

Parasitosis en ratones convencionales

Cecilia Martínez Castillo
José Agustín Jiménez Rodríguez
Histología, ENP 5. José Vasconcelos

Introducción

Las relaciones bióticas interespecíficas, tienen la interacción en una comunidad entre individuos de especies diferentes, como la competencia, depredación, explotación, comensalismo, inquilinismo, facilitación, mutualismo, exclusión mutua, amensalismo y parasitismo, donde el parásito o huésped consigue la mayor parte del beneficio de una relación estrecha con otro, el hospedero u hospedador. El parasitismo se considera un caso particular de predación, en el hombre y otros animales provocan enfermedades causando daño de diferente impacto. El parasitismo es una relación interespecífica, donde el vínculo se establece entre dos especies, como consecuencia de esta relación uno de los organismos, el parasitado es afectado.

Algunos de los parásitos pueden vivir en el exterior del organismo, llamándose ectoparásitos; los que viven en el interior se conocen como endoparásitos. Los ectoparásitos viven y desarrollan parte de su vida sobre epidermis-dermis, folículo piloso, manto piloso, pelo, y otras regiones exteriores del cuerpo de otro organismo. Los ectoparásitos se reconocen con nombres comunes, pulgas, ácaros, piojos o garrapatas, se desarrollan en el interior de los organismos, muchos de ellos en diferentes órganos y tejidos. Los endoparásitos se caracterizan por tener un ciclo evolutivo, que consta de varias etapas y transformaciones que experimenta un parásito durante su desarrollo y se conoce como ciclo evolutivo o ciclo biológico.

Los ciclos pueden ser directos o monoxénicos, si el parásito requiere de un solo hospedero para todo su desarrollo o indirectos o heteroxénicos si necesita dos o más hospederos. En los ciclos directos el hospedero infectado transfiere al medio ambiente las formas infectantes de los parásitos para su paso al hospedero susceptible, como *Giardia intestinalis*. En los ciclos indirectos, los parásitos pasan por dos o más huéspedes de distinta especie para alcanzar su desarrollo como *Plasmodium*. Se reconocen huéspedes intermediarios y huéspedes definitivos. El hospedero definitivo es aquel donde el parásito se reproduce sexualmente o adquiere el estado adulto. El hospedero intermediario alberga las formas intermedias, es decir las formas larvarias o los estadios de multiplicación asexual del parásito.

Los parásitos deben adaptarse a diferentes hábitats por lo que en su ciclo de vida presentan diversos estadios y cada uno de ellos tiene características propias que les permiten sobrevivir en el nuevo medio.

El hospedero puede ser habitual o accidental. Cuando el hospedero accidental es ineficiente y permite sólo la evolución incompleta del parásito, se lo denomina paraténico, en este caso, para que el ciclo prosiga este hospedero debe ser ingerido por otro y su utilidad radica en la diseminación del parásito, por ejemplo ratón para *Toxocara canis* y gorgojos para *Hymenolepis nana*. Cuando el hospedero accidental permite el desarrollo completo del parásito comportándose como hospedero habitual, se denomina vicariante, como en la hidatidosis en el hombre que es producida por el estadio larvario,

hidátide, del *Echinococcus granulosus*. Parásitos en ratones. La parasitología humana ha evolucionado paralelamente con las enfermedades que los parásitos provocan en el hombre, así mismo, las parasitosis en los animales, sobre todo en los domésticos que tienen contacto directo con el hombre inciden en la salud humana. Los ratones, son animales utilizados ampliamente en investigaciones de laboratorio y también como mascotas, es importante, que estos animales crezcan en un medio que favorezca su crecimiento en ambientes libres de parásitos para que al estar en contacto con los humanos principalmente niños, no sean sujetos de infecciones debidas a este acercamiento.

