

Investigații parazitologice, histopatologice și imunohistochimice ale țesutului muscular provenit de la șobolani infestați experimental cu *Trichinella spiralis* și tratați cu lectine

D. MILITARU, Manuella MILITARU*, Aneta POP*, Carmen ARDELEANU**,
Andreea AMZUȚĂ, Emilia CIOBOTARU*, I. RĂDOI*

Institutul „Pasteur” – București

* Facultatea de Medicină Veterinară – București

** Institutul „V. Babeș” – București

REZUMAT. S-a urmărit efectul lectinei extrase din germeni de grâu (*Triticum vulgare* – WGA) și al celei extrase din dovlecel (*Curcubita pepo ovifera* – CPA) asupra nivelului de infestare în trichineloză experimentală la șobolani.

S-au administrat lectinele la 7 zile după infestarea experimentală cu 1.500 larve de *Trichinella spiralis*/șobolan. WGA în doză de 5mg/kg s-a administrat oral 3 zile consecutiv și CPA în doză de 3mg/kg s-a injectat intraperitoneal 3 zile consecutiv.

Investigațiile parazitologice, histopatologice și imunohistochimice s-au realizat după 35 de zile din momentul infestării.

Examenul parazitologic a relevat o scădere a gradului de infestare cu 98,4% în cazul administrării de WGA și doar cu 62,5% consecutiv administrării de CPA. Histopatologic, la șobolanii infestați și tratați cu lectine s-au evidențiat chisturi alterate alături de chisturi cu morfologie nemodificată. Reacțiile imunohistochimice pentru proteina S-100 și pentru actina din leiomiocite au făcut posibilă identificarea chisturilor și a larvelor cu modificări structurale minime.

În prezent, tratamentul trichinelozei nu mai constituie o problemă, existând o gamă largă de produse pe bază de albendazol, utilizate la om și la animalele de interes economic (2,3,6). Totuși, în multe situații, substanțele active eficiente împotriva unor agenți infecțioși sau parazitari, devin după un timp nefolositoare prin apariția fenomenului de rezistență. Acesta este doar unul dintre motivele pentru care considerăm oportună încercarea de identificare de noi substanțe capabile să intervină în diferite faze ale trichinelozei, blocând formarea chisturilor sau provocând distrugerea larvelor.

Studiul actual se bazează pe unele investigații anterioare, care au demonstrat că unele lectine de origine vegetală, administrate simultan cu larvele de *T. spiralis* au redus gradul de infestare (5,7). În această lucrare sunt prezentate rezultatele obținute consecutiv administrării de lectine după

infestarea experimentală cu larve de *T. spiralis* la șobolan.

Materiale și metode

Animale

S-au utilizat 20 de șobolani convenționali în greutate de 80 – 100g, grupați în 6 loturi:

Lot 1 – 3 șobolani infestați oral cu 1.500 larve de *T. spiralis*.

Lot 2 – 4 șobolani infestați oral cu 1.500 larve de *T. spiralis*. La 7 zile post infestare (P.I.) li s-a administrat prin gavaj WGA în doză de 5 mg/kg/zi, 3 zile consecutiv.

Lot 3 – 4 șobolani infestați oral cu 1.500 larve de *T. spiralis*. La 7 zile P.I. li s-a administrat

intraperitoneal CPA în doză de 3 mg/kg/zi, 3 zile consecutiv.

Lot 4 – 3 șobolani neinfestați și netratați cu lectine.

Lot 5 – 3 șobolani neinfestați, cărora li s-a administrat prin gavaj WGA în doză de 5 mg/kg/zi, 3 zile consecutiv.

Lot 6 – 3 șobolani neinfestați, cărora li s-a administrat intraperitoneal CPA în doză de 3 mg/kg/zi, 3 zile consecutiv.

