculus* genotypes experimentally challenged with *Trichinella spiralis*

Abstract. Parasite-host interaction is a complex relationship that determines the outcome of infection. *Trichinella spiralis* is a nematode that affects a wide range of animals and can transmit infection to humans. Studying its interaction with the host is essential for developing strategies to reduce the impact of this parasitosis. The aim of this study was to evaluate potential differences in parasite-host interaction in response to a *Trichinella spiralis* challenge among different host genotypes, consisting of four mouse lines selected by body weight and a control line derived from the CF1 strain (*s*, *h*, *s'*, *h'*, and *t*, respectively). Male mice from the lines were infected with a dose of 400 muscle larvae. The expulsion index at 15 days post-infection indicated that the *t* line was the most efficient, whereas the *h* line was the least efficient in this process, showing the highest number of adult worms in the intestine. In the chronic stage of infection, the number of encysted muscle larvae (relative parasitic load) was significantly higher in the light *h* line and lower in the *t* and *h'* lines, indicating differences in the host-parasite interaction among the genotypes. Histopathological evaluation of the duodenum also revealed differences among the studied lines. The observed variability may result from the systematic process of phenotypic artificial selection for body weight, along with dispersive effects - such as the founder effect and genetic drift - associated with the low effective population size.

Key words: *Trichinella spiralis*, mice, selection, weight, genetic variability, susceptibility.

INTRODUCCIÓN

La interacción parásito-hospedador es una relación compleja que ha sido estudiada en modelos experimentales con nematodos y ratones. Los fenotipos de los hospedadores pueden mostrar respuestas de alta o baja eficiencia para controlar la infección parasitaria (Kobets et al. 2012, Filbey et al. 2014). Se ha demostrado que ratones consanguíneos responden de manera diferente a la infección experimental con un mismo parásito, como *Heligmosomoides polygyrus*, *Trypanosoma cruzi* (Vasconi et al. 2008) y *Trichinella spiralis* (Vasconi et al. 2015).

Esas diferentes respuestas pueden deberse a las estrategias del parásito y/o a la resistencia del hospedador. Esta última definida como la habilidad de reducir la carga parasitaria (resistencia cuantitativa) o la probabilidad de infección (resistencia cualitativa), y está relacionada inversamente con la carga parasitaria: a menor carga, mayor resistencia del hospedador, reflejando su capacidad inmunológica (Raberg et al. 2009, Kutzer y Armitage 2016).

La infección con *T. spiralis* comienza en la etapa intestinal al ingresar las larvas uno musculares (L1m) al sistema digestivo del hospedador y desarrollarse hasta llegar a los estadios adultos, cuando se produce la cópula. Las hembras paren larvas recién nacidas (Lrn) en la luz intestinal, etapa que dura de 1 a 2 semanas, dependiendo de la respuesta inmune del hospedador (Despommier 1993, Pasqualetti et al. 2014). Sólo las células de músculo estriado permiten la continuación del desarrollo del parásito, formando la “célula nodriza” (etapa de enquistamiento), complejo anatómicamente independiente y altamente especializado, que constituye la forma infectante para un nuevo hospedador (Pasqualetti et al. 2014). El número de larvas recuperadas de los músculos del hospedador y el índice de la capacidad reproductiva relativo (ICRr) (relación entre larvas en los músculos con la dosis infectiva) son medidas de la resistencia/susceptibilidad utilizadas en *T. spiralis* (Bell 1998, Reiterová et al. 2009). Sin embargo, estas medidas no evalúan los eventos intermedios del ciclo biológico del parásito, que incluye las etapas enteral, migratoria y parenteral (Despommier 1993).

Con el objetivo de analizar la resistencia/susceptibilidad en las distintas etapas del ciclo, se compararon las respuestas de diferentes genotipos de *Mus musculus* frente al desafío experimental con *T. spiralis*. Se desafiaron una línea testigo y dos pares de líneas de ratones seleccionadas en forma divergente por peso corporal a los 49 días de edad, todas descendientes de la cepa CF1, desarrolladas en el Centro de Investigación con Animales de Laboratorio (CIAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias - UNR, Argentina. Se ha demostrado que estas líneas difieren, entre otros caracteres, en su tolerancia y resistencia frente a infecciones naturales de *Syphacia obvelata* y *Aspiculuris tetraptera* (Orozco et al. 2018).

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales experimentales. A partir de una población de ratones descendientes de la cepa CF1 existente en la Facultad de Ciencias Veterinarias - UNR, Argentina, se formó una población testigo (*t*) sin selección de los

reproductores ($N_e \leq 40$). Con animales de las generaciones 2 y 8 de *t*, se fundaron dos pares de líneas de selección divergente por peso a los 49 días de edad: par *s* (*s'*: selección positiva, *s*: selección negativa) y par *h* (*h'*: selección positiva, *s*: selección negativa) en las cuales se practica endocria por limitación del número ($N_e \leq 8$) (Oyarzabal y Rabasa 1995, 1999). Como resultado de la presión de selección aplicada, las líneas de selección positiva pesan en promedio un 70% más que las líneas de selección negativa (Orozco et al. 2018). En este modelo se demostró que la selección por peso deterioró y disminuyó la estabilidad de caracteres no seleccionados relacionados con fertilidad, supervivencia, producción, crecimiento y resistencia a oxiuros (Bernardi et al. 1999, 2009, 2011, Oyarzabal 2011, Orozco et al. 2018). Los animales se separaron por sexo al destete y alojaron en cajas de polipropileno de 28x19x13,5 cm en una sala con temperatura constante (20 ± 2 °C), renovación de aire y ciclo de 12 h luz/12 h oscuridad. Se les suministró un alimento balanceado (GEPESA Feeds) y agua *ad libitum*. El manejo y cuidado de los animales sigue normas éticas internacionales (Garber et al. 2011). Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Ética mediante la Resolución 171/13 Expediente 004753.

