



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

DETERMINACION POR WESTERN BLOT DE LOS  
ANTIGENOS DE EXCRECION-SECRECION DE LA  
LARVA 2 DE *Toxocara canis* QUE SON  
RECONOCIDOS POR SUEROS DE CACHORROS  
INFECTADOS NATURALMENTE

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**  
P R E S E N T A :  
**MARCO ANTONIO MUÑOZ GUZMAN**

ASESORES: M.C. FERNANDO ALBA HURTADO  
DR. JORGE LUIS TORTORA PEREZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1997

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



INSTITUTO NACIONAL  
DE ESTADÍSTICA Y  
CENSO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Eusebio Rodriguez Ceballos  
Jefe de: Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:  
"Determinación por Western blot de los Antígenos de  
Excreción-Secreción de la larva 2 de *Toxocara canis* que son  
reconocidos por sueros de cachorros infectados naturalmente".

que presenta el presente: Marco Antonio Muñoz Guzmán  
con número de cuenta: 9256761-6 para obtener el TITULO de:  
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
"POR MI RAZA HABLAO EL ESPIRITU"  
Cuautitlan Izcalli, Edo. de Mex., a 11 de Julio de 1997

PRESIDENTE MVZ. Juan Pablo Martínez Labat  
VOCAL MVZ. Jorge Alfredo Cuéllar Ordaz  
SECRETARIO M. en C. Fernando Alba Hurtado  
PRIMER SUPLENTE MVZ. Gloria Ortiz Gasca  
SEGUNDO SUPLENTE MVZ. Rocío Silva Mendoza

[Firma]  
[Firma]  
[Firma]  
[Firma]  
[Firma]

## DEDICATORIAS

**Señor:** Te doy gracias por permitirme la dicha de vivir y cosechar frutos, los cuales siempre estarán dedicados a ti.

**Papá:** En ti siempre encuentro verdadero apoyo y protección espero algún día poder recompensar todo tu esfuerzo y amor, por ahora comparte conmigo nuestro logro.

**Mamá:** Te doy gracias por tu inmenso amor, de ti he aprendido las cosas más importantes de la vida, y tu presencia nunca se aparta de mi lado cuando más te necesito.

**Margarita:** También tu eres ya parte de mis logros porque se que a ti también te alegran espero ser parte de todos los que tu también puedes alcanzar.  
Por todo tu amor ...Gracias

**A** mis amigos de siempre Jessi, Rocio, Víctor y Ricardo les deseo todo el éxito que se merecen por ser los mejores colegas del mundo. ¡Los mejores!

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al M. en C. Fernando Alba Hurtado por su asesoría y apoyo en la realización de este trabajo. Esperemos no sea el último.**

**Al M. en C. Alejandro Martínez por su apoyo, paciencia y valiosa cooperación para el desarrollo de esta tesis.**

**Lulú a ti también te agradezco todo tu apoyo y buena voluntad.**

**A los profesores: Pablo Martínez L., Rocío Silva y Gloria Ortiz les agradezco sus consejos y paciencia para la revisión de este trabajo. En especial al MVZ J. Alfredo Cuéllar O. le agradezco su apoyo y amistad a lo largo de estos cinco años de estudio.**

**A los amigos que he conocido en este último año de trabajo Margarita, Mónica, Alejandra y Victor les agradezco su apoyo incondicional espero que la amistad sea muy duradera.**

*...Derribaré a tus adversarios  
los buscarás y no los hallarás  
vencerás en todos tus caminos  
para siempre en el Nombre  
de Jesús....*

## **INDICE**

<b>RESUMEN.....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>3</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>20</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>26</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>33</b>
<b>CUADROS Y FIGURAS.....</b>	<b>34</b>
<b>APENDICES.....</b>	<b>43</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>53</b>

## RESUMEN

*Toxocara canis* es un nemátodo parásito que utiliza a los perros como hospederos definitivos y a otros animales incluyendo al humano como hospederos intermedios. Las larvas son capaces de secretar y excretar diferentes tipos de proteínas que tienen diversas funciones. Algunas de estas proteínas son antigénicas y pueden ser utilizadas para el diagnóstico. El objetivo del presente trabajo fue determinar el peso molecular de los antígenos de excreción-secreción de *T. canis* (TES), que son reconocidos por sueros de cachorros infestados naturalmente.