Lotul 4 a fost lotul martor iar loturile 5 și 6 au fost necesare pentru a urmări eventualele modificări tisulare induse de administrarea lectinelor. Sacrificarea animalelor prin sângerare la alb s-a realizat la 35 de zile de la debutul experimentului.

Metode

Larvele de *T. spiralis* (tulpină menținută în laborator) au fost obținute prin digestie artificială, ulterior stabilindu-se numărul larvelor în suspensie pentru standardizarea dozei infestante.

După sacrificarea animalelor din experiment, examenul parazitologic s-a efectuat pe probe recoltate din diafragm, limbă și musculatura membrilor posterioare, prin trichineloscopie și digestie peptică. Puterea infestantă a larvelor obținute prin digestie peptică s-a testat prin bioprobă pe șobolani.

Pentru obținerea lectinelor s-au folosit germeii de grâu și miezul de dovlecel, omogenizați cu ajutorul unui omogenizator cu cuțite de tip Waring-Blendor. Extracția s-a făcut din omogenate timp de 24 de ore, folosind tampon fosfat salin. După centrifugare, precipitarea proteinelor din supernatante s-a realizat cu sulfat de amoniu, până la o saturație de 60%. Îndepărtarea ionilor de amoniu s-a realizat prin dializă. Purificarea lectinelor s-a obținut prin cromatografie de afinitate pe chitină pe suporturile specifice – Sephadex G-100 și Sepharose 4 B (Pharmacia Fine Chemicals).

Dozarea concentrației proteice s-a făcut prin metoda Lowri (4) iar testarea capacității de

hemaglutinante s-a efectuat pe eritrocite de iepure conform metodei Allen (1). Lectinele obținute au avut o concentrație proteică de: 660 μg/ml – WGA și 500 μg/ml – CPA.

Examenul histologic s-a făcut pe fragmente din musculatura linguală, miocard, ficat, rinichi și splină. Probele recoltate au fost fixate în soluție de formaldehidă 10% și supuse tehnicilor uzuale de includere în parafină. Din toate țesuturile recoltate s-au executat secțiuni de 5 μm, care au fost colorate prin metodele: tricromic Masson (HEA), bicromic (HE) și cu albastru de toluidină.

Examenul imunohistochimic s-a aplicat probelor din musculatura linguală, fixate în soluție de formaldehidă 10%, incluse în parafină și secționate la 2-3 μm. Ele au permis imunomarcarea actinei din leiomiocite cu ajutorul anticorpului monoclonal (AMC) *anti-actină* și a proteinei S-100 (caracteristică celulelor histiocitare, celulelor de tip Langerhans și celulelor cu origine neuroectodermică) cu ajutorul serului policlonal (SPC) *anti-S-100* (Dako, Glostrup Danemarca).

Rezultate și discuții

În urma *investigațiilor parazitologice* s-au obținut următoarele rezultate, centralizate în Tabelul 1. Specificăm că numărul de larve/g de musculatură obținute în urma digestiei peptice reprezintă media aritmetică a probelor examinate.

S-a observat că administrarea lectinelor WGA și CPA la șobolani infestați experimental cu *T. spiralis* induce o serie de modificări în ceea ce privește: aspectul larvelor obținute prin digestie peptică, rezultatul bioprobei pe șobolani și gradul de infestație. În cazul administrării orale de WGA rezultatele au constat în reducerea infestației cu 98,4% față de infestația șobolanilor din lotul 1, s-au obținut larve nespirate (neviabile) și nu s-a reprodus infestația prin administrarea larvelor obținute prin digestie peptică și administrate altor șobolani. Efectele administrării intraperitoneale de CPA au fost mai slabe, reducându-se gradul infestației cu doar 62,5% și, cu toate că prin bioprobă nu a fost reprodusă infestația, prin digestie peptică s-au obținut atât larve nespirate cât și spirale.