Origen y mantenimiento de *T. spiralis*. En 2013, ingresaron al CIAL L1m de *T. spiralis* provenientes del Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas - UNR, Argentina, que fueran tipificadas como tales en el Departamento de Parasitología, ANLIS, Buenos Aires Argentina (Krivokapich, comunicación personal). Para obtener larvas infectivas de *T. spiralis*, se utilizaron músculos esqueléticos de ratones C57BL/6 infectados artificialmente. Después del sacrificio en cámara de CO₂ (AVMA 2020), los músculos se trituraron y se digirieron en una solución de agua destilada, pepsina de cerdo 1% P/V y ácido clorhídrico 1% V/V (Kapel y Gamble 2000), a 37-39 °C durante 90 minutos. Tras el filtrado y sedimentación, se recuperaron las larvas.

Infección de ratones. Cada ratón, de entre 100 y 120 días de vida, fue infectado con una dosis infectiva (DI) de 400 larvas L1m por vía oral utilizando una cánula bucoesofágica (Luebke 2007) ($n = 5$ por línea y tiempo de infección). Previamente, los ratones fueron desparasitados 10 días antes de la infección según lo indicado por Harkness et al. (2010) con febendazol al 10 % en el alimento para evitar la interferencia de otros endoparásitos con la infección artificial con *T. spiralis*. Los animales se observaron semanalmente para comprobar que no presentaran signos de enfermedad relacionados con distrés, cambios en el aspecto general, comportamiento y actitudes posturales asociadas al dolor (Garber et al. 2011), que determinarán la aplicación del “punto final humanitario” (Canadian Council on Animal Care 2022).

Las respuestas a la infección se estudiaron en las diferentes etapas del ciclo del parásito: etapa intestinal temprana a los 3 días postinfección (dpi), etapa intestinal tardía (15 dpi) y etapa de enquistamiento (60 dpi). Los animales fueron sacrificados al finalizar cada etapa por inhalación de CO₂ (AVMA 2020).

Variables parasitológicas

Etapa intestinal temprana. Para recuperar los parásitos adultos a los 3 dpi, cada intestino delgado fue diseccionado, abierto longitudinalmente y colocado en placas de Petri con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) (Sánchez 2009) durante 4 horas a 37 °C. Se retiraron los intestinos y el líquido resultante se conservó en alcohol al 70% para preservación de los ejemplares (Grencis 1982, Luebke 2007). Se registró el peso a la infección (P03) y al sacrificio (P3), y el número de gusanos de *T. spiralis* recuperados de cada ratón (NA3). Se evaluó el % de instalación como:

$\%I = (\overline{NA3} / DI) * 100$, porcentaje de larvas instaladas promedio por línea a los 3 dpi en relación a la dosis infectiva.

Etapa intestinal tardía. Con el mismo procedimiento realizado a los 3 dpi, se recuperaron los parásitos adultos a los 15 dpi. Se registró el peso a la infección (P015) y al sacrificio (P15), y el número de gusanos de *T. spiralis* recuperados de cada ratón (NA15). Se evaluó el % de expulsión mediante el índice que relaciona el número de adultos promedio encontrados en el intestino con la dosis infectiva (Wakelin 1980):

$\%I = (\overline{NA15} / DI) * 100$, porcentaje de expulsión de gusanos adultos a los 15 dpi en relación a la dosis infectiva.

Etapa parenteral. Enquistamiento. A los 60 dpi, se pesaron los ratones al desafío (P060) y al sacrificio (P60). Se diseccionaron y pesaron los diafragmas en gramos (PD), se seccionaron en pequeños trozos y se colocaron en líquido de digestión artificial (Kapel y Gamble 2000). Una vez digeridos, se descartó el sobrenadante y se contó el número de larvas en diafragma (NLD). Se calculó:

$CP = NLD / PD$, carga parasitaria relativa al peso del diafragma por ratón.

$ICR = \overline{CP} / DI$, índice de la capacidad reproductiva por línea.

El ciclo de vida de *T. spiralis* es un proceso continuo con etapas que se solapan entre sí y los ICR evalúan el resultado completo de este proceso desde la infección hasta el enquistamiento. Para discriminar lo que ocurre en el intermedio, se subdividió el período en dos etapas, la primera relacionando el día 15 con el día 3 que corresponde al índice de expulsión ya enunciado. Para la segunda, se construyeron nuevos índices que relacionaron el enquistamiento con la expulsión, es decir, la etapa parenteral:

$ICR15 = CP / \overline{NA15}$, índice de la capacidad reproductiva relativo al $\overline{NA15}$ por ratón.

Cuanto mayor es el ICR15, menor es la eficacia de la respuesta del hospedador para evitar de manera eficiente el enquistamiento.

