

CRITOSPORIDIOSIS EXPERIMENTAL EN RATONES ALBINOS TRATADOS CON METILPREDNISOLONA

Experimental Cryptosporidiosis in Albino Mice Treated with Methylprednisolone

María del P. Hurtado^{*1}, Elizabeth Bruzual^{**}, Lucila Arcay^{***},
María A. de la Parte^{*} y Ana Brito^{**}

^{*}Cátedra de Microbiología, Escuela de Enfermería, Facultad de Medicina, UCV.

^{**}Escuela de Medicina "José María Vargas", Facultad de Medicina, UCV.

^{***}Instituto de Zoología Tropical, Facultad de Ciencias, UCV

Correo-E: maria.hurtado2009@gmail.com

Recibido: 05/08/10 - Aprobado: 27/01/11

RESUMEN

Cryptosporidium spp., es un coccidio intracelular de distribución mundial responsable de un síndrome entérico en el hospedador inmunocompetente e inmunocomprometido. Se estudio la influencia inmunosupresora de la metilprednisolona (MP) en la evolución de la criptosporidiosis experimental en ratones de laboratorio. Se utilizaron dos grupos de cuatro ratones machos jóvenes cada uno; el primer grupo incluyó cuatro ratones infectados y tratados en forma interdiaria con MP a dosis de 16 mg/kg de peso durante cuatro semanas y el segundo grupo (control) cuatro ratones infectados y no tratados. El inóculo fue preparado a partir de *Cryptosporidium* spp. obtenido de un paciente con criptosporidiosis intestinal, administrando un volumen de 0,1 mL a través de una sonda oro-esofágica. Cada semana, se recogieron muestras de heces para realizar diagnóstico de criptosporidiosis intestinal mediante la coloración de Kinyoun. Se estudió la diseminación visceral del parásito tomando semanalmente un animal de cada grupo para necropsia, obteniéndose muestras de cada órgano para estudio histopatológico. Las formas parasitarias observadas, en tejidos, fueron como sigue: ooquistes, esporozoítos falciformes, formas sexuales, merozoítos libres y trofozoítos. Durante

ABSTRACT

Cryptosporidium spp. is an intracellular coccidium distributed worldwide, which is responsible for an enteric syndrome in the immunoincompetent and immunocompromised host. This investigation was conducted to study the immunosuppressing influence of methylprednisolone (MP) during the course of experimental cryptosporidiosis in albino mice. A total of eight young male albino mice were studied and allotted into two groups: Group I: four infected mice treated every other day with a oral dose of 16 mg/kg of body weight of MP given through a stomach tube for four weeks; Group II (Control Group): four infected but untreated mice. A volume of 0.1 mL of an inoculum prepared from *Cryptosporidium* spp., obtained from stools of a patient with enteric cryptosporidiosis was given via a stomach tube. Every week, stool samples were collected for a diagnosis of intestinal cryptosporidiosis using the Kinyoun staining. The visceral dissemination of the parasite was studied by sampling weekly one animal of each group, and obtaining necropsy samples of each organ for histopathological examination. The parasitic forms observed in tissues were as follows: oocysts, falciform sporozoites, sexual forms, free merozoites, and trophozoites. The parasitic forms that prevailed

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

las cuatro semanas de estudio, la forma parasitaria predominante fue la de merozoíto libre. Se observó diseminación tisular en tráquea, glándula tiroidea, intestino, bazo y ganglio linfático. No se observó el parásito en esófago, hígado, riñón y pulmón. En el grupo control la presencia del parásito se mantuvo limitada al intestino. La supervivencia de los animales fue del 100% en ambos grupos durante el período de estudio. La respuesta observada en los animales tratados con MP se expresó de manera evidente en la diseminación tisular del parásito en órganos distintos del aparato digestivo, efecto no demostrado en los animales infectados y no tratados. Sin embargo, el número total de formas parasitarias cuantificadas, no presentó diferencias notables durante las cuatro semanas que duró el experimento, pero si pudo demostrar que no es necesario un alto grado de inmunosupresión para que *Cryptosporidium* spp. produzca formas extra-intestinales de la criptosporidiosis.

during the experiment were the free merozoites. Parasitic dissemination to trachea, thyroid gland, intestine, spleen, and lymphatic ganglion was seen. In contrast, the parasite was not observed in esophagus, liver, kidneys and lungs. In Group II, the presence of the parasite was confined to the intestines. Mice survival was 100% for both groups during the study period. The results show that the observed response of animals treated with MP was evident with the parasite dissemination in organs other than the digestive tract, effect not shown in animals from Group II. Nonetheless, the total number of parasitic forms did not show overt differences during the duration of the experiment, although it was demonstrated that a high degree of immunosuppression is not required to allow for the *Cryptosporidium* spp. dissemination in the extraintestinal forms of this disease.