Tabel 1

Rezultatele examenului parazitologic

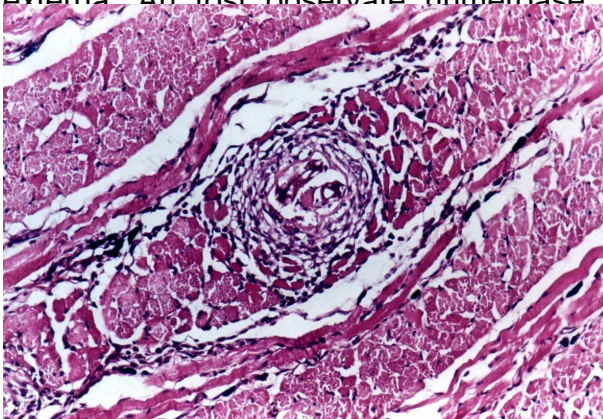
Lot

Număr larve/g musculatură

Lot 1	(digestie peptică)
Lot 2	5,250
Lot 3	5,250
Lot 4	5,250
Lot 5	5,250
Lot 6	5,250
Lot 7	5,250
Lot 8	5,250
Lot 9	5,250
Lot 10	5,250
Lot 11	5,250
Lot 12	5,250
Lot 13	5,250
Lot 14	5,250
Lot 15	5,250
Lot 16	5,250
Lot 17	5,250
Lot 18	5,250
Lot 19	5,250
Lot 20	5,250
Lot 21	5,250
Lot 22	5,250
Lot 23	5,250
Lot 24	5,250
Lot 25	5,250
Lot 26	5,250
Lot 27	5,250
Lot 28	5,250
Lot 29	5,250
Lot 30	5,250
Lot 31	5,250
Lot 32	5,250
Lot 33	5,250
Lot 34	5,250
Lot 35	5,250
Lot 36	5,250
Lot 37	5,250
Lot 38	5,250
Lot 39	5,250
Lot 40	5,250
Lot 41	5,250
Lot 42	5,250
Lot 43	5,250
Lot 44	5,250
Lot 45	5,250
Lot 46	5,250
Lot 47	5,250
Lot 48	5,250
Lot 49	5,250
Lot 50	5,250
Lot 51	5,250
Lot 52	5,250
Lot 53	5,250
Lot 54	5,250
Lot 55	5,250
Lot 56	5,250
Lot 57	5,250
Lot 58	5,250
Lot 59	5,250
Lot 60	5,250
Lot 61	5,250
Lot 62	5,250
Lot 63	5,250
Lot 64	5,250
Lot 65	5,250
Lot 66	5,250
Lot 67	5,250
Lot 68	5,250
Lot 69	5,250
Lot 70	5,250
Lot 71	5,250
Lot 72	5,250
Lot 73	5,250
Lot 74	5,250
Lot 75	5,250
Lot 76	5,250
Lot 77	5,250
Lot 78	5,250
Lot 79	5,250
Lot 80	5,250
Lot 81	5,250
Lot 82	5,250
Lot 83	5,250
Lot 84	5,250
Lot 85	5,250
Lot 86	5,250
Lot 87	5,250
Lot 88	5,250
Lot 89	5,250
Lot 90	5,250
Lot 91	5,250
Lot 92	5,250
Lot 93	5,250
Lot 94	5,250
Lot 95	5,250
Lot 96	5,250
Lot 97	5,250
Lot 98	5,250
Lot 99	5,250
Lot 100	5,250

În urma examenului histologic, nu au fost sesizate modificări în structura miocardului, rinichiului și splinei, indiferent de lotul din care provenea animalul. Păstrarea integrității morfologice s-a înregistrat și în ficat, cu excepția a 2 șobolani din lotul 3 în

Examenul histologic a evidențiat aceste cazuri în care s-a observat teritoriile musculaturii linguale a șobolanilor redușe (de hepatoză granulovacuolară din urme reduse de hepatocite în necrobioză și de capsulă colagenică externă. Au fost observate numeroase