Variables histopatológicas. Se extrajeron dos muestras transversales de 0,5 cm de longitud del duodeno de los mismos ratones utilizados en los estudios anteriores

y se compararon con animales controles no infectados en cada fase de la infección. Las muestras se fijaron en formol al 10% (V/V) y se procesaron rutinariamente para su inclusión en parafina. Se realizaron secciones de entre 2 y 3 μm del tejido en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE).

Para el estudio morfológico de las muestras, se tomó una fotografía por cada una de las dos secciones del duodeno. En cada sección se realizaron 10 mediciones de la longitud en μm de: glándula de Lieberkühn (G) y vellosidad (V); espesor de la lámina propia de la vellosidad a nivel de la base (B), a nivel del centro (C) y del ápice (A). Estas variables se midieron en los animales infectados (I) y en los animales controles (C) de cada una de las líneas.

Para eliminar el efecto del peso corporal sobre las mediciones anteriores, las longitudes promedio de todas las variables de los ratones infectados se relacionaron con los correspondientes promedios de los ratones controles, obteniéndose las longitudes relativas: $GR = \overline{GI} / \overline{GC}$, $VR = \overline{VI} / \overline{VC}$, $BR = \overline{BI} / \overline{BC}$, $CR = \overline{CI} / \overline{CC}$, $AR = \overline{AI} / \overline{AC}$, donde I: infectados, C: controles

Se realizó una comparación cualitativa de las alteraciones histopatológicas entre las líneas, mediante la evaluación de cambios como atrofia/fusión de vellosidades, infiltrados inflamatorios de la lámina propia y estado de las glándulas.

Análisis estadístico. En cada etapa de la infección por *T. spiralis*, se realizaron análisis de la variancia y pruebas de comparación de medias de Tukey-Kramer ($p < 0,05$), a fin de comprobar si el peso de los animales previo a la infección difería con el del sacrificio. Para el resto de las variables, en primer lugar, 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, 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 (Sokal y Rohlf 1979).

RESULTADOS

Establecimiento, expulsión y cargas parasitarias de *T. spiralis*. Los pesos medios de los ratones antes de la infección no difirieron significativamente de los registrados a los 3, 15 y 60 dpi ($p > 0,05$), dentro de cada línea. La excepción fue la línea *h*, en la que antes de cumplir los 60 dpi, se observó una disminución significativa del peso promedio, de aproximadamente un 22% (Tabla 1) respecto al peso pre-infección ($p < 0,05$), acompañada de signos de deterioro como pérdida de actividad, mal aspecto del manto y secreciones oculares. Debido a la signología y la caída del peso observada, se decidió aplicar un punto final humanitario entre los 45 y 55 dpi. Los valores de todas las variables presentados para esta línea corresponden al día en que fueron sacrificados.

Tabla 1. Peso corporal medio de los ratones pre y pi con *T. spiralis* a los 3, 15 y 60 dpi, por línea.

	<i>t</i>	<i>s</i>	<i>s'</i>	<i>h</i>	<i>h'</i>
P03 ± ES	36,5 ± 0,7	27,5 ± 0,7	51,9 ± 2,1	28,4 ± 1,0	55,7 ± 2,2
P3 ± ES	36,4 ± 0,9	27,4 ± 0,5	52,4 ± 2,5	29,0 ± 1,8	56,0 ± 2,4
P015 ± ES	37,5 ± 1,4	27,5 ± 1,7	51,9 ± 2,1	27,1 ± 1,2	55,1 ± 2,2
P15 ± ES	35,6 ± 1,1	28,1 ± 2,3	52,3 ± 2,1	27,0 ± 1,5	54,6 ± 1,8
P060 ± ES	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
P60 ± ES	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

t, s, s', h y h': líneas de ratones. P03, P015, P060, P3, P15, P60: pesos corporales medios (g) por línea pre y pi, respectivamente. ES: error estándar. Letras distintas por columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$). (*) Los promedios corresponden al día en el que se les aplicó el punto final humanitario.

No se encontraron diferencias significativas en el número medio de parásitos adultos por línea a los 3 dpi ($p > 0,05$), pero sí a los 15 dpi ($p < 0,05$). A partir de la dosis infectiva de 400 larvas musculares, el porcentaje de instalación en todas las líneas fue aproximadamente del 70% a los 3 dpi. La línea *t* mostró el menor número de

gusanos adultos en el intestino a los 15 dpi, lo que indicó el mayor %E. En contraste, la línea *h* presentó la mayor cantidad de parásitos, resultando en el menor %E. La carga de adultos intestinales fue similar para ambas líneas en el par *s*, pero no en el par *h* (Tabla 2).

Tabla 2. Número de adultos de *T. spiralis* en el intestino a los 3 y 15 dpi, proporción de larvas establecidas en el intestino a los 3 dpi y porcentaje de expulsión a los 15 dpi, por línea.

	<i>t</i>	<i>s</i>	<i>s'</i>	<i>h</i>	<i>h'</i>
$\overline{NA3} \pm ES$	280,6 ± 6,5	287,2 ± 5,9	287,4 ± 7,1	293,2 ± 5,4	278,2 ± 3,9
%I	70,1	71,1	71,9	73,3	69,6
$\overline{NA15} \pm ES$	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
%E	66,4	51,7	60,4	40,1	60,2

t, s, s', h y h': líneas de ratones. $\overline{NA3}$: Promedio del número de gusanos adultos a los 3 dpi por línea. %I: porcentaje de instalación a los 3 dpi. $\overline{NA15}$: promedio del número de gusanos adultos a los 15 dpi por línea. %E: porcentaje de expulsión de adultos a los 15 dpi. ES: error estándar. Letras distintas por fila indican diferencias significativas entre líneas ($p < 0,05$).