(Palabras clave: *Cryptosporidium*, Salud pública, Ratones, Inmunodepresores, Heces)

(Key words: *Cryptosporidium*, Public health, Mice, Immunosuppressants, Faeces)

INTRODUCCIÓN

Cryptosporidium spp. es un protozooario coccidio intracelular de distribución geográfica mundial, de importancia en la medicina humana y veterinaria. Fue reconocido como patógeno entérico humano por Nime *et al.* (1976) y Meisel *et al.* (1976) y es el agente responsable de la criptosporidiosis, la cual es un síndrome entérico que cursa con diarrea en individuos inmunocompetentes e inmunocomprometidos (Cama *et al.*, 2007). El *Cryptosporidium* spp. además de infectar mamíferos, afecta también a los reptiles, peces y aves (Fayer, 2004) y se transmite de persona a persona (Koch *et al.*, 1985), de animal a humano y a través del agua contaminada, evidenciado por los grandes brotes descritos en los Estados Unidos y en el mundo entero (MacKenzie *et al.*, 1994; Fayer, 2004). Su transmisión en el medio familiar ha sido asociada

también a la presencia de cucarachas (*Periplaneta americana*), las cuales actúan como reservorio, cuando reportaron un caso de diarrea en un niño sin otro contacto comprobable y demostró la presencia de *Cryptosporidium* spp. en el aparato digestivo de la cucaracha (Zerpa y Huicho, 1994).

El alto potencial oportunista de *Cryptosporidium* spp. y la cronicidad y gravedad eventual de la infección en individuos inmunocomprometidos, han acentuado su importancia como un problema de salud pública global (Chacín-Bonilla y Cheng, 2008).

Además del síndrome diarreico clásico, se han asociado otras manifestaciones clínicas a la criptosporidiosis (Current y García, 1991; de la Parte-Pérez *et al.*, 2005) por su capacidad de diseminación a órganos y tejidos, especialmente en el hospedador inmunosuprimido, habiendo sido demostrada la presencia de este coccidio en muchos

órganos y sistemas de la economía, además del intestino. Entre los más frecuentemente descritos están la vesícula y el árbol biliar, el hígado, el páncreas y el sistema respiratorio, principalmente, especialmente en pacientes con infección por VIH/SIDA (Vakil *et al.*, 1996; Montero *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2004; Corti *et al.*, 2008).

Para estudiar la criptosporidiosis en el hospedador inmunocomprometido, se planteó utilizar un modelo animal experimental de inmunosupresión (Wang *et al.*, 2001) que permitiese inferir el comportamiento de esta parasitosis en el humano, por lo que se decidió utilizar la metilprednisolona (MP) como agente farmacológico inmunosupresor (Boumpas *et al.*, 1993).

Los corticosteroides son moléculas que disminuyen la linfopoyesis de los linfocitos B, e intervienen en el desarrollo ontogénico y selección del repertorio de los linfocitos T. Además, tienen una acción anti-inflamatoria importante ya que inhiben muchas funciones de los linfocitos TH1 y macrófagos e igualmente reducen la producción de citocinas TH1. También, afectan la recirculación de células principales y accesorias y pareciera que incrementan el número de células TH2 e inducen la apoptosis de timocitos durante su maduración (Mora de Orta y Corado, 2003).

Los efectos antiinflamatorios e inmunosupresores de los glucocorticoides son ejercidos mediante acción sobre las células del sistema inmune. A nivel de monocitos y macrófagos, inhiben la producción de interleucinas (IL), entre ellas: IL-1, IL-6 y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α). Sobre linfocitos T y B, con predominio de acción sobre los linfocitos T, afectan la producción de citocinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, TNF- α , factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF) y el interferón gamma (Krenski *et al.*, 2003; Schimmer y Parker, 2003).