Otras infecciones de importancia en la salud pública son el Tifus Exantemático, la Enfermedad de Chagas, la Leishmaniasis, la Taeniosis y Cisticercosis, la Oxiuriasis producida por *Enterobius vermicularis*.

En este trabajo se estudiaron las parasitosis en ratones convencionales que se crían en un bioterio con fines de mercado, debido a la importancia que tienen para la transmisión de enfermedades al humano, en este caso niños que los utilizan como mascotas.

Aprendizajes esperados

Relaciones entre organismos, aprendizaje del uso de material en condiciones de esterilidad. Cuidado y manejo de pequeñas especies de roedores, aplicación de técnicas de parasitología, microbiología e histología entre otros.

Objetivo

Estudiar las parasitosis en ratones convencionales.

Materiales y método

Se utilizaron 10 ratones albinos machos de la cepa CD-1, de 25 gr de peso, obtenidos de un bioterio de distribución para su uso como mascotas. Los animales se conservaron en un bioterio adaptado en el laboratorio de biología de la unidad LACE de la Escuela Nacional Preparatoria, con temperatura controlada a 20 °C, ciclos de luz y oscuridad de 12 horas cada uno. Se mantuvieron en cajas de acrílico, con astilla de madera estéril, con tapa de rejilla metálica. Los animales se alimentaron con tabletas purina (Purina de México, SA de CV) y acceso libre a agua estéril.

Los dos grupos de animales se distribuyeron con 5 individuos cada una. Se determinó la masa de cada animal utilizando una balanza digital y se marcaron empleando como colorante ácido pícrico al 1 % en etanol. Las marcas se distribuyeron de acuerdo a la siguiente nomenclatura: 1 = Marca en cabeza, 2= Marca en dorso, 3= Marca en cabeza y dorso, 4= Marca en cola, 5= Marca en cabeza y cola, 6=Marca en cabeza, cola y dorso, 7= Marca en pata delantera derecha, 8=Marca en pata delantera izquierda, 9=Marca en pata trasera derecha, 10=Marca en pata trasera izquierda, (Fig. 1).

La astilla se esterilizó en autoclave, utilizando bolsas de papel y polipapel, cerradas con cinta adhesiva y se esterilizaron en autoclave durante 15 min a 15 lb de presión. Ya estériles se colocaron en un horno de calor seco a 25°C para su secado. La astilla se cambio diariamente a los animales.

Se utilizaron bebederos de vidrio con boquilla de acero inoxidable. Los bebederos se llenaron al 60% de su capacidad y se esterilizaron en autoclave durante 20 min a 15 lb de presión. Los desechos de astilla y heces se colocaron en bolsas de poliuretano para su desecho como material orgánico.

Los animales se observaron en un microscopio estereoscópico para la localización de ectoparásitos, para ello los animales se anestesiaron utilizando 0.02 ml de Sulfato de atropina inyectado por vía intraperitoneal con una jeringa de insulina. Cuando el animal estuvo dormido se buscaron parásitos. Se examinaron los pelos, la piel 10X, moviendo el pelaje con un aplicador de madera. Se puso atención especial a la base del tallo del pelo. Se examinaron la región craneal, entre los ojos y pabellones auriculares, entre los pabellones, entre las escápulas, debajo de la mandíbula, y las zonas inguinales y axilares. Se recogió cualquier material sospechoso o ectoparásito verse con un pequeño par de pinzas. Ectoparásitos con frecuencia se ven como escamas o como acumulación de cera amarilla en la base del tallo del cabello o directamente sobre la piel. Las muestras se colocaron en un portaobjetos de vidrio limpio y se valoraron.

Las lesiones cutáneas se estudiaron haciendo una biopsia de la zona afectada, el animal se anestesió con 0.02 ml de sulfato de atropina y se valoraron con una tinción de gram. La tinción de gram consistió en hacer un extendido sobre una lámina de portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente. La muestra se fijó con metanol durante un minuto o al calor flameado 3X. Se agregó cristal violeta y se esperó 1 minuto luego se enjuagó con agua. Se agregó lugol y se esperó 1 minuto, después se enjuagó con agua. Se adicionó acetona/alcohol durante 1 minuto, se enjuagó con agua destilada y finalmente se agregó safranina como tinción de contraste y se incubó 1 minuto.



