

# EFECTOS DEL USO DE HARINA DE LOMBRIZ *Eisenia* spp. SOBRE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL ESPECÍFICA Y PRESENCIA DE LESIONES INTESTINALES EN RATONES

## Effects of the Use of Earthworm *Eisenia* spp. Flour on the Specific Humoral Immune Response and the Presence of Intestinal Lesions in Mice

Gary Tsai<sup>1</sup>, Lérica Borges<sup>2</sup>, Pierina Petrosino<sup>3</sup>, Guillermo Bianchi<sup>4</sup>, Ana Luisa Medina<sup>5</sup> y José Angel Cova<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> University of California, Davis, EUA. <sup>2</sup> Instituto de Inmunología Clínica, Universidad de Los Andes. <sup>3</sup> Departamento de Anatomía Patológica, Universidad de Los Andes. <sup>4</sup> Facultad de Humanidades, Universidad de Los Andes. <sup>5</sup> Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Venezuela. \*E-mail: jacova@ula.ve.

### RESUMEN

La búsqueda de nuevas fuentes proteicas no convencionales, constituye un objetivo clave para la alimentación animal. Sin embargo, estas nuevas proteínas pueden inducir tras su consumo, la aparición de fenómenos no deseados. En este estudio se evaluaron los efectos colaterales, el potencial alergénico midiendo los niveles séricos de IL-4, IgE e IgG, así como las alteraciones histológicas del intestino delgado, de dietas basadas en harina de pescado con sustituciones parciales de 80% (G1), 65% (G2) y 35% (G3) de harina de lombriz del género *Eisenia* spp. Ocho ratones C57BL7 por grupo fueron alimentados con las dietas a base de harina de lombriz y ocho ratones con la dieta estándar (GC), durante 28 días. Al finalizar el período experimental se obtuvieron muestras de sangre para la determinación de las IgE e IgG antígeno-específicas. Posteriormente, los animales fueron sacrificados y se obtuvo el intestino delgado para su estudio histopatológico. Se observó una alta mortalidad (4/8) en los ratones G1, con diarrea y piloerección como hallazgos frecuentes. Los niveles séricos de IL-4 fueron significativamente más bajos en los grupos G2 y G3, con respecto al control ( $P < 0,001$ ). Para el caso de la IgE antígeno-específica no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $P > 0,05$ ) y la IgG antígeno-específica fue significativamente mayor en los grupos experimentales, comparado con el grupo control ( $P < 0,05$ ). No se observaron alteraciones inflamatorias, tumorales ni de alergia alimentaria en los G2 y G3. Las dietas suplementadas con concentraciones de 65% o menos, con harina de lombriz fueron toleradas por los ratones y no modificaron el tejido intestinal. Se de-

ben realizar más estudios para conocer el riesgo de otros efectos colaterales con el uso de proteínas no convencionales en la alimentación animal.

**Palabras clave:** Nutrición animal, lombriz roja californiana, inmunoglobulina E, alergia alimentaria.

### ABSTRACT

The search for new non-conventional proteins is an important subject for animal nutrition. However, side effects could be induced after consumption of these new proteins. In this study, it were evaluated the side effects, allergy induction through measurement of IL-4, IgE and IgG levels in sera, and small bowel modifications caused by diets with fish flour and partial substitution of 80% (G1), 65% (G2) and 35% (G3) of earthworm meal from *Eisenia* spp genus. Eight C57BL7 mice in each group were fed with food based in earthworm flour and eight mice fed using standard diet during 28 days. At the end of the experiments, a blood sample to determinate antigen-specific IgE and IgG in sera was obtained. Following, animals were killed and sample of small bowel was taken for histopathological studies. It was observed a high mortality (4/8) in G1 group mice, presenting diarrhea and hair stand as frequent symptoms. The IL-4 serum levels were significantly lower in G2 and G3 group, compared to control ( $P < 0.001$ ). There is no statistically significant difference in antigen-specific IgE levels between groups ( $P > 0.05$ ). The antigen-specific IgG level was significantly higher in the experimental groups compared to control group ( $P < 0.05$ ). Inflammatory process, tumors or food allergy in G2 and G3 groups were not founded. The diets supplemented with 65% or less with *Eisenia* spp. earthworm flour were tolerate by the mice and no alteration in the intestinal tis-

sue was observed. Further studies must to be done in order to know the risk of the adverse effects when the non-conventional proteins are used to feed animals.