La metilprednisolona es un glucocorticoide el cual, entre sus principales características está el efecto anti-inflamatorio importante e inmunosupresor, actuando sobre linfocitos, macrófagos, basófilos y células endoteliales. Ha sido utilizada como droga de primera línea para el control del rechazo agudo en la terapia de trasplantes de órganos, principalmente renales y hepáticos (Volpin *et al.*, 2002). También es de utilidad en el control de enfermedades autoinmunes y se describe su uso

en casos de complicaciones neurológicas del lupus eritematoso sistémico (Boumpas *et al.*, 1993).

En la terapia con glucocorticoides se han utilizado diversos regímenes de administración. Se reportan dosis de 1 a 1,5 g/d (Boumpas *et al.*, 1993) de aproximadamente 14 a 21 mg/Kg/peso/d) como dosis inmunosupresora (Schimmer y Parker, 2003); mientras que otros investigadores comparan esquemas de tratamiento con altas dosis de inicio y duración variable (Volpin *et al.*, 2002). También, se ha estudiado el mejor momento de inicio de la terapia inmunosupresora en modelos murinos para lograr la mayor tolerancia del trasplante en el tiempo (Wang *et al.*, 2001). Por todo ello, en el uso de estas drogas inmunosupresoras se debe considerar la dosis, la duración del tratamiento y el momento del inicio de la terapia en los casos de trasplante de órganos. Estos autores concluyen que los resultados de la inmunosupresión con MP muestra inhibición de ambos, la tolerancia espontánea y el rechazo del trasplante hepático en el modelo murino (Wang *et al.*, 2001).

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la metilprednisolona en el desarrollo de la criptosporidiosis experimental en hospedadores murinos inmunocomprometidos, mediante la observación de las formas parasitarias presentes, la diseminación del parásito en los tejidos estudiados, su presencia en las heces de ambos grupos y su correlación con los hallazgos de esta parasitosis en el humano inmunocompetente e inmunocomprometido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ocho ratones machos jóvenes pertenecientes a la cepa NMRI con peso promedio de 27,48 g divididos en dos grupos de cuatro ratones por tratamiento. Los animales, durante todo el período que duró el experimento, fueron alojados en jaulas en el bioterio del Instituto de Biología Experimental de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, bajo condiciones de temperatura, humedad, alimentación y régimen de luz-oscuridad de acuerdo con los lineamientos establecidos por Fondo Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación (FONACIT), para el cuidado de los animales en bioterios.

Inóculo

Se preparó a partir de heces provenientes de un caso de criptosporidiosis humana, preservadas en dicromato de potasio al 2,5%, las cuales se centrifugaron a 2000 g/5 min. La operación de centrifugación fue repetida resuspendiendo el precipitado en agua destilada, hasta aclarar el sobrenadante. Seguidamente, el precipitado fue resuspendido en sacarosa (Sheather, 1953), volviendo a centrifugar una sola vez. Posteriormente, se tomó el menisco con pipeta y de este material se ajustó la densidad parasitaria a 1×10^3 parásitos/mL, en un volumen de 0,1 mL administrado a cada animal mediante una sonda oesofágica.

Se conformaron dos grupos: el primer grupo de estudio incluyó cuatro ratones infectados y tratados con MP a dosis de 16 mg/Kg de peso corporal, administrada por la vía oral mediante una sonda oesofágica, a partir del día de la infección y posteriormente en forma interdiaria durante las cuatro semanas que duró el experimento. El segundo grupo (control) incluyó 4 ratones infectados y no tratados con MP.

Se mantuvo la observación diaria de los individuos de ambos grupos mientras que duró el estudio, el ejemplar que mostraba menor actividad física, fue seleccionado para sacrificio mediante inhalaciones de éter en cámara de sacrificio para anestesia inhalatoria. También, se recolectaron las heces de cada uno de ellos para la determinación de la presencia del parásito en las mismas y el diagnóstico de criptosporidiosis.

Para el estudio de la diseminación visceral del parásito se realizó necropsia y se tomaron muestras de diferentes regiones del tracto digestivo, aparato

respiratorio, bazo, riñón, glándula tiroides y ganglios linfáticos para el estudio histopatológico. Las muestras fueron fijadas en formol al 10% e incluidas en parafina, luego se realizaron cortes de 4 μ m de espesor, los cuales fueron teñidos de acuerdo a la técnica descrita por Kinyoun (1915).