El número promedio de larvas en el diafragma difirió entre las líneas ($p < 0,05$). Las cargas relativas de larvas

enquistadas fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) en la línea *h* y menores en las líneas *t* y *h'* (Tabla 3).

Tabla 3. Cargas parasitarias relativas medias de larvas musculares e índices de la capacidad reproductiva relativa de *T. spiralis* a los 60 dpi, por línea.

	<i>t</i>	<i>s</i>	<i>s'</i>	<i>h</i> (*)	<i>h'</i>
$\overline{CP} \pm ES$	20.715 ± 616 ^a	25.046 ± 1.414 ^b	23.905 ± 411 ^{a,b}	31.325 ± 1.011 ^c	21.074 ± 754 ^a
ICR	51,8	62,6	59,8	78,3	52,7

t, s, s', h y h': líneas de ratones. \overline{CP} : número de larvas promedio por gramo de diafragma por línea. ES: error estándar. ICR=índice por la capacidad reproductiva por línea. Letras distintas por fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$). (*) Los valores corresponden al día en el que se les aplicó el punto final humanitario.

Como fue mencionado anteriormente, la línea *h* mostró la mayor carga parasitaria en el diafragma y la línea *t* la menor. Sin embargo, al ajustar esta carga relativa al número de adultos encontrados al día 15 dpi, la relación se invirtió. Específicamente, el número de larvas enquistadas en el diafragma por cada adulto presente en el intestino fue mayor en la línea *t* que en la línea *h* (Tabla 4).

Alteraciones histopatológicas. En los intestinos de los ratones se observó la estructura clásica de este órgano con mucosa, submucosa, capas musculares y revestimiento seroso.

El análisis comparativo de la longitud de las vellosidades y glándulas mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las líneas de ratones y sus controles. A los 15 dpi, las líneas *s'* y *h* evidenciaron una duplicación de la longitud relativa de la glándula en comparación con los controles. La línea *s'* también mostró una marcada disminución en la longitud de las vellosidades y un aumento en el espesor, indicando fusión. En contraste, las líneas *s* y *h'* presentaron cambios mínimos respecto a sus controles, reflejando una menor reacción inflamatoria (Tabla 5).

Tabla 4. Índice de la capacidad reproductiva relativo al número de adultos recuperados al día 15 dpi, por línea.

	<i>t</i>	<i>s</i>	<i>s'</i>	<i>h</i>	<i>h'</i>
$\overline{ICR15} \pm ES$	163,1 \pm 4,8 ^b	133,5 \pm 4,8 ^a	140,3 \pm 2,4 ^a	130,8 \pm 4,2 ^{a*}	136,1 \pm 4,9 ^a

t, *s*, *s'*, *h* y *h'*: líneas de ratones. $\overline{ICR15}$: índice de la capacidad reproductiva promedio relativo al NA15, por línea. ES: error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). (*) El valor corresponde al día en el que se les aplicó el punto final humanitario.

Tabla 5. Longitud de las glándulas y longitud y espesor de las vellosidades, relativas al promedio de los controles, por línea y tiempo de infección.

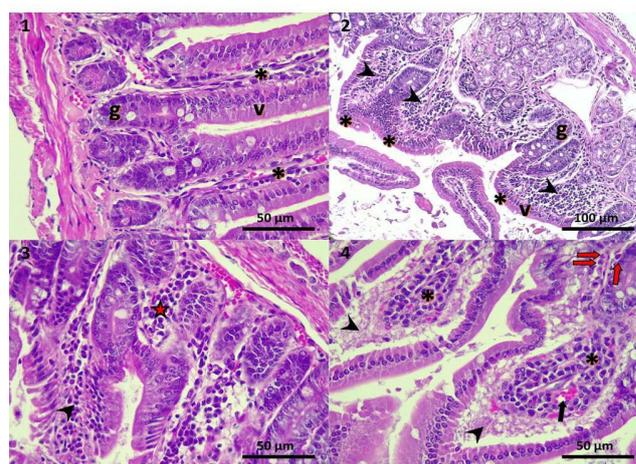
Líneas	----- 3 dpi -----					----- 15 dpi -----					----- 60 dpi -----				
	GR	VR	BR	CR	AR	GR	VR	BR	CR	AR	GR	VR	BR	CR	AR
<i>t</i>	1,25 ^{ab}	0,83 ^b	1,35 ^{ab}	1,34 ^b	1,51 ^a	1,48 ^b	0,82 ^{bc}	1,29 ^{ab}	1,37 ^{ab}	1,31 ^a	0,96 ^b	0,96 ^a	1,07 ^a	0,89 ^a	0,98 ^a
<i>s</i>	1,11 ^{ab}	1,05 ^c	0,96 ^a	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

GR, VR, BR, CR y AR: promedio de longitudes de las glándulas, altura de las vellosidades, espesor del ápice, espesor del centro y espesor de la base de las vellosidades con relación los promedios de las mismas variables en los animales controles, respectivamente. Letras distintas por columna indican diferencias significativas entre líneas ($p < 0,05$). (*) Los valores corresponden al día en el que se les aplicó el punto final humanitario.