**Key words:** Animal nutrition, Californian red earthworm, immunoglobulin E, food allergy.

## INTRODUCCIÓN

La importancia de la proteína en la alimentación acuícola y de animales de engorde es reconocida por la industria que elabora alimentos para animales, ya que ella es incluida en todas las fórmulas diseñadas para la alimentación animal. Es por ello que existe una creciente presión por hallar nuevos sustitutos proteicos -de alto valor biológico, fáciles y económicos de producir e inocuos- para las dietas de animales. Una de las alternativas más promisorias son los productos a base de soya (*Glycine max*), alimento de soya o concentrado proteico de soya. Sin embargo, el uso de este vegetal tiene algunos inconvenientes relacionados con la digestibilidad proteica [8], la biodisponibilidad de fósforo [18], presencia de factores anti-nutricionales y mal sabor [13], entre otros, lo cual trae como consecuencia retardo del crecimiento animal, altas tasas de conversión del alimento y en algunos casos, desarrollo de estados inflamatorios de la mucosa gastrointestinal, en especial inflamación alérgica y dentro de ésta, la inflamación gastrointestinal eosinofílica asociada con alergia alimentaria.

El principal mecanismo asociado con las reacciones alérgicas, bien descrito a partir del modelo murino, involucra la participación de la inmunoglobulina E (IgE) y la interleucina-4 (IL-4) [16]. De acuerdo a este modelo, en el animal previamente sensibilizado, la IgE unida a su receptor Fc epsilon (FcεR), expresado en diferentes células: mastocitos, basófilos y eosinófilos, se une al alérgeno -proteína alimentaria- e induce la degranulación de estas células, las cuales liberan sus mediadores (histamina, serotonina, factor activador de plaquetas y leukotrienos, entre otros) responsables de la reacción inflamatoria alérgica (incremento de la permeabilidad vascular, edema, diarrea, mala absorción, entre otros) [5]. Un segundo mecanismo de anafilaxia murino, donde parece intervenir la inmu-

noglobulina G (IgG) y el receptor 3 para el fragmento Fc gamma (FcγRIII), ha sido descrito como independiente de la IgE [12]. En este contexto, los sustitutos proteicos no convencionales para la alimentación animal deben ser estudiados, no solamente desde el punto de vista de su aprovechamiento, sino también de sus probables y múltiples efectos adversos.

El valor nutritivo de la harina de lombriz ha sido previamente estudiado en la alimentación de peces, obteniéndose resultados alentadores, que dependen de la especie de la lombriz y del nivel de inclusión de su harina en la dieta [15, 17, 19]. Estos y otros datos, incluyendo su manejo sencillo y bajo costo de producción hacen probable su uso como componente de alimentos para diferentes especies, tales como roedores, aves, peces, reptiles, anfibios, mascotas domésticas, entre otros; así como su empleo como fertilizante orgánico para la producción de algas unicelulares suministradas como alimento a las larvas [14]. Sin embargo se desconoce la capacidad alergénica y el daño a la mucosa intestinal que esta harina pudiera ocasionar al ser consumida.

Usando el modelo murino se ha estudiado el efecto que una dieta con sustituciones a base de harina de lombriz tiene en la inducción de enfermedad gastrointestinal, producción de IgE antígeno-específica y alergia alimentaria.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación de las dietas

Se prepararon tres dietas experimentales mezclando diferentes porcentajes de la harina de la lombriz (HL) y completando el porcentaje faltante con harina de pescado artesanal (HPA), preparadas en el Departamento de Ciencias de los alimentos en la Universidad de Los Andes, Venezuela, constituyendo esta mezcla la fuente proteica. Se adicionaron además, vitaminas, minerales y ácidos grasos para obtener dietas acordes con las necesidades animales.

La dieta estándar o control (GC) usada fue un producto comercial Ratarina® granulado, adquirido localmente (TABLA I).

La dieta 1 (G1) contenía 80% de HL y 20% de HPA; la dieta 2 (G2) tuvo 65% de HL y 35% de HPA; y la dieta 3 (G3)

TABLA I  
INGREDIENTES INCLUIDOS EN LA PREPARACIÓN DE LAS DIETAS

Contenido	GC*	G1	G2	G3
Fuente Proteica	Harinas de ajonjolí, soja, pescado, leche en polvo, maíz y sorgo	Harinas de pescado y lombriz	Harinas de pescado y lombriz	Harinas de pescado y lombriz
Sales	Carbonato y fosfato de calcio, sal	Fosfato de calcio, sal	Fosfato de calcio, sal	Fosfato de calcio, sal
Vitaminas	A, B1, B2, B12, D, E, Niacina, Biotina	A, B1, B2, B12, D, E, Niacina, Biotina	A, B1, B2, B12, D, E, Niacina, Biotina	A, B1, B2, B12, D, E, Niacina, Biotina
Otros	Antioxidantes y antibiótico			