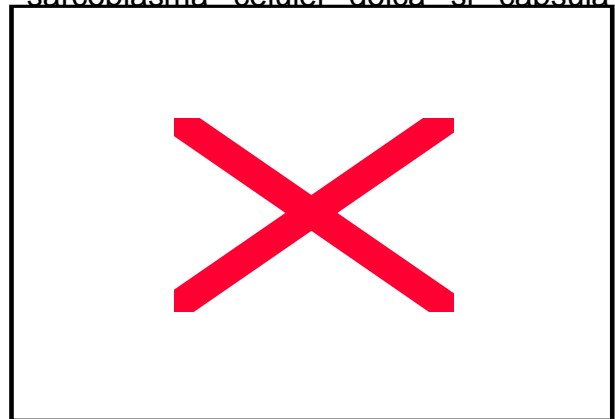


□□

Figura 1

Musculatură linguală, șobolan lot 2 (infestat + WGA). Chist distrus. Perete cu structură fibrilară și reacție

În musculatura șobolanilor lotului 2 (infestați + WGA) s-au remarcat în aceeași secțiune histologică chisturi cu arhitectura puternic alterată alături de chisturi nemodificate. Alterările chisturilor au constat în dezorganizarea și permeabilizarea peretelui, acesta căpătând o structură fibrilară neuniformă, dilacerată de prezența a numeroase elemente celulare (Fig. 1 și 2). Nu s-a menținut diferențierea dintre sarcoplasma celulei doică și capsula



observată la animalele din alte loturi.

Figura 2

Musculatură linguală, șobolan lot 2 (infestat + WGA). Chist distrus infiltrat cu celule mononucleare și

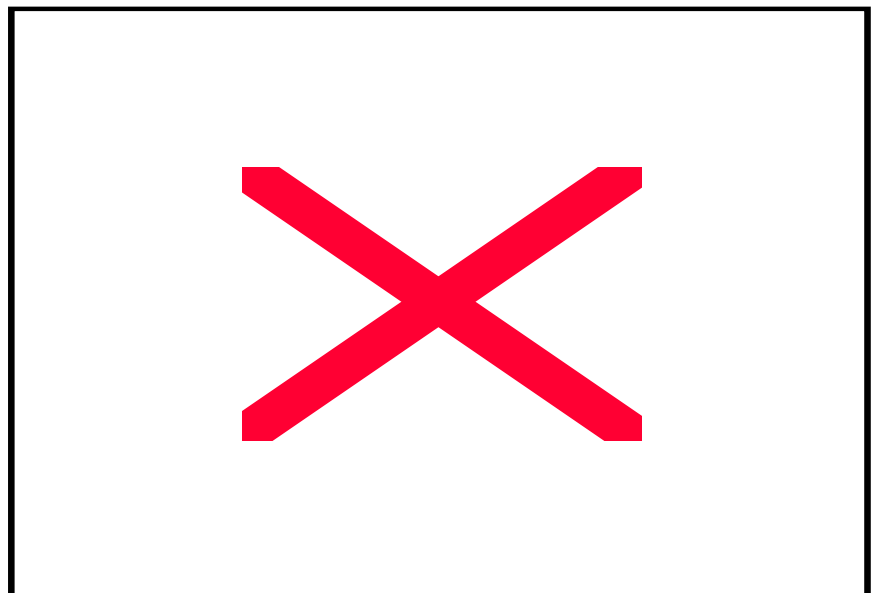
În musculatura șobolanilor lotului 3 (infestați + CPA) au fost surprinse chisturi distruse și chisturi cu aspect normal. Structura sarcoplasmo-colagenică a chisturilor a fost complet dezorganizată și înlocuită de o reacție celulară puternică, predominând eozinofilele și elementele mononucleare de tip macrofagic și epitelioid (Fig. 3, 4 și 5). În unele chisturi, larvele nu au mai prezentat structură internă, fiind granulate sau cu aspect omogenizat (Fig. 5). În secțiunile examinate s-a evidențiat o populație mastocitară numeroasă, sub formă de cuiburi de mastocite localizate în apropiere sau la distanță față de chisturile (nemodificate sau distruse) de *T. spiralis* (Fig. 6).