Microscópicamente las líneas *t*, *s* y *h'* mostraron alteraciones similares. A los 15 dpi, los ratones presentaron ocasionalmente leve atrofia y fusión de vellosidades, junto con un discreto infiltrado inflamatorio (Figura 1), predominantemente linfoplasmocítico, con esporádicos polimorfonucleares (PMNs) diseminados en la lámina propia. La línea *s'* mostró un mayor grado de severidad en las lesiones. A los 3 y 15 dpi, se observaron áreas con moderada atrofia y fusión de vellosidades más pronunciadas que en las otras líneas (Figura 2) y se encontraron reactivas. A los 3 dpi, se detectó un leve infiltrado inflamatorio linfoplasmocítico en la lámina propia de las vellosidades e interglandular (Figura 3). En la línea *h* se observaron los mayores cambios histopatológicos. A los 3 dpi, las vellosidades presentaron leve atrofia y las glándulas estaban reactivas. A los 15 dpi, y en el momento del punto final humanitario, se observó descamación de células epiteliales de las vellosidades, glándulas reactivas y levemente hiperplásicas, junto con congestión y edema intersticial en la lámina propia, acompañado de un moderado infiltrado inflamatorio mixto con una alta densidad de PMNs (Figura 4). En todos los ratones evaluados, la densidad de células mucosas o de Goblet fue moderada, sin cambios significativos en su densidad relativa entre las líneas de ratones, tanto en los grupos seleccionados como en el grupo control. La densidad de células inflamatorias fue mayor en las vellosidades que en la región interglandular en las líneas seleccionadas. Los ratones controles no mostraron alteraciones microscópicas significativas en las secciones de intestino evaluadas.

DISCUSIÓN

La instalación de alrededor del 70% de la dosis infectiva de 400 larvas en todas las líneas demuestra no solo que la dosis suministrada por ratón fue homogénea, sino también que los cinco genotipos respondieron de la



Figuras 1 a 4. Microfotografías del duodeno de los ratones infectados con *Trichinella spiralis*. HE. **Figura 1.** Discreto infiltrado inflamatorio en la lámina propia de las vellosidades (*). g: glándula de Lieberkühn, v: vellosidad. **Figura 2.** Moderada atrofia y fusión de las vellosidades (*). Moderado infiltrado inflamatorio (puntas de flechas). **Figura 3.** Leve infiltrado inflamatorio en las vellosidades (punta de flecha) e interglandular (estrella). **Figura 4.** Moderado infiltrado inflamatorio mixto predominantemente linfoplasmocítico (*) con polimorfonucleares neutrofilos (flechas rojas), congestión (flecha) y edema intersticial (puntas de flechas).

misma manera en esta etapa (Tabla 2). Sin embargo, si se tiene en cuenta la clasificación empírica de las dosis infectivas de *T. spiralis* según la respuesta evidenciada en el hospedador en: 1) baja (50 a 100 larvas musculares), 2) intermedia (100 hasta la primera dosis letal) y 3) alta (rango letal) (Bell y Liu 1988), la dosis podría considerarse

como dosis intermedia para las líneas *t*, *s*, *s'* y *h'*, y alta para la línea *h*, dadas las alteraciones del estado sanitario observadas en los individuos.

Las diferencias en la relación parásito hospedador comenzaron a evidenciarse en la etapa de expulsión a los 15 dpi. La línea *t* mostró la mayor capacidad de expulsión (%E = 66,4), mientras que la línea *h* tuvo la menor (%E = 40,1), probablemente debido a diferentes respuestas inmunitarias. La infección con *T. spiralis* induce inicialmente una respuesta inmunitaria Th1, que se transforma en una respuesta Th2 protectora con la diseminación de las Lrn. Esta respuesta Th2 es crucial para la expulsión del parásito. Yu et al. (2013) observaron que en ratones C57BL/6 infectados con 400 larvas de *T. spiralis*, el IFN- γ aumenta durante la fase intestinal, favoreciendo una respuesta Th1. Cuando las Lrn comienzan su migración, se incrementa la IL4, estimulando la respuesta Th2. La ineficiencia de algunos ratones para expulsar a los adultos de *T. spiralis* podría deberse a una menor producción de IL4 o a una relación IFN- γ /IL4 mayor a 2 (Godoy et al. 2014). Los ratones *t* podrían haber tenido una mayor respuesta Th2 que los de las otras líneas durante la fase de expulsión, siendo esta respuesta menor en la línea *h*, lo que resultó en su ineficiencia para expulsar un número considerable de gusanos adultos a los 15 dpi.

Los ratones inmunológicamente normales pueden exhibir un patrón de expulsión de *T. spiralis* que está genéticamente determinado y varía entre genotipos (Wakelin 1980). En este caso, el par *h* presentó diferencias marcadas entre las líneas *h* y *h'* para la expulsión de los adultos en intestino, en contraposición a las líneas del par *s* que mostraron un comportamiento similar a los 15 dpi. La selección de peso modificó otros caracteres no seleccionados como se ha citado y también potencialmente la respuesta intestinal frente a *T. spiralis* en el par *h*, pero no así en el par *s*. Si bien este efecto podría deberse a una respuesta correlacionada a la selección practicada, también podría atribuirse a procesos dispersivos asociados al bajo tamaño efectivo de las poblaciones estudiadas.