De cada muestra de heces se preparó un extendido, el cual fue sometido a coloración por el método de Ziehl-Neelsen modificado para la observación microscópica de *Cryptosporidium* spp.

RESULTADOS

La cuantificación de las formas parasitarias observadas, se realizó mediante la observación de 20 campos a 1000 X y su registro determinado en forma de número total y porcentajes correspondientes.

Presencia de *Cryptosporidium* spp. en heces

Durante el período de estudio en las heces de los animales de ambos grupos se pudo evidenciar la presencia de estructuras ácido resistentes compatibles con ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

Diseminación tisular de *Cryptosporidium* spp.

Las formas parasitarias observadas en tejidos fueron: ooquistes, esporozoítos falciformes, formas sexuales, merozoítos libres y trofozoítos. Durante las cuatro semanas de estudio la forma parasitaria predominante fue la de merozoíto libre (Tabla 1).

Se observó diseminación tisular en tráquea, glándula tiroides, intestino, bazo y ganglio linfático (Figuras 1, 2 y 3).

Tabla 1. Distribución semanal de las formas parasitarias de *Cryptosporidium* spp. observadas en los tejidos de los animales tratados con metilprednisolona y controles.

Semana	Formas parasitarias observadas									
	Ooquistes		Esporozoítos falciformes		Formas sexuales		Merozoítos libres		Trofozoítos	
	MP	C	MP	C	MP	C	MP	C	MP	C
	%									
Primera	17	3	6	4	8	5	48	66	21	22
Segunda	17	13	0	18	0	8	83	18	0	43
Tercera	28	13	2	0	4	17	40	57	26	13
Cuarta	31	20	3	6	3	10	33	35	30	29

Porcentaje de formas parasitarias observadas/20 campos a 1000 X

MP = grupo tratado con metilprednisolona

C = grupo control

No se observó el parásito en esófago, hígado, riñón y pulmón. En el grupo control la presencia del parásito se mantuvo limitada al intestino.

Las formas parasitarias observadas en los tejidos de los animales del grupo control corresponden a formas de localización intestinal.

La supervivencia de los animales de ambos grupos fue del 100% durante el período de estudio.

DISCUSIÓN

En esta investigación se quiso establecer un modelo animal de inmunosupresión, que permitiese comprender el comportamiento de este Coccidio, el cual

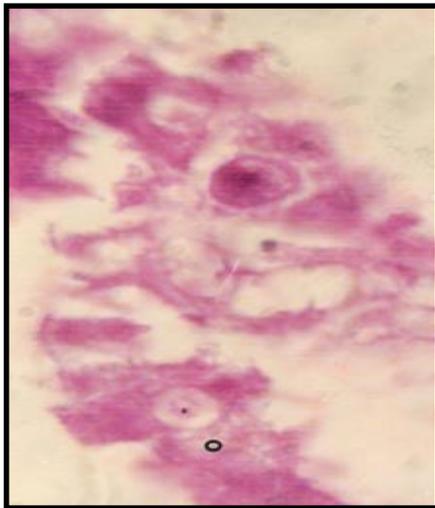


Figura 1. Sección de intestino mostrando ooquiste inmaduro (●) Hematoxilina eosina. 1000X



Figura 2. Vellosidad intestinal roma mostrando trofozoítos y un esquizonte (E) en una vellosidad vecina. Hematoxilina eosina. 1000X

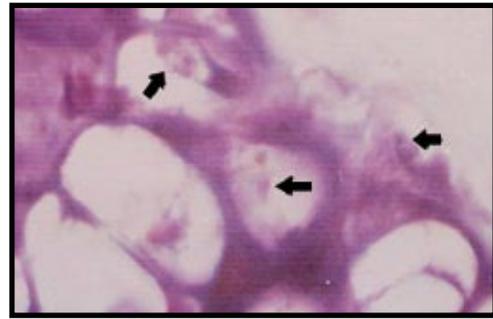


Figura 3. Sección de tráquea con parásitos dentro de los condrocitos. Hematoxilina Eosina. 1000X

puede causar diarreas en sujetos inmunocompetentes e inmunocomprometidos y estar presente también en portadores asintomáticos (de la Parte-Pérez *et al.*, 2005).