În musculatura animalelor din loturile 4, 5 și 6 s-au surprins rare fibre musculare hialinizate și grupuri de mastocite fără o repartiție particulară în musculatura linguală.

Prin examen imunohistochimic pentru evidențierea proteinei S-100, în musculatura șobolanilor lotului 1 au fost puternic marcate filetele nervoase și s-a obținut o reacție mai slabă a sarcoplasmei din jurul larvelor (Fig. 7 și 8).

La animalele din loturile 2 și 3, consecutiv utilizării SPC anti – S-100, nu s-a observat imunomarcarea structurilor din componența chisturilor distruse sau cu morfologie nemodificată.

□
În cazul utilizării AMC anti-actină, în musculatura animalelor din lotul 1, s-au înregistrat reacții de culoare în fibrele musculare ale pereților vasculari și în unele zone din structura larvelor. Spre deosebire de



aceste aspecte, în cazul șobolanilor loturilor 2 și 3, pe baza reacției înregistrate și a intensității acesteia s-au observat 3 categorii de chisturi:

chisturi cu morfologia nealterată, în care larva nu a fost marcată (Fig. 9) (probabil datorită denaturării structurilor intime larvare, ipoteză susținută și de rezultatele digestiei peptice, în urma examenului obținându-se larve neviabile),

chisturi distruse cu reacție celulară masivă perifocală (Fig. 10), situație în care larva a prezentat zone reduse de marcare,

chisturi cu morfologie nemodificată dar cu marcare difuză, neuniformă a larvelor.

Considerăm că reacția față de AMC anti – actină oferă informații referitoare la integritatea structurală a larvelor din chisturi. Cu cât reacția este mai intensă și uniform repartizată în toată structura larvei, cu atât posibilitatea ca aceasta să fie încă viabilă este mai mare. Prin tehnicile obișnuite de histopatologie nu se pot diferenția larvele viabile sau cele vii cu putere infestantă de cele neinfestante.

Figura 3

Musculatură linguală, șobolan lot 3 (infestat + CPA). Chist distrus, resturi larvare în contact direct cu reacția inflamatorie perifocală (Colorație H.E., ob. 20)

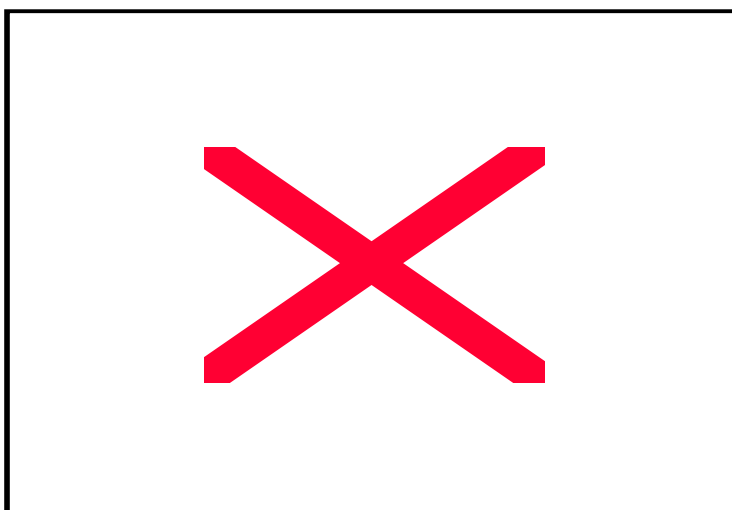
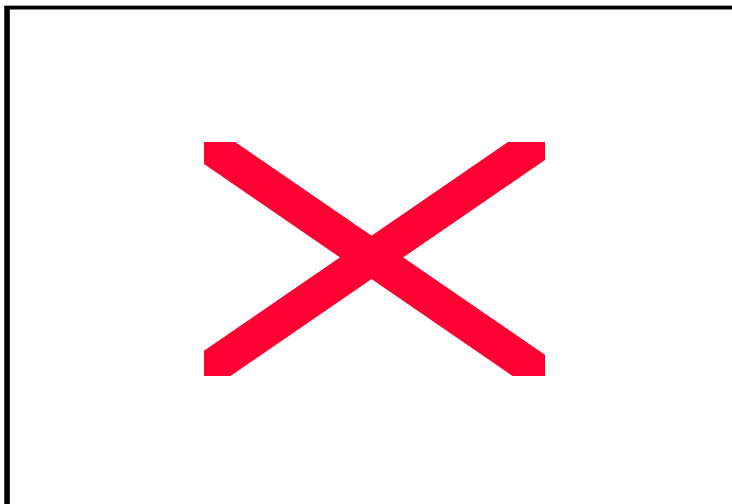