GC: Grupo control; G1: 80% de HL como fuente proteica; G2: 65% de HL como fuente proteica; G3: 35% de HL como fuente proteica.\*Inserto del empaque.

se preparó con 35% HL y 65% HPA. Todas las dietas experimentales contenían los demás ingredientes anteriormente mencionados y a las mismas concentraciones para obtener dietas isoproteicas e isocalóricas (TABLA I).

Posterior a la preparación, las dietas fueron analizadas para conocer sus componentes (proteínas, humedad, cenizas, lípidos y carbohidratos) mediante el método de la Association of Official Analytical Chemistry (AOAC) que se describe a continuación [1]. El porcentaje de proteína se calculó a partir de 1 gr de cada muestra, la cual se mezcló con 25 mL de ácido sulfúrico y perlas de vidrio. Esta mezcla fue colocada en un digestor eléctrico (Vapodest, Gerhardt, Alemania) hasta su total digestión. Posteriormente se añadieron 400 mL de agua destilada, 75 mL de hidróxido de sodio y se repitió otro paso de digestión. El producto digerido fue resuspendido en una mezcla de ácido sulfúrico e hidróxido de sodio y se midió la reacción usando como indicador el rojo de metilo. El valor obtenido se multiplicó por el factor de conversión (6,25) obteniéndose el porcentaje de proteína presente en la muestra.

Para la cuantificación de los lípidos se usaron 5 grs de cada muestra que fueron colocadas en una solución de éter. Esta mezcla fue sometida a extracción con un extractor de grasas (Extractor solvent SER 148, Velp Scientific, EUA), hasta su consumo. Una vez terminado el proceso se evaporó el solvente y por diferencia de peso se calculó la concentración de lípidos.

La humedad se obtuvo a partir de calentar 1 gr de cada muestra en una mufla (Box furnace, Lindberg Blue, EUA) a 100°C durante varias horas. Una vez que la muestra alcanzó un peso constante se estimó la pérdida de agua por diferencias de peso inicial y final. Las cenizas fueron calculadas a partir de la incineración de las muestras en una mufla a 600°C durante varias horas. A partir del peso final y del inicial se obtuvo el porcentaje de cenizas. Una vez terminado el proceso las harinas fueron empacadas y almacenadas a 4°C en nevera (Raetone, CRC, EUA) hasta su uso.

## Animales

Un total de 32 ratones (*Mus musculus*) C57BL7, de 4 semanas de edad, recién destetados, fueron distribuidos aleatoriamente en 4 grupos -de 8 ratones cada uno- para recibir la alimentación estándar (GC) y las tres dietas experimentales (G1, G2 y G3). Los animales fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Inmunología Clínica de la Universidad de Los Andes, con una temperatura (T) promedio de 22°C, ciclos alternos de luz-oscuridad, de 12 horas cada uno, recibiendo agua y alimento *ad libitum* por 28 días. El estudio fue aprobado por un comité local de ética animal.

Durante el estudio se llevó un registro diario de efectos adversos: piloerección, temblor, disminución de la motilidad y diarrea, así como de la mortalidad en cada grupo. Al final, los ratones fueron anestesiados usando ketamina por vía intraperi-

toneal, y mediante punción cardíaca se obtuvo una muestra de sangre de cada animal para medir los niveles séricos de IL-4, IgE e IgG. Posteriormente, los ratones fueron sacrificados -por fractura cervical- y el intestino delgado fue removido y colocado en una solución de formol al 10% para su estudio histopatológico.

## Determinación de la concentración sérica de IL-4

La IL-4 fue cuantificada usando un ensayo comercial (mouse IL-4, elisa IBL, Alemania), basado en la técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) tipo sándwich o de captura, siguiendo las especificaciones del fabricante. Los sueros de los ratones fueron colocados, sin diluir, en pozos de la placa de poliestireno recubiertos con un anticuerpo monoclonal anti IL-4 de ratón. Posteriormente se agregó un anticuerpo anti IL-4 conjugado con biotina y se incubó por 2 horas a temperatura (T) ambiente. Transcurrido este tiempo, las placas fueron lavadas 3 veces, con solución de lavado (Wash buffer, IBL, Alemania) y luego se añadió la estreptavidina conjugada con la enzima peroxidasa de rábano (HRP). Después de una hora de incubación a T ambiente y tres lavados, se agregó el sustrato 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y se incubó durante 10 minutos, en la oscuridad. Al final se añadió la solución de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N) y la reacción colorimétrica desarrollada fue medida en un espectrofotómetro modelo Sunrise (Tecan, Austria), usando una longitud de onda de 450 nm. Los valores, expresados en densidades ópticas, fueron transformados en pg/mL usando una curva de referencia.