De manera general está establecido que diversos agentes químicos, incluidos los glucocorticoides, modifican la resistencia del hospedador ante las infecciones parasitarias. La MP, corticosteroide sintético con efectos antiinflamatorios e inmunosupresores a la dosis administrada, permitió elaborar un modelo experimental de inmunosupresión en ratones, para el estudio de la diseminación tisular del parásito.

En la terapia con glucocorticoides se han utilizado diversos regímenes de administración, pulsos (Shinn *et al.*, 1999), altas dosis de inicio y duración variable (Volpin *et al.*, 2002) e incluso altas dosis únicas (Miller y Schaefer, 2006), aunque todos los estudios tuvieron objetivos diferentes al presente trabajo, por lo que no son comparables.

La MP ha mostrado su eficacia en el control del rechazo en trasplantes de médula ósea (Shinn *et al.*, 1999) así como en el de órganos sólidos (Volpin *et al.*, 2002), tanto como en el estudio de la inmunosupresión y recuperación de la actividad inmune en roedores, frente a la infección experimental por *Cryptosporidium* spp. (Miller y Schaefer, 2006).

En este estudio, la respuesta observada en los animales tratados con MP se expresó de manera evidente en la diseminación tisular del parásito en órganos distintos del aparato digestivo, efecto no demostrado en los animales infectados y no tratados. Los efectos inmunosupresores de la MP se evidenciaron por la diseminación del parásito en el grupo tratado, comparado con los controles, en cuyo grupo el parásito se mantuvo confinado al intestino.

Cryptosporidium spp. presentó diseminación a

tráquea, glándula tiroideas, intestino, bazo y ganglio linfático y no se evidenciaron formas parasitarias en pulmón, riñón e hígado en los animales tratados con MP. Las criptosporidiosis extra-intestinales están bien descritas en los pacientes inmunocomprometidos, especialmente aquellos con VIH/SIDA (Vakil et al., 1996; Montero et al., 2001; Souza et al., 2004; Corti et al., 2008).

La metilprednisolona administrada a la dosis de 16 mg/kg, en forma interdiaria, produjo efecto en el curso de la criptosporidiosis experimental en ratones de laboratorio, evidenciado por la diseminación del parásito a tejidos y órganos diferentes del aparato gastrointestinal. Sin embargo, el número total de formas parasitarias cuantificadas, no presentó diferencias notables durante las cuatro semanas que duró el experimento, pero si se logró demostrar que, no hace falta un alto grado de inmunosupresión para que *Cryptosporidium* spp. produzca formas extra-intestinales de la criptosporidiosis.

Por otra parte, el efecto inmunosupresor de la MP no afectó la supervivencia de los animales de ambos grupos.