Según los ICR estimados, las hembras parásitas produjeron, en promedio, entre 50 y 78 larvas cada una (Tabla 3), lo que sugiere diferencias reproductivas del parásito entre los genotipos murinos. La *h* mostró la respuesta más débil a la infección, evidenciada por la mayor carga muscular relativa, un deterioro en su estado de salud y la necesidad de aplicar el punto final humanitario. En contraste, las líneas *t* y *h'* mostraron los valores más bajos tanto de larvas en los músculos como de ICR, lo que sugiere una respuesta más robusta a la parasitosis en comparación con las demás líneas. Estos hallazgos, que evidencian diferencias genotípicas en la respuesta a la infección, se alinean con otras investigaciones sobre distintas cepas murinas, como los ratones con baja y alta respuesta de IgE. Watanabe (2023) demostró que la herencia de la respuesta de IgE influye en la susceptibilidad a *T. spiralis*, de modo que una baja respuesta de IgE se asocia con mayor susceptibilidad y mayor carga parasitaria muscular, mientras que una alta respuesta de IgE se relaciona con una menor susceptibilidad y una menor carga muscular. Estos estudios concluyen que la respuesta de IgE es un rasgo genético relacionado con la susceptibilidad

a *T. spiralis*. Esta relación podría, en parte, explicar las diferencias observadas en las cargas parasitarias entre las líneas murinas evaluadas en nuestro estudio, sugiriendo que la variabilidad genética en la respuesta inmunológica, posiblemente asociada a la producción de IgE, podría ser un factor clave en las diferencias de susceptibilidad que documentamos.

Al considerar la dosis administrada en relación con el peso de los ratones, los animales de las líneas livianas recibieron una mayor cantidad de larvas infectivas por gramo de peso corporal con respecto a las pesadas. Sin embargo, los pares de líneas de selección divergente mostraron diferencias en las cargas parasitarias por peso del diafragma. A pesar de que *s* recibió una dosis más alta por gramo de peso corporal que la línea pesada *s'*, no se observaron diferencias significativas en la carga parasitaria en el diafragma de ambas líneas. Contrariamente, las líneas del par *h* difirieron entre sí en las cargas parasitarias, lo que subraya que, a pesar de que el criterio de selección por peso fue el mismo en cada par, los pares de líneas exhibieron respuestas distintas al mismo estímulo, indicando interacciones parásito hospedador diferentes.

La línea *t* fue la más eficiente en expulsar a los nematodos del intestino evidenciado en un *ICR15* mayor, lo que manifiesta una menor eficiencia de esta línea para controlar el enquistamiento de las larvas que alcanzaron las células musculares. Ello podría deberse a la mayor efectividad en la respuesta Th2 para expulsar a los adultos del intestino (Yu et al. 2013), pero esta respuesta no condicionaría la capacidad de los individuos de poder controlar la etapa muscular de la infección. Las otras líneas mostraron un comportamiento significativamente similar en el *ICR15*, lo que marcaría la relevancia, al menos en este estudio, de la fase de expulsión en el resultado final de la enfermedad.

La evaluación histopatológica del duodeno en las diferentes líneas de ratones infectados con *T. spiralis* reveló cambios que ayudan a entender las diferencias en resistencia y tolerancia a la infección. Las líneas *t*, *s* y *h'* mostraron cambios histopatológicos más leves, a pesar de que la línea *t* tuvo la expulsión más eficiente de los parásitos a los 15 dpi. Este resultado sugiere que la eficiencia de la expulsión no está necesariamente relacionada con la magnitud de la inflamación histopatológica, coincidiendo con estudios que indican que factores como la actividad de citoquinas IL4 y TNF- α no son imprescindibles para la expulsión (Lawrence et al. 1998).

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 con relación a los controles (1,90) y una atrofia de las vellosidades del 40% (0,6) (Tabla 4). Estas diferencias histopatológicas no mostraron asociación con el porcentaje de expulsión observado, ya que esta línea tuvo valores de expulsión a los 15 dpi 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 debido a que la línea *s'* tuvo mayor reacción histopatológica que la línea *t*, pero menor porcentaje de expulsión. Lo contrario fue observado por Fariña et al. (2020), quienes infectaron

ratones BALB/c con 500 L1m y observaron reacciones inflamatorias intestinales intensas con un porcentaje de expulsión de alrededor del 75% a los 15 dpi.

La línea *h* presentó una reacción inflamatoria exacerbada a los 15 dpi y al momento del punto final humanitario, lo que contrasta con estudios previos que asociaron menor inflamación con menor índice de expulsión (Lawrence et al. 1998). Este comportamiento podría estar relacionado con una respuesta Th2 más intensa, potencialmente influenciada por la dosis más alta de infección administrada a esta línea, como sugirieron Bell y Liu (1988) y Dehlawi y Wakelin (2002).

En todas las líneas, excepto en la línea *h*, la arquitectura histológica del duodeno se recuperó a los 60 dpi, indicando una capacidad de resolución de la inflamación. La persistencia de la inflamación en la línea *h* al punto final humanitario destaca su susceptibilidad y una respuesta inflamatoria más prolongada.