Figura 4

Musculatură linguală, șobolan lot 3 (infestat + CPA). Detaliu la Fig. 3. Abundență de eozinofile și de celule epitelioides, dilacerarea fibrelor musculare perifocale datorită infiltratului inflamator, hialinoză musculară,

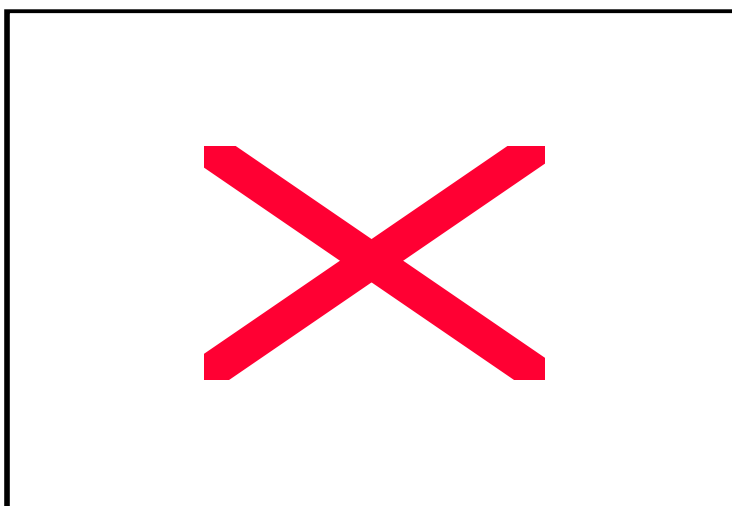
larvă cu structură puternic alterată. (Colorație H.E., ob. 40)



□

Figura 5
Musculatură
linguală, șobolan lot 3
(infestat + CPA). Chist
distrus cu pierderea
structurii sarcoplasmo-

colagenice, larvă alterată cu aspect granular, infiltrat celular predominant mononuclear. (Colorație H.E., ob. 40)