Se realizó la necropsia de 31 cachorros provenientes del Centro Antirrábico de Cuautitlán Edo. de México, se obtuvieron adultos de *T. canis* y suero el cual se congeló a -20 °C para su posterior uso. Los TES se obtuvieron al mantener larvas 2 de *T. canis* en medio de cultivo RPMI-1640 en condiciones de esterilidad, el sobrenadante se concentró 100 veces por ultrafiltración con membranas de Amicon, y se almacenó a -20 °C. Con los TES ya concentrados se hicieron corrimientos electroforéticos en geles de SDS-poliacrilamida para ser separados y caracterizados por tinciones de azul de Comassie y nitrato de plata; después, se realizaron electrotransferencias de estos antígenos a papel de nitrocelulosa y finalmente se realizó la técnica de Western blot (WB) con los sueros almacenados de los cachorros sacrificados. Con la tinción de plata fue posible caracterizar 11 bandas de TES de *T. canis* de 200, 120, 38, 32, 28, 24, 23 y 16 kD. Los más abundantes fueron el TES-24 y TES-23. También se detectaron con tinciones de plata tres bandas de menos de 7.5 kD que no fueron reconocidos por el suero de ninguno de los cachorros. Por la técnica de WB se lograron determinar en total de 14 bandas de 400, 200, 120, 86, 74, 66, 47, 38, 32, 28, 24, 23, 20 y 16 kD. El TES-120 es un conjunto de tres bandas que migran muy cerradamente y que posiblemente son variantes de una misma molécula. El TES-400 no apareció con nitrato de plata pero sí en 11 sueros con la técnica de WB. El TES-66 resultó la más frecuente siendo reconocida por 25 de los 27 sueros positivos. Los TES-86 y TES-20 fueron reconocidos solo por cuatro sueros. De los 31 cachorros muestreados, 11 resultaron negativos a la necropsia no encontrando en ellos adultos de *T. canis*, sin embargo 7 de ellos sí reconocieron algunas bandas de TES, lo que indica que probablemente tenían algunas larvas migrando por los tejidos o que puede haber inmunidad materna pasiva. El presente estudio muestra que bandas son reconocidas por suero de perros infestados con *T. canis*, dichas bandas son las que se deben estudiar para determinar cual se puede utilizar para establecer técnicas para el diagnóstico específico de la larva migrans canina.



## INTRODUCCION

Dentro del grupo de enfermedades parasitarias que afectan a los perros, la toxocarías es una de las de mayor importancia; se define como una infestación parasitaria debido a la acción y presencia de varias especies de nemátodos de los géneros *Toxocara* y *Toxascaris* (28). *Toxocara canis* es el ascárido más común del perro y tiene gran importancia en los cachorros (1), no solamente por las repercusiones que trae en sí la enfermedad en los perros, sino por el peligro que representa para la salud humana, ya que se trata de una enfermedad zoonótica que afecta principalmente a niños (3,10,12,34). Este parásito es cosmopolita con alta incidencia, virulencia e importancia como problema de salud pública (34).

### 1).- Generalidades del *Toxocara canis*

El *T. canis* es un nemátodo parásito perteneciente a la familia Ascarididae (11). El cuerpo es grueso y blanquecino, presenta tres labios en el extremo anterior y alas cervicales largas, estrechas y semilanceoladas (28). Por esta razón son llamados algunas veces cabeza de flecha o gusanos flecha (15). Los machos tienen de 4 a 10 cm de longitud, 2.2 a 2.5 mm de diámetro y presentan dos espículas; en su extremo posterior se observan 20 a 30 papilas preanales, cinco postanales y un estrechamiento terminal en forma de apéndice. Las hembras miden de 5 a 18 cm de longitud y de 2.5 a 3.0 mm de diámetro (28).