## Determinación de los niveles séricos de Inmunoglobulinas específicas

Los niveles séricos de IgE e IgG específicos para la proteína de lombriz fueron medidos mediante la técnica del ELISA [11]. El extracto de la carne de lombriz, a una concentración de 5 µg/mL, disuelto en solución de unión (0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 11; 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8,1; en agua destilada) fue añadido a placas de ELISA de 96 pozos, quedando una concentración final de 1 µg/pozo, e incubado durante toda la noche a 4°C. Después de 10 lavados con solución de lavado y una hora de bloqueo con caseína al 10%, los sueros de los ratones, a diluciones de 1:100 y 1:500 para IgG y, 1:22 y 1:66 para la IgE; se incubaron en estas placas por 1 hora. Posterior a cinco lavados con buffer fosfato y tween 20 a concentración de 0,2%, las placas fueron incubadas con una anti-inmunoglobulina de ratón de tipo E y de tipo G (anti mouse-IgE y anti-mouse IgG) conjugada con la enzima peroxidasa de rábano (HRP), por 1 hora a temperatura ambiente. Después de una serie de cinco lavados se agregó el sustrato enzimático TMB y se incubó por 15 minutos. Al final de este periodo se agregó la solución de parada y las placas fueron leídas en el espectrofotómetro usando una longitud de onda de 450 nm. La intensidad del color emitida en la reacción y expresada en unidades de densidad óptica (DO), es directamente proporcional a la concentración de las IgE e IgG presentes en las muestras [11]. Los con-

troles negativos fueron los ratones alimentados con la dieta estándar, que nunca consumieron la HL. Un nivel elevado de inmunoglobulinas se definió como aquel valor mayor al promedio de DO más 2 desviaciones estándar del grupo control [11]. De esta manera se determinó si hubo producción importante de IgE e IgG en los ratones alimentados con harina de lombriz.

### Estudio histológico del intestino delgado

Las muestras de intestino delgado fueron mantenidas en una solución de formol al 10% hasta su estudio. Una vez retiradas de esta solución, el tejido fue embebido en parafina y cortados con un micrótopo (Mino, Damon IEC, EUA) a un grosor de 0,3-0,4  $\mu\text{m}$ . Los cortes fueron colocados en láminas y coloreados con hematoxilina y eosina (H&E) siguiendo un protocolo previamente descrito [9]. El tejido coloreado fue observado por microscopía óptica (microscopio Nikon Labofhot 2, Alemania) usando aumentos de 20x y 40x. Las alteraciones histológicas relacionadas con enfermedad intestinal alérgica asociada al eosinófilo fueron clasificadas usando el esquema de Collins que incluyen, entre otros, presencia de más de 20 eosinófilos por campo de alto poder, eosinófilos intraepiteliales en la muscularis mucosa, submucosa o ambos; degeneración epitelial y cambios regenerativos [3]. Se analizaron todos los segmentos intestinales.

### Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos en los grupos experimentales fueron comparados con el grupo control. En cada caso se calcularon los promedios, las desviaciones estándares y se usaron el test de ANOVA y la prueba *a posteriori* de Duncan, para establecer diferencias estadísticamente significativas. Un valor de  $P < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efectos secundarios en los ratones alimentados con dietas suplementadas con harina de lombriz

La presencia de uno o más de los efectos adversos mencionados, en los grupos estudiados fue considerada como efecto secundario. Así se observó que los animales del grupo G1 (80%HL y 20%HPA) presentaron efectos adversos tras la alimentación dados principalmente por diarrea y piloerección que aparecieron los días 7 y 8 del estudio. La mortalidad en este grupo fue del 50% (4/8). Los ratones de los grupos G2 y G3 se comportaron igual que el control, es decir, no presentaron efectos adversos y ningún animal murió durante el estudio.