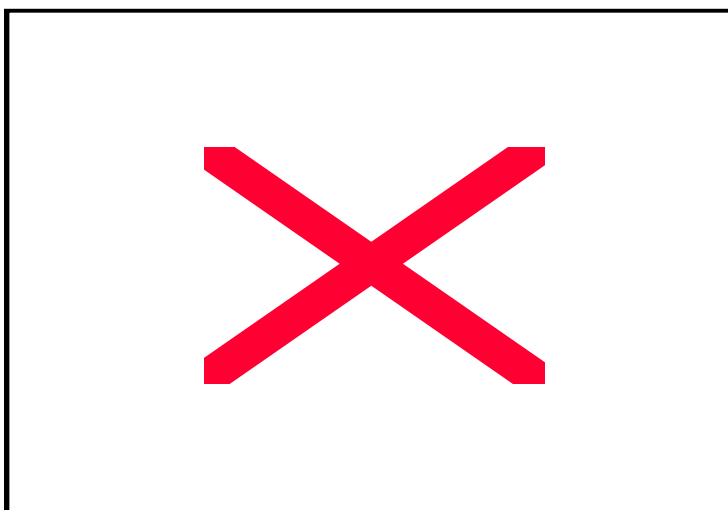
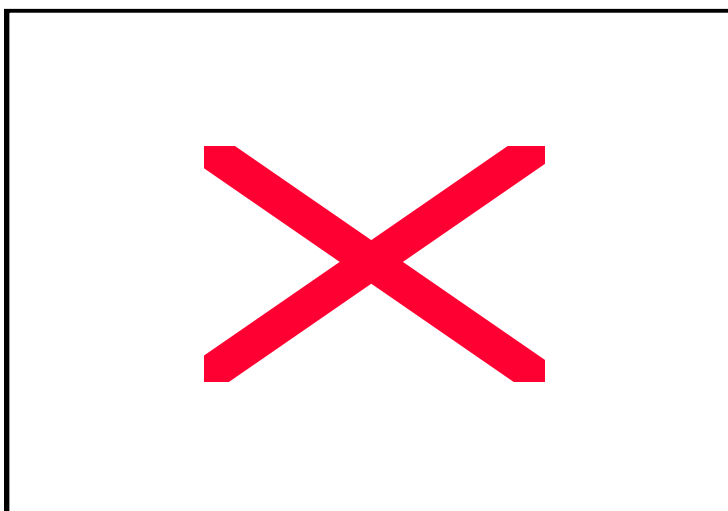
□

Figura 6

Musculatură linguală, șobolan lot 3 (infestat + CPA). Grupare de mastocite cu diferite grade de degranulare. (Colorație cu albastru de toluidină, ob. 100)

Figura 7

Musculatură linguală, șobolan lot 1 (infestat). Chist cu structură nemodificată. Imunomarcarea celulei „doică” din jurul larvei. (SPC anti – S-100, ob. 20)



□

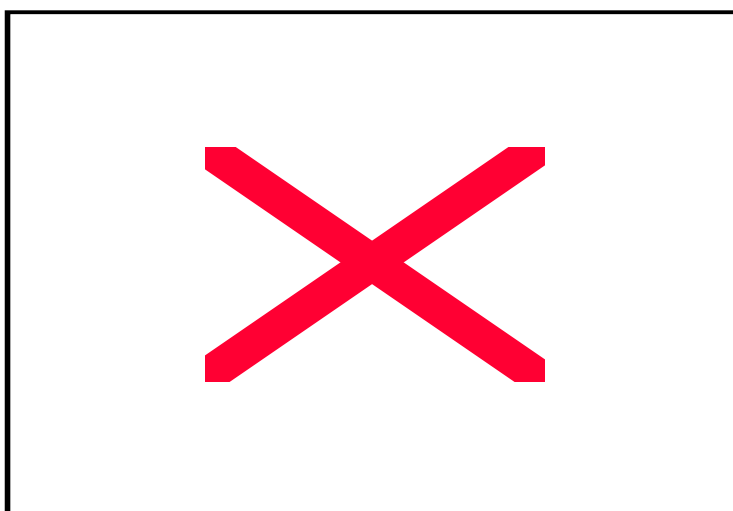
□

Figura 8

Musculatură linguală, șobolan lot 1 (infestat). Secțiune transversală printr-o extremitate a unui chist normal. Slabă imunomarcare a sarcoplasmei celulei „doică” comparativ cu reacția puternică înregistrată în structurile nervoase (săgeată) și în macrofagele interstițiale. (SPC anti – S-100, ob. 20)

Figura 9

Musculatură linguală, șobolan lot 3 (infestat + CPA). Chist cu aspect morfologic nemodificat, lipsa reacției în structura larvei. Reacție de control în pereții vasculari. (AMC anti-actină, ob.40)



(AMC anti-actină, ob.20)