REFERENCIAS

- Boumpas, D.T.; Chrousos, G. P.; Wilder, R.L.; Cupps, T.R.; Balow, J.E. 1993. Glucocorticoid therapy for immune-mediated disease: basic and clinical correlates. *Ann. Intern. Med.*, 119:1198-1208.
- Cama, V.A.; Ross, J.M.; Crawford, S.; Hawaii, V.; Chávez-Váldez, R.; Vargas, D.; Ivar, A.; Ticona, E.; Navincopa, M.; Williamson, J.; Ortega, Y.; Gilman, R.H.; Bern, C.; Xiao, L. 2007. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV infected persons. *J. Infect. Dis.*, 196:684-691.
- Chacín-Bonilla, L.; Cheng-NG, R. 2008. Criptosporidiosis en pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana. *Interciencia*, 33:708-716.
- Corti, M.; Villafañe, M.F.; Muzzio, E.; Bava, J.; Abuín, J.C.; Palmieri, O.J. 2008. Pulmonary *Cryptosporidium* in AIDS patients. *Rev. Argent. Microbiol.*, 40:106-108.
- Current, W.L.; Garcia, L.S. 1991. Criptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 4:325-328.
- de la Parte-Pérez M. A.; Bruzual, E.; Brito, A.; Hurtado, M.P. 2005. *Cryptosporidium* spp. y Criptosporidiosis. *Rev. Soc. Venez. Microbiol.*, 25:6-14.
- Fayer, R. 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet. Parasitol.*, 126:37-56.
- Kinyoun, J. 1915. Kinyoun's method for acid-fast bacteria. *J. Amer. J. Public Health.*, 5:867.
- Koch, K.L.; Phillip, D.J.; Aber, R.C.; Current, W.L. 1985. Cryptosporidiosis in hospital personnel: evidence for person-to-person transmission. *Ann. Intern. Med.*, 102:593-596.
- Krenski, A.M.; Strom, T.B.; Bluestone, J.A. 2003. Inmunorreguladores: inmunosupresores, tolerógenos e inmunoestimulantes. En: Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Vol. II. 10ª ed., (Joel G. Hardman y Lee E. Limbird eds.) McGrawHill, Mexico, pp. 1479-1500.
- MacKenzie, W.R.; Hoxie, N.J.; Proctor, M.E.; Gradus, M.S.; Blair, K.A. et al. 1994. A massive out-break in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.*, 331:161-167.
- Meisel, J.L.; Perer, D.R.; Meligro, C.; Rubin, C.E. 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunocompromised patient. *Gastroenterology*, 70:1156-1160.
- Miller, T.A.; Schaefer III, F.W. 2006. Characterization of a single dose methylprednisolone acetate immune suppression model using *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum*. *Vet. Parasitol.* 141:66-83
- Montero, J.A.; Sinnott, J.T.; Holt, D.A.; Lloyd, C. 2001. Biliary Cryptosporidiosis: Current Concepts. *Infect. Med.*, 18:305-311.
- Mora de Orta, S.; Corado, J.A. 2003. Inmunología Actual. 1ª ed. Valencia, Venezuela. Alfa impresores. 245 p.
- Nime, F.A.; Burek, J.D.; Page, D.L.; Holscher, M.A.; Yardley, J.H. 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, 70:592-598.
- Pancieria, R.J.; Tomasen, R.W.; Garner, F.M. 1971. Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Pathol.* 8:479-484.
- Schimmer, B.P.; Parker, K.L. 2003. Corticotropina; esteroides de la corteza suprarrenal y sus análogos sintéticos; inhibidores de la síntesis y efectos de las hormonas suprarrenales. En: Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Vol. II. 10ª ed., (editores Joel G. Hardman y Lee E. Limbird) McGrawHill, Mexico, pp. 1667-1696.
- Sheather, A.L. 1953. The detection of intestinal protozoa by flotation technique. *J. Comp. Pathol.*, 36:268-275.
- Shinn, C.; Malhotra, D.; Chan, L.; Cosby, R.L.; Shapiro, J.I. 1999. Time course of response to pulse methylprednisolone therapy in renal transplant recipients with acute allograft rejection. *Am. J. Kidney Dis.*, 34:304-307.

- Souza, L.R.; Rodrigues, M.A.M.; Marcelli, J.; Kemp, R.; Mendes, R.P. 2004. Cryptosporidiosis of the biliary tract mimicking pancreatic cancer in an AIDS patient. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 37:185-187.
- Vakil, N.B.; Schwartz, S.M.; Buggy, B.P.; Brummitt, C.F.; Kherallah, M.; Letzer, D.M.; Gilson, I.H.; Jones, P.G. 1996. Biliary Cryptosporidiosis in HIV-Infected people after the waterborne outbreak of Cryptosporidiosis in Milwaukee. *N. Eng. J. Med.*, 334:19-22.
- Volpin, R.; Angeli, P.; Galio, A.; Fasolato, S.; Néri, D. *et al.* 2002. Comparison between two high-dose methylprednisolone schedules in the treatment of acute hepatic cellular rejection in liver transplant recipients: a controlled clinical trial. *Liver Transpl.*, 6:527-534.
- Wang, C.; Sun, J.; Sheil, A.; McCaughan, G.W.; Bishop, G.A. 2001. A short course of methylprednisolone immunosuppression inhibits both rejection and spontaneous acceptance of rat liver allografts. *Transplantation*, 72:44-51.
- Zerpa, R.; Huicho, L. 1994. Childhood Cryptosporidial Diarrhea associated with identification of *Cryptosporidium* sp. in the cockroach *Periplaneta americana*. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 13:546-548.