Si bien es cierto que la alimentación de los animales requiere de nuevas fuentes nutricionales ya que las fuentes alimentarias existentes, basadas en harina de pescado escasean cada vez más, debido entre otras cosas, al calentamiento global y al cambio climático, también es cierto que estas nuevas fuentes alimentarias deben ser probadas en ensayos experimentales.

El valor nutricional de las harinas obtenidas a partir de diferentes anélidos -*Dendrodrilus subrubus*, *Eisenia foetida*, *Allo-*

*lobophora longa* y *Lumbricus terrestris*- ha demostrado ser elevado, con aproximadamente 60-65% de proteína en base a materia seca, un 10% de lípidos (principalmente ácidos grasos saturados), la mayoría de los aminoácidos esenciales, minerales y oligoelementos, lo que la convierte en un excelente suplemento esencialmente proteico en la alimentación animal [7, 15, 17]. Estas características ubican a este tipo de harina como suplemento de dietas para animales, equiparables con la harina de pescado, carne, soya, girasol (*Helianthus annuus*) y algodón (*Gossypium spp*). Sin embargo, a pesar de estas ventajas, en este estudio se demostró que los ratones alimentados con una formulación que contenía harina de lombriz al 80% (como fuente proteica) provocó una elevada mortalidad, por lo que este tipo de formulaciones debe evitarse y nuevos estudios deberán ser realizados, a fin de establecer la causa directa de éste efecto. La presencia de diarrea en estos animales apunta hacia una reacción adversa de tipo gastrointestinal (GI). No fue posible realizar estudios histológicos ni determinaciones séricas en los animales muertos.

Las reacciones adversas de tipo GI han sido también descritas en peces, como el salmón atlántico (*Salmon salar*), donde una dieta suplementada con soya germinada fue capaz de inducir una enteritis sub-aguda no infecciosa, que mejoró al retirar esta proteína vegetal de la dieta del pez, y donde un mecanismo inmunológico está involucrado [2].

### Niveles séricos de IL-4 en ratones alimentados con suplementación parcial con HL

El promedio de los niveles séricos de IL-4 para cada grupo en estudio se muestra en la FIG. 1. Los valores séricos de IL-4 en los grupos experimentales fueron significativamente más bajos que en el grupo control ( $P < 0,001$ ). Estos resultados son similares a los reportados por Frossard y col. en ratones alimentados con huevo y toxina colérica [6], pero en ese estudio, los ratones fueron alimentados con dosis mayores del antígeno mediante sondaje y las mediciones de citosinas se realizaron en suero y en el tejido linfóide asociado a tracto gastrointestinal del ratón.

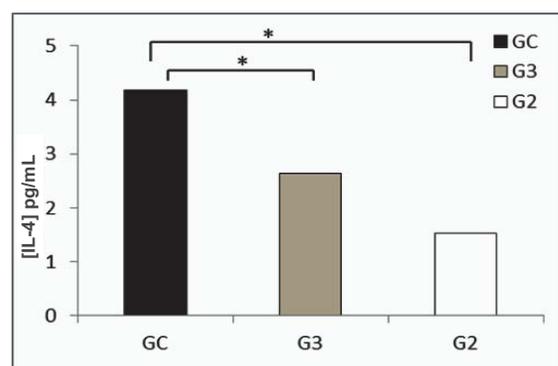


FIGURA 1. NIVELES SÉRICOS DE IL-4 EN RATONES CONTROL (GC) Y ALIMENTADOS CON DIETAS SUPLEMENTADAS CON HL (G2: 65% DE HL COMO FUENTE PROTEICA; G3: 35% DE HL) DURANTE 28 DÍAS. \*DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS.

En los estudios de respuesta inmune a antígenos alimentarios se ha observado que, los ratones sensibilizados muestran un patrón de respuesta de tipo Th2 (con aumento de IL-4, IL-10 y producción de IgE), en tanto que los animales que toleran el antígeno muestran un patrón de respuesta Th1 caracterizado por niveles mayores de IFN- $\gamma$ , disminución o ausencia de IL-4 y producción de IgG [6, 10]. Estas dos interleucinas tienen efecto antagónico entre ellas, es decir, que niveles más altos de IFN- $\gamma$  contra regulan negativamente la producción de IL-4 y viceversa.

Probablemente, los grupos G2 y G3 que presentaron los niveles significativamente más bajos de IL-4 produjeron nivel mayor de IFN- $\gamma$  posterior al reto antigénico oral y esto a su vez indujo la producción de IgG. Existen normalmente niveles séricos circulantes de IL-4 e IFN- $\gamma$  manteniendo lo que se denomina homeostasis inmune.