Figura 1. Animales marcados **Figura 2.** Búsqueda de ectoparásitos en un ratón con anestesia.

Por otra parte, las lesiones se retiraron y se conservaron por fijación en formalina al 4% para su análisis posterior en histología. Las pruebas histológicas se realizaron incluyendo en parafina las lesiones afectadas y haciendo cortes finos del tejido utilizando un micrótopo.

La valoración de las lesiones fueron realizadas por auscultación directa veterinaria de los animales y después de tomar la muestra se administraron 0.04 ml de antibiótico penicilina por vía intraperitoneal, cada 24 horas, durante 5 días.

Para la búsqueda de endoparásitos, se utilizaron dos técnicas, análisis coproparasitoscópico directo de materia fecal y prueba de Graham (Fig. 3).



Figura 3. Prueba de Graham. Se muestra la adhesión de cinta en la región perianal. Los parásitos se adhieren a la cinta y se pueden observar en el microscopio.

El análisis coproparasitológico se realizó en un portaobjetos, donde se colocó, separadamente, en cada extremo del mismo, una gota de solución salina fisiológica (SSI) y otra de lugol. Con unas pinzas de punta roma estériles se tomaron las muestras de las excretas de los animales, se tomaron de 1 a 4 mg de heces de cada ratón, se mezclaron con SSI empleando un aplicador de madera y homogenizando la muestra. Con el aplicador se retiraron las fibras y otros fragmentos gruesos. Se colocó en un portaobjetos y cubrió con un cubreobjetos. El mismo procedimiento se realizó utilizando una gota de lugol en el otro extremo del portaobjetos. Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico a 10X, 40X y 100X utilizando aceite de inmersión.

La prueba de Graham consistió en tomar muestras perianales utilizando cinta adhesiva transparente (Fig. 3). Con un trozo transparente de cinta suficientemente largo aproximadamente 5 cm de longitud, que permitió tomar la cinta por los extremos laterales sin tocar el centro, se levantó el ratón de la jaula permitiendo que sus patas delanteras se apoyaran en la tapa de la jaula, la cinta se adhirió al ano para captar en la parte de la goma la toma de la muestra. La cinta se colocó sobre un portaobjetos y se observó al microscopio óptico con los objetivos de 10x, 40x y 100X utilizando aceite de inmersión. Como medidas de bioseguridad preventivas durante el manejo de las muestras, ya que la materia fecal es potencialmente infectante, los alumnos utilizaron guantes y cubre-boca.

Los animales que mostraron la presencia de parásitos, se trataron con Zentel, un antiparasítico, que se resuspendió antes de administrar, con dosis de 0.04 mg por vía oral, cada 24 horas durante 5 días, utilizando una pipeta plástica con bulbo.

Resultados y discusión

La observación de los ratones para la presencia de ectoparásitos localizó una infección en el abdomen del R 10 (Fig. 4A). El ratón se separó del grupo y se mantuvo en una jaula separada y se tomaron muestras del tejido dañado. Los análisis de las pruebas de Tinción de gram mostraron la presencia de bacterias gran positivas, ya que la coloración de las bacterias fue azul en tinción de gram (Fig. 5). Después de haber identificado las bacterias como gran positivas, se limpió la lesión con antiséptico (Fig. 4B) y se administró el tratamiento con penicilina. El tejido analizado en corte histológico para la presencia de bacterias Gram, evidenció la presencia de cocobacilos (Fig. 6). En la laminilla con la que se tomó la muestra de la infección umbilical, por la disposición de las bacterias no podemos asegurar que sean estreptococos o estafilocos, solamente cocos gram positivos. Después de tomar la biopsia, el animal

fue tratado con una inyección de antibiótico penicilina 0.04 ml por vía intraperitoneal durante 5 días. El diagnóstico de la infección fue onfaloflevitis, una infección que obtienen los animales al nacimiento. La preparación con solución salina, sirvió para buscar e identificar trofozoítos, sin embargo no se encontraron en ninguna muestra.