Finalmente, aunque las líneas seleccionadas mostraron distintas respuestas inflamatorias e histopatológicas en el intestino tras el desafío con *T. spiralis*, la magnitud de estos cambios no siempre se correlacionó con la eficiencia de la expulsión de los parásitos. Estos resultados subrayan la complejidad de la interacción cuando se comparan diferentes genotipos y la necesidad de considerar múltiples factores al evaluar la resistencia y tolerancia a infecciones parasitarias. En contraste, estudios en ratas Wistar describen que la respuesta intestinal temprana a *T. spiralis* incluye intensa inflamación, alteraciones estructurales de la mucosa, hiperplasia de células caliciformes e infiltración de eosinófilos y mastocitos, cambios considerados claves en la expulsión de adultos y la destrucción de Lrn (Saracino et al. 2020). La aparente falta de una correlación directa y consistente entre la magnitud de las alteraciones histopatológicas observadas en nuestras líneas murinas y su eficiencia de expulsión sugiere que la efectividad de la respuesta protectora no depende únicamente de la intensidad inflamatoria, sino de la combinación de mecanismos inmunes y de factores genéticos particulares de cada genotipo, que en conjunto determinan el control de la parasitosis.

Se concluye que el desafío experimental con *T. spiralis* en distintos genotipos murinos permitió diferenciar distintas interacciones parásito-hospedador. La línea testigo *t* fue la más eficiente en la expulsión de los parásitos intestinales comparada con las líneas seleccionadas por peso corporal. Por este motivo, esta línea se clasificó como más resistente a la dosis suministrada. Por el contrario, la línea *h*, seleccionada para bajo peso, claramente se consideró como más susceptible a la infección debido a la menor expulsión, mayor carga de larvas en músculos y alteraciones corporales que llevaron al punto final humanitario.

La selección por peso modificó otros caracteres no seleccionados en estas líneas y provocó alteraciones en la aptitud biológica como respuestas correlacionadas. Por lo tanto, podríamos suponer que este proceso, junto con el bajo tamaño efectivo de las poblaciones, haya provocado modificaciones en los genotipos de las líneas explicando las diferencias encontradas en la resistencia/susceptibilidad hacia la infección con *T. spiralis*.

Agradecimientos. A la Dra. María Delia Vasconi (Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina), quien amablemente donó el parásito *Trichinella spiralis* en el año 2013.

ORCID

González Beltrán, S.  <https://orcid.org/0000-0002-8878-5580>

Orozco, N.  <https://orcid.org/0009-0000-6162-5758>

Coscelli, G.  <https://orcid.org/0000-0001-8817-3536>

Villanueva, P.  <https://orcid.org/0009-0002-6956-187X>

Oyarzabal, M.I.  <https://orcid.org/0000-0001-5429-5789>

Giudici, C.  <https://orcid.org/0000-0002-1042-4638>

REFERENCIAS

1. AVMA. Guidelines on Euthanasia of Animals: 2020 Edition. Disponible en: <https://www.avma.org/sites/default/files/2020-02/Guidelines-on-Euthanasia-2020.pdf>. Último acceso: enero 2025
2. Bell RG. The generation and expression of immunity to *Trichinella spiralis* in laboratory rodents. *Adv Parasitol.* 1998; 41: 149-217.
3. Bell RG, Liu WM. *Trichinella spiralis*: quantitative relationship between intestinal worm burden, worm rejection, and measurement of intestinal immunity in inbred mice. *Exp Parasitol.* 1988; 66: 44-56.
4. Bernardi S, Brogliatti G, Oyarzabal MI. Diferencias de fertilidad en ratones seleccionados por peso. *Analecta Veterinaria.* 1999; 19(1/2): 11-7
5. Bernardi S, Brogliatti G, Oyarzabal MI. Ovarian Structure in Mice Lines Selected for Weight. *Anat Histol Embryol.* 2009; 38: 200-3
6. Bernardi S, Brogliatti G, Oyarzabal MI. Efectos de la Selección y de la Superovulación en las Pérdidas Gestacionales de Ratonas CF1. *Int. J. Morphol.* 2011; 29(1): 204-13.
7. Canadian Council on Animal Care. CCAC guidelines: Identification of scientific endpoints, humane intervention points, and cumulative endpoints 2022. Disponible en: https://ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/CCAC_guidelines_scientific_endpoints.pdf Último acceso: abril 2025
8. Dehlawi MS, Wakelin D. Parameters of intestinal inflammation in mice given graded infections of the nematode *Trichinella spiralis*. *J Helminthol.* 2002; 76(2):113-7.
9. Despommier DD. *Trichinella spiralis* and the concept of nich. *J. Parasitol.* 1993; 79(4): 472-82.
10. Fariña F, Pasqualetti MI, Bessi C, Ercole ME, Vargas C, Arbusti P, Ayesa G, Ribicich MM. Comparison between *Trichinella patagoniensis* and *Trichinella spiralis* infection in BALB/c mice. *Vet Parasitol.* 2020; 286.
11. Filbey KJ, Grainger JR, Smith KA, Boon L, van Rooijen N, Harcus Y, Jenkins E, Hewitson JP,