#### Efecto de dietas suplementadas con HL en la producción de inmunoglobulinas antígeno-específicas

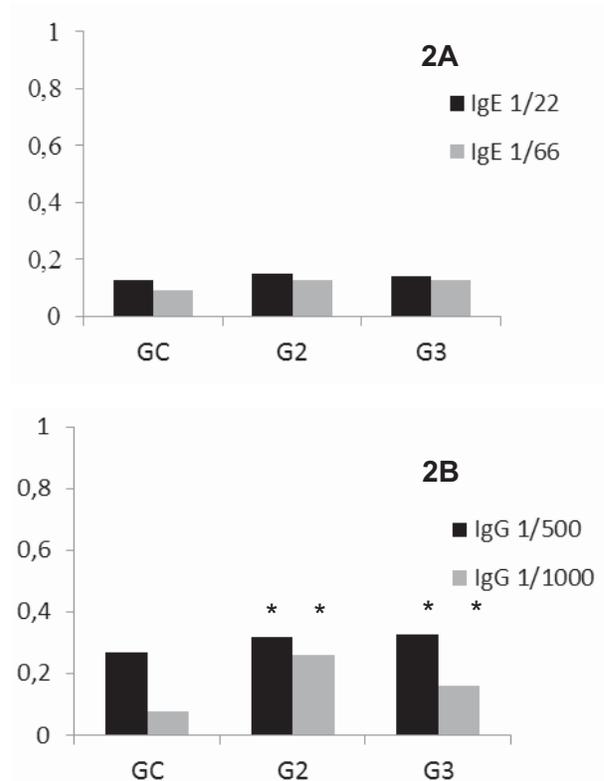
Debido a la relación que existe entre los niveles de IL-4, la producción de IgE y los fenómenos alérgicos, se determinaron las concentraciones séricas de esta inmunoglobulina, así como las de IgG, la cual no participa en los mecanismos alérgicos dependientes de IgE.

La producción de IgE e IgG medida en los sueros de los ratones se muestran, como promedios por grupo, en la FIG. 2. Para el caso de la IgE antígeno específica (FIG. 2A), al comparar los promedios entre los grupos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ); en tanto que para la IgG antígeno específica (FIG. 2B), los valores promedios fueron significativamente mayores en los grupos experimentales, comparados con el grupo control ( $P < 0,05$ ). Estos datos demuestran que las dietas suplementadas con HL incrementaron los niveles séricos de IgG y no modificaron la producción de IgE antígeno-específica. La producción de IgG es regulada por los niveles de IFN- $\gamma$  producidos por los linfocitos T/CD4+; entonces es posible que un aumento sérico de esta interleucina en los grupos experimentales indujera mayor producción de IgG, y a su vez regulara negativamente a la IL-4 ocasionando una baja producción de IgE [5]. En este estudio solo se determinaron los niveles de IL-4.

En la FIG. 2 se aprecia una señal en los grupos controles que no consumieron la harina de lombriz. Un fenómeno de reacción cruzada de algunos anticuerpos contra la proteína pudiera ser la explicación a esta observación.

#### Alteraciones histológicas del intestino delgado y enfermedad intestinal asociada al eosinófilo (EIAE) en ratones alimentados con dietas suplementadas con HL

El estudio de los intestinos reveló detalles estructurales importantes. De acuerdo a los criterios usados para clasificar la enfermedad intestinal inflamatoria asociada al eosinófilo, no se observaron dichas alteraciones en las muestras examina-