Figura4. Ratón con infección umbilical. A. Antes de tomar la biopsia. B. Después de tomar la biopsia.

La preparación con lugol sirve para reportar el hallazgo de quistes, huevos y larvas, los cuales no se encontraron en las muestras estudiadas. Sin embargo, en los ratones R2 y R3, se evidenció la presencia de infección con tenias (Fig. 7), la cual se confirmó microscópicamente. En el animal R2 se obtuvo por la técnica de Graham y en animal R3 por análisis coproparasitológico [Glaxo Smith].

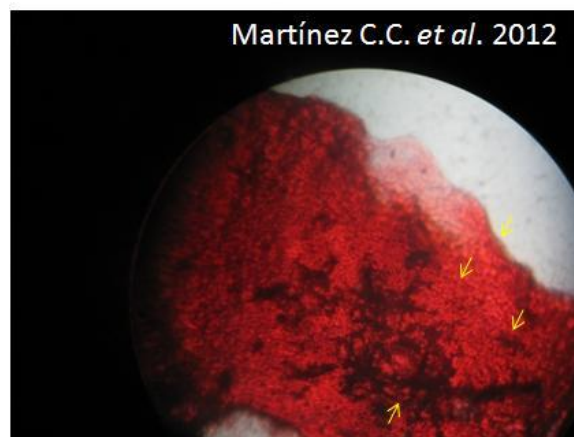
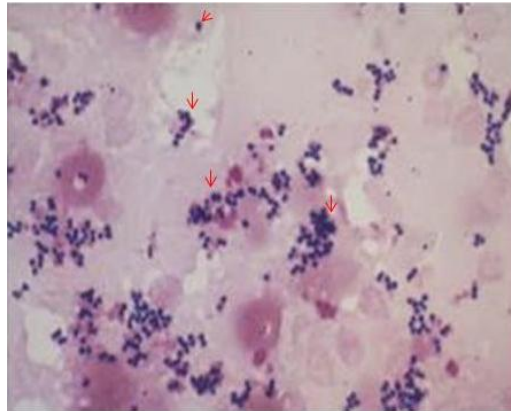


Figura 5. Tinción de gram. Con flechas amarillas se señalan los cúmulos de bacterias en color azul.

El tratamiento administrado a los animales parasitados se hizo extensivo a los animales que coexistieron en la misma jaula, ya que la transmisión de los parásitos es posible por la exposición a ciertos factores de riesgo como la convivencia con un portador de *Taenia* [Martínez et al., 2003].



Rojas Aranda, J.C y Martínez Castillo, C. 2012

Figura 6. Corte histológico y valoración bacteriológica de tejido del R10, muestra la presencia de cocobacilos en color azul (Flechas rojas) con la tinción de Gram.



Figura 7. A. Fragmento de tenia localizado por observación al microscopio óptico de materia fecal en microscopio óptico 10X. **B.** *Taenia* extraída con la técnica de Graham por observación en microscopio estereoscópico 20X.

El tratamiento con Zentel, que es un carbamato de benzimidazol con actividad antihelmíntica polivalente y contra protozoarios, resultó eficaz en el tratamiento de tenias lo cual se comprobó con análisis coproparasitológicos de materia fecal de los animales y con la prueba de Graham después del tratamiento, demostrando su eliminación, ya que las tenias no se encontraron nuevamente. Debido a que la enfermedad en el ratón se transmite al humano, los alumnos utilizaron las medidas preventivas adecuadas, mantuvieron limpio a los animales y al bioterio.