□

Figura 10

Musculatură linguală, șobolan lot 3 (infestat + CPA). Chist distrus, marcarea unei zone reduse din structura larvei (săgeată). Reacție de control în pereții vasculari

Imunomarcarea cu SPC anti – S-100, prin reacțiile diferențiate obținute, poate constitui un marker pentru integritatea și viabilitatea larvelor sau pentru evidențierea conservării echilibrului stabilit între larvă și celula „doică” din interiorul chistului. Afirmatia se bazează pe imunomarcarea sarcoplasmei celulelor „diocă” din chisturile lotului 1 și lipsa acestei reacții la loturile 2 și 3.

În experimentele anterioare (5, 7), când lectinele au fost administrate concomitent cu infestarea experimentală, administrarea continuând până în ziua a șaptea după infestare, în cazul WGA s-a constatat o scădere a gradului de infestare, distrugerea a numeroase chisturi și pierderea puterii de infestare a larvelor. Rezultate asemănătoare au fost remarcate și în experimentul actual. Se poate desprinde ipoteza că, la un moment dat, lectinele utilizate intervin în faza de închistare musculară a larvelor de *T. spiralis*, provocând distrugerea chisturilor sau inducând modificări în structura larvelor. Rezultatele preliminare sunt promițătoare, în terapia/profilaxia trichinelozei conturându-se posibilitatea utilizării unor principii activi de origine vegetală și nu doar a substanțelor de sinteză.

Concluzii

Administrarea orală de WGA și intraperitoneală de CPA la șobolani infestați experimental cu *T. spiralis* a redus gradul de infestare cu 98,4%, respectiv cu 62,5%.

Consecutiv administrării de lectine (WGA și CPA), prin examen histologic și imunohistochimic s-a demonstrat alterarea structurii chisturilor de *T. spiralis*.

SPC anti – S-100 poate fi considerat marker al integrității morfologice al chisturilor musculare de *T. spiralis*, imunomarcând doar sarcoplasma celulelor „doică” din chisturile normale ale animalelor netratate cu lectine.

AMC anti – actină de leiomiocit poate fi considerat marker pentru integritatea structurală a larvelor de *T. spiralis*, imunomarcând diferit larvele din chisturile șobolanilor tratați cu lectine comparativ cu larvele normale.

Bibliografie

ALLEN, A.K.; DESAI, N.N.; NEVBERGER, A.; CREETH, J.M. – 1978, Properties of potato lectin and the nature of its glycoprotein linkages. *Biochem. J.*, 171, (665).

CAPO, Virginia; DESPOMMIER, D.D. – 1996, Clinical Aspects of Infection with *Trichinella* spp.. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 9, 1, (47-54).

KIM, C.W. – 1993, A decade of progress in Trichinellosis. *Trichinellosis*, Instituto Superiore di Sanita Press, Roma, Italy, (35-47).

LOWRI, U.O. – 1957, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, (265-267).

MILITARU, D.; MILITARU, Manuella; POP, Aneta; PAPUC, Camelia – 1995, Histopathological evaluation of lectins administration to rats infected with *Trichinella spiralis*. *World Veterinary Congress, Jokohama, Japan, Abstracts*, 277 (P20.1).

MILITARU, Manuella; MILITARU, D.; DIACONU, S.; LUNGU, Anca; TĂNASE, Dana; ANASTASIU, Irina – 1990, Aspecte histopatologice privind tratamentul trichinelozei experimentale la porc cu produsele RINTAL și VERMITAN. *Lucrări științifice I.A.N.B., seria C*, vol. XXXIII, (41-49).

POP, Aneta; MILITARU, Manuella; MILITARU, D.; PAPUC, Camelia; Ana de F. CARVALHO; ȘERBAN, M. – 1995, Efficacy of lectins administration on the experimental infection of rats with *Trichinella spiralis*. *Rev. Roum. Biochim.*, 32, 1-2, (75-79).