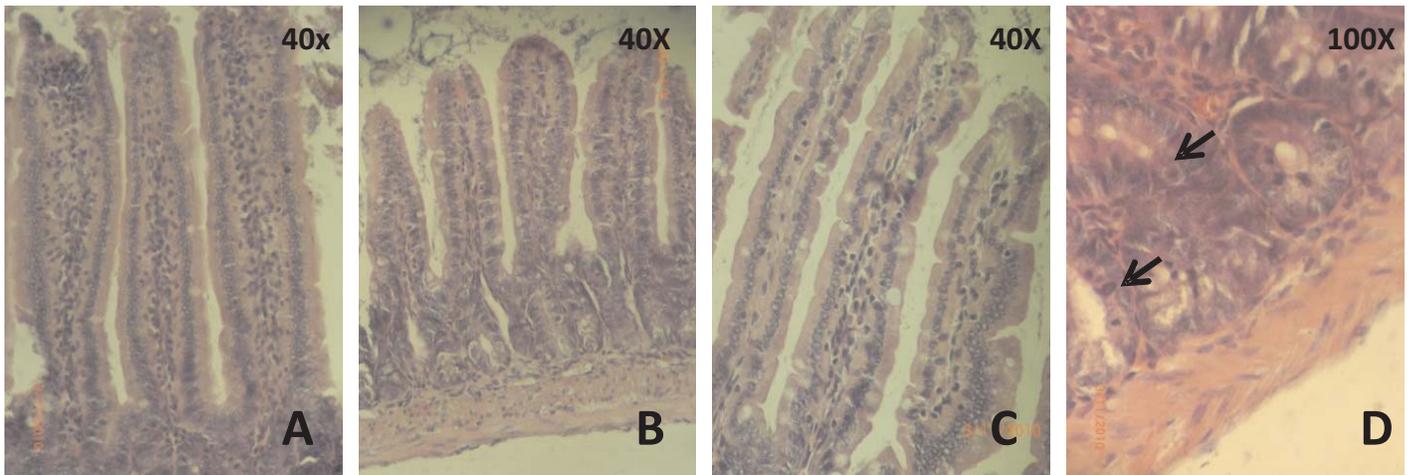


**FIGURA 2. NIVELES SÉRICOS DE IgE ANTÍGENO ESPECÍFICA DE LOS RATONES ALIMENTADOS CON DIETAS SUPLEMENTADAS CON HL [G2 Y G3] (2A). CONCENTRACIÓN DE IgG ANTÍGENO ESPECÍFICA SÉRICA EN LOS GRUPOS GC, G2 Y G3 (2B). GC: GRUPO CONTROL; G2: 65% DE HL COMO FUENTE PROTEICA; G3: 35% DE HL COMO FUENTE PROTEICA; IgE: INMUNOGLOBULINA E ANTÍGENO-ESPECÍFICA; IgG: INMUNOGLOBULINA G ANTÍGENO-ESPECÍFICA. \* $P < 0,05$ .**

das y el número promedio de eosinófilos, en cada grupo, nunca fue mayor de 5 células por campo.

Es de hacer notar que en el grupo 3 (alimentado con 35% HL) se observaron discretas alteraciones tisulares encontrando en tres de los 8 ratones estudiados, la presencia de atipias y mitosis del tejido glandular, sin distorsión de la arquitectura del órgano (FIG. 3). En todos los grupos estudiados, no se observaron modificaciones histológicas severas. En otro estudio, tampoco se observaron alteraciones histológicas hepáticas, solo una elevación en los niveles de colesterol total en plasma en los animales alimentados con distintas formulaciones que incluyeron harina de lombriz [4].

Estos resultados revelan que la inclusión de la harina a base de la lombriz *Eisenia* spp, constituye una alternativa no alergénica de alimentación animal. A pesar de estos resultados alentadores se deben continuar los estudios, utilizando esta fuente nutricional, antes de formular dietas seguras para la nutrición animal.



**FIGURA 3. SECCIONES DE INTESTINO DELGADO DE RATONES ALIMENTADOS CON LA DIETA ESTANDAR (A), DONDE SE APRECIA LA DISTRIBUCION NORMAL DEL TEJIDO. EN LOS RATONES ALIMENTADOS CON DIETAS CON SUSTITUCION PARCIAL DE 65% DE HL (B) Y 35% DE HL (C) NO SE OBSERVARON INFILTRADOS EOSINOFILOS, INFLAMATORIOS NI TUMORALES. EN EL GRUPO 3, TRES DE LOS OCHO RATONES MOSTRARON ALGUNAS MITOSIS (D) SIN ALTERACION DEL TEJIDO (FLECHAS NEGRAS).**

## CONCLUSIONES

La lombriz podría ser una fuente interesante de proteína animal que serviría para ayudar a solucionar algunos de los problemas sobre nutrición animal, pero se requieren estudios más amplios antes de su comercialización. Dentro de estos estudios están los relacionados con la seguridad e inocuidad alimentaria.