La técnica de Graham se aplica en la búsqueda de oxiuros, en este trabajo no se localizaron. El antiparasítico puede ser útil en el tratamiento de otras parasitosis como Ascariasis, giardiasis y especies relacionadas.

Cuando se trabaja en el laboratorio y con animales, la seguridad es prioritaria. La tenia es un parásito heteroxénico, gusano plantelminto, y es un céstodo causante de dos enfermedades. La teniosis y la cisticercosis; esta última también afecta al cerdo y al ratón, resultan de la ingesta de huevos de *Taenia*, en el hombre la teniosis se origina al ingerir el metacestodo presente en la carne de cerdo. La transmisión de la enfermedad se debe al consumo huevos, fomentan por factores de riesgo como la convivencia con un portador del parásito, el bajo nivel económico de los individuos o comunidades, la

inadecuada higiene personal, la falta de sanitarios y drenaje, la ausencia de agua potable, de pavimento, y la coprofagia en cerdos. En México la cisticercosis es endémica y los hospitales reportan que ésta es una de las principales causas de afecciones neurológicas [Martínez, *et al.*, 2003]. Para nuestro estudio es importante que los ratones no estén parasitados, debido a la transmisión hacia el humano, en este caso niños que los utilizan de mascotas y se considera un factor de riesgo.

Conclusiones

Esta experiencia de enseñanza-aprendizaje mostró la capacidad de los alumnos de seguir la metodología de investigación científica, la aplicación de técnicas químicas en ratones. Además, los alumnos fueron responsables de la atención de los animales durante todo el proyecto. Aprendieron como se sostiene y manipula un ratón para su observación, toma de muestras y tratamiento, su manejo, alimentación y cuidado. Desarrollaron habilidades en la inoculación por diferentes vías, la oral e intraperitoneal y técnicas de muestreo de parásitos, reconocieron la importancia de la enfermedad endémica en nuestro país.

Perspectivas

Es necesario establecer estándares de control del crecimiento y distribución de los animales para prevenir la salud humana.

Bibliografía

Baker, D.G. in Flynn's Baker, D.G. The Mouse in Biomedical Research: Diseases Vol. 2 *The Mouse in Biomedical Research*. eds. J. Fox, et al. Ch. 23, 565-580 (Academic Press, 2007).
Parasites of Laboratory Animals. (ed. David G. Baker) Ch. 11, 303-398 Blackwell, 2007.
Martínez Maya J., Aline S. de Aluja S. A., Ávila-Ramírez, G; Aguilar-Vega L., Plancarte-Crespo, A.; Jaramillo-Arango, C.J. "Teniosis y detección de anticuerpos anticisticercos en personas de una comunidad rural del estado de Guerrero". Salud pública de México / vol.45, no.2, marzo-abril de 2003.
Owen, D.G. *Parasites of Laboratory Animals*. Vol. 12 Royal Society of Medicine, 1992.
Smith, P.H., Wiles, S.E., Malone, J.B., & Monahan, C.M. in Flynn's "Parasites of Laboratory Animals". (ed. David G. Baker) Ch. 1, 1-13. Blackwell, 2007.

Cibergrafía

<http://www.mufel.net/plm05/21533.htm>
<http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/parasitosis.pdf>
<http://www.jove.com/video/2767/el-diagnostico-de-ecto-y-endoparsitos-en-ratas-y-ratones-de-laboratorio?language=Spanish>

<http://es.scribd.com/doc/5275620/MANUAL-DE-LABORATORIO-DE-PARASITOLOGIA>
http://www.path.cam.ac.uk/~schisto/helminth_eggs/
<http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Cirugia%20general/Documentos/18AnestesiaPgniosAnimales.pdf>

Agradecimientos a: Lic. Jocabed Ruiz Guerra. Coordinadora de Materias Experimentales. Julio Cesar Rojas Aranda técnico en Histología. ENP 5.