- Maizels RM. Innate and Adaptive Type 2 Immune Cell Responses in Genetically Controlled Resistance to Intestinal Helminth Infection. *Immunol Cell Biol.* 2014; 92: 436-48.
12. Garber J, Wayne R, Bielitzki J, Clayton LA, Donovan JC, Hendriksen C, Kohn D, Lipman N, Locke PA, Melcher J, Quimby FW, Turner PV, Wood GA, Würbel H. National Research Council (US). Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. PMID: 21595115.
 13. Godoy JM, Codina AV, Kopp G, Vasconi MD, Di Masso RJ, Hinrichsen LI. 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, Argentina. 2014. p. 64.
 14. Grecis RK. Immunity to *Trichinella spiralis*. PhD, University of Glasgow, Glasgow, Escocia. 1982. p. 14.
 15. Harkness JE, Turner PV, Van de Woude S, Wheler CL. Harkness and Wagner's Biology and Medicine of Rabbits and Rodents. 5th ed. Ames, Iowa, USA: Wiley-Blackwell; 2010.
 16. Kapel CMO, Gamble HR. Infectivity, persistence, and antibody response to domestic and sylvatic *Trichinella* spp. in experimentally infected pigs. *Int J Parasitol.* 2000; 30(2), 215-21.
 17. Kobets T, Havelková H, Grekov I, Volkova V, Vojtíšková J, Slapničková M, Kurey I, Sohrabi Y, Svobodová M, Demant P, Lipoldová M. Genetics of Host Response to *Leishmania tropica* in Mice—Different Control of Skin Pathology, Chemokine Reaction, and Invasion into Spleen and Liver. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6, e1667.
 18. Kutzer MAM, Armitage SAO. Maximising fitness in the face of parasites: a review of host tolerance. *Zoology.* 2016; 119: 281-89.
 19. Lawrence CE, Paterson JCM, Higgins LM, MacDonald TT, Kennedy MW, Garside P. IL-4 regulated enteropathy in an intestinal nematode infection. *Eur J Immunol.* 1998; 28(9): 2672-84.
 20. Luebke RW. Nematodes as host resistance models for detection of immunotoxicity. *Methods.* 2007; 41: 38-47.
 21. Orozco N, González Beltrán S, Giudici C Oyarzabal MI. Resistencia y tolerancia a oxiuros en cuatro líneas de ratones seleccionados por peso. *InVet.* 2018; 20(1-2): 233-40.
 22. Oyarzabal MI, Rabasa S. Selección divergente de peso en ratones con alta endocría seguida de 90 generaciones de cría libre. *Mendeliana.* 1995; 10(2): 119-32.
 23. Oyarzabal MI, Rabasa S. Riqueza genética y estabilidad en ratones de la cepa CF1. *Mendeliana.* 1999; 13(2): 74 - 84.
 24. Oyarzabal MI. Líneas de ratones originales como modelos experimentales en genética y mejoramiento animal. *J Basic Appl Genet.* 2011; 22, 1.
 25. Pasqualetti M, Acerbo M, Miguez M, Rosa A, Fariña F, Cardillo N, Degregorio OJ, Ribicich M. Nuevos aportes al conocimiento de *Trichinella* y trichinellosis. *Rev Med Vet.* 2014; 95 (2):12 - 21.
 26. Raberg L, Graham AL, Read AF. Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2009; 364: 37-49.
 27. Reiterová K, Antolová D, Hurníková Z. Humoral immune response of mice infected with low doses of *Trichinella spiralis* muscle larvae. *Vet Parasitol.* 2009; 159: 232-35.
 28. Sánchez VG. Desarrollo de nuevos compuestos gemini con actividad antihelmíntica para aplicaciones veterinarias. PhD, Universidad Nacional del Litoral, Argentina. 2009.
 29. Saracino MP, Vila CC, Cohen M, Gentilini MV, Falduto GH, Calcagno MA, Roux E, Venturiello SM, Malchiodi EL. Cellular and molecular changes and immune response in the intestinal mucosa during *Trichinella spiralis* early infection in rats. *Parasit Vectors.* 2020; 6, 13(1): 505.
 30. Sokal RR, Rohlf J. Biometría: principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. H. Madrid: Blume; 1979. p. 832.
 31. Vasconi MD, Malfante P, Bassi A, Giudici C, Revelli S, Di Masso R, Font MT, Hinrichsen L. Phenotypic differences on the outcome of the host-parasite relationship: behaviour of mice of the CBI stock in natural and experimental infections. *Vet Parasitol.* 2008;153: 157-63.
 32. Vasconi MD, Bertorini G, Codina AV, Indelman P, Di Masso RJ, Hinrichsen LI. Phenotypic Characterization of the Response to Infection with *Trichinella spiralis* in Genetically Defined Mouse Lines of the CBI-IGE Stock. *Open J of Vet Med.* 2015; 5: 111-22
 33. Wakelin D. Genetic control of immunity to parasites. Infection with *Trichinella spiralis* in inbred and congenic mice showing rapid and slow responses to infection. *Parasite Immunol.* 1980; 2: 85-98.
 34. Watanabe N. The effect of inheritance of IgE responsiveness on the susceptibility of mice to *Trichinella spiralis* infection. *Front. Immunol.* 2023; 14:1185094.
 35. Yu YR, Deng MJ, Lu WW, Jia MZ, Wu w, Qi YF. Systemic cytokine profiles and splenic toll-like receptor expression during *Trichinella spiralis* infection. *Exp Parasitol.* 2013; 134: 92-101.