## AGRADECIMIENTO

Al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT) de Venezuela (proyecto G 200 5000 869) y al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes de la Universidad de Los Andes (proyecto M-843-05-03-A).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. Official Methods of Analysis of the A.O.A.C. 16 Ed. Arlington, VA, USA. 17-43 pp. 1999.
- [2] BAEVERFJORD, G.; KROGDAHL, A. Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, Salmon solar, distal intestine: a comparison with the intestine of fasted fish. **J Fish Dis.** 19: 375-378. 1996.
- [3] COLLINS, M. Histopathology associated with eosinophilic gastrointestinal diseases. **Immunol Allergy Clin N Am.** 29: 109-117. 2009
- [4] COVA, JA.; MEDINA, AL.; PETROSINO, P.; BASTARDO, H.; BIANCHI, G.; RONDON, M.; BORGES, L. Effect of diet supplemented by earthworm (*Eisenia andrei*) flour on growth and hepatic parameters in mice. **Bol Centro Invest Biol.** 42: 73-84. 2008.
- [5] FINKELMAN, F.; ROTHENBERG, M.; BRANDT, E.; MORRIS, S.; STRAIT, R. Molecular mechanism of anaphylaxis: Lessons from studies with murine models. **J Allergy Clin Immunol.** 115: 449-457. 2005.
- [6] FROSSARD, CH.; TROPIA, L.; HAUSER, C.; EIGENMANN, PH. Lymphocytes in Peyer patches regulate clinical tolerance in a murine model of food allergy. **J Allergy Clin Immunol.** 113: 958-964. 2004.
- [7] GARCIA, D.; COVA, L.; CASTRO, A.; MEDINA, M.; PALMA, J. Efecto del sustrato alimenticio en la composición química y el valor nutritivo de la harina de la lombriz roja (*Eisenia* spp.). **Rev. Cientif. FCV LUZ.** XIX (1): 55-62. 2009.
- [8] GLENCROSS, B.; CARTER, C.; DUIJSTER, N.; EVANS, D.; DODS, K.; MCCAFFERTY, P.; HAWKINS, W.; MAAS, R.; SIPSAS, S. A comparison of the digestibility of a range of lupin and soybean protein products when fed to either Atlantic salmon (*Salmo salar*) or rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquacult.** 237: 333-346. 2004.
- [9] LEE, G. Special staining techniques. In: **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces.** Institute of Pathology. 3 Ed., McGraw-Hill Book Company, WA, USA. 274-283 pp. 1968.
- [10] LI, X-M.; SEREBRISKY, D.; LEE, S-Y.; HUANG, C-K.; BARDINA, L.; SCHOFIELD, B. A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. **J. Allergy Clin. Immunol.** 106: 150-158. 2000.
- [11] MEDINA, AL.; COVA, JA.; VIELMA, RA.; PUJIC, P.; CARLOS, MP.; TORRES, JV. Immunological and chemical analysis of proteins from *Eisenia foetida* earthworm. **Food Agric. Immunol.** 16: 1-9. 2004.

- [12] MIYAJIMA, I.; DOMBROWICZ, D.; MARTIN, TR.; RAVETCH, J.; KINET, J.; GALLI, S. Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc $\gamma$ RIII. **J. Clin. Invest.** 99: 901-914. 1997.
- [13] RACKIS, J. Biological and physiological factors in soybeans. **J of AOAC Internat.** 51: 161A-174A. 1974.
- [14] SATCHELL, J. Use of earthworm. **Earthworm ecology from Darwing to vermiculture.** Satchell, J (Ed). Chapman & Hall LTD. 485 pp. 1983.
- [15] STAFFORD, E.; TACÓN, A. Nutritive value of the earthworm, *Dendrodrilus subrubicundus*, grown on domestic sewage, in trout diets. **Agricult wast.** 9: 249-266. 1984.
- [16] STRAIT, R.; MORRIS, S.; YANG, M.; QU, X.; FINKELMAN, F. Pathways of anaphylaxis in the mouse. **J Allergy Clin Immunol.** 109: 658-668. 2002.
- [17] TACÓN, A.; STAFFORD, A.; EDWARD, C. A preliminary investigation of the nutritive value of three terrestrial lumbricid worms for rainbow trout. **Aquacult.** 35:187-199. 1983.
- [18] VIELMA, J.; MAKINEN, T.; EKHOLM, P.; KOSKELA, J. Influence of dietary and phytase levels on performance and body composition of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and algal availability of phosphorus load. **Aquacult.** 183:349-362. 2000.
- [19] VIELMA-RONDÓN, R.; OVALLES-DURÁN, J.; LEÓN-LEAL, A.; MEDINA, A. Valor nutritivo de la harina de lombriz (*Eisenia foetida*) como fuente de aminoácidos y su estimación cuantitativa mediante cromatografía en fase reversa (HPLC) y derivatización pre-columna con o-ftalaldehido (OPA). **Ars Pharma.** 44: 43-58. 2003.