Los huevos de *T. canis* miden aproximadamente 70 X 90 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ), son amarillo-blanquecinos y su forma varía de subsférica a elipsoidal; además poseen una cubierta proteica la cual está uniformemente fosetada, a veces puede ser necesario hacer un enfoque cuidadoso al microscopio para definir completamente dichas fosetas y no confundirlas con pequeñas protuberancias. Poseen una masa protoplasmática que llena completamente el interior del huevo (10)

### 1.1.- Ciclo biológico

El ciclo de vida de *T. canis* es complejo y varía de acuerdo a la edad a la que el hospedero adquiere la infestación y a las diversas formas en que el parásito puede llegar a éste: Transplacentaria, calostrala, transmisión directa o infestación por ingestión de un hospedero paraténico (34).

En los perros de más de seis meses de edad que se infestan por ingestión de huevos con la larva 2 desarrollada, ésta eclosiona en el intestino y penetra a la pared intestinal; la subsecuente migración está determinada por el sexo, estado reproductivo e infestaciones previas (28), pocas larvas relativamente pasan desde los pulmones a la tráquea, la mayoría de ellas entran en la vena pulmonar y de aquí por el corazón y la circulación general van a los tejidos somáticos. En ellos pueden permanecer sin desarrollarse en estado de dormancia durante toda la vida del animal permaneciendo como larva 2 (23).

Un modo alternativo de infestación ocurre cuando los huevos maduros son ingeridos por hospederos paraténicos (ratas, ratones, ovinos y otros) en los cuáles se desarrolla la larva 2 en sus tejidos. Al ser depredados estos hospederos paraténicos por caninos, la larva 2 reactiva su desarrollo en ellos y se convierte en adulto directamente en el intestino sin llevar a cabo migración somática (34)

Las larvas que permanecen en los tejidos de las perras adultas constituyen el más importante reservorio de *T. canis* para la infestación en los perros; ya que en las primeras fases de la gestación estas larvas que habían permanecido almacenadas en diversos tejidos se reactivan probablemente por factores hormonales de la misma perra (34) y migran hacia el útero, atraviesan la placenta e infestan a los fetos pudiendo ser demostradas larvas en los tejidos de estos al día 42 de la gestación. También se sabe que si la hembra es expuesta a heces contaminadas con huevos durante la gestación las larvas pueden migrar directamente hasta el útero alcanzando e infestando a los fetos (10,23). Esta forma de infestación es llamada transplacentaria, las larvas alcanzan el hígado de los fetos en donde ocurre la muda a la larva 3 posteriormente migran hacia los pulmones en donde se encuentra presente en la primera semana de vida del cachorro, la muda a larva 4 ocurre en los pulmones, después a través de las vías aéreas alcanza la faringe, es deglutida y muda a larva 5 en intestino delgado, llega al estado adulto en la tercera semana de vida del cachorro. Las larvas que se encuentran en los tejidos de la hembra también pueden migrar a la glándula mamaria y pasar a los cachorros en el periodo neonatal a través de una ruta

transmamaria o calostrala y desarrollarse directamente al estado adulto en el intestino del cachorro (34).

En los cachorros menores a tres meses que ingieren huevos maduros, las larvas 2 pasan por vía linfática o sanguínea a ganglios linfáticos o al hígado a través del sistema portal hepático, en él crecen ligeramente pero no mudan (23). continúan al corazón y pulmones, la mayoría pasa por los bronquios, tráquea y faringe en donde son deglutidas, llegando al estómago hacia el día 10. La muda para el tercer estado larvario es en pulmón, tráquea o esófago (23,28). En el intestino delgado se realiza la siguiente muda que da lugar a la cuarta larva, finalmente ocurre la última muda que da lugar a la larva 5, ésta crece y alcanza la madurez sexual. De cuatro a cinco semanas después hay presencia de huevos en las heces (28).

Los huevos de *T. canis* salen con las heces y se dispersan en el ambiente, en condiciones óptimas de temperatura, humedad y oxígeno se desarrolla la segunda larva dentro de huevo en un período de dos semanas (28). La tasa de embrionación e infectividad depende del ambiente, la temperatura y la humedad (12). Las hembras adultas llegan a producir hasta 200,000 huevos al día (12).

## 1.2.- Mecanismos de acción patógena

El *T. canis* adulto tiene una acción expoliatriz, quimófaga, selectiva por algunos nutrientes como la vitamina C, carbohidratos y péptidos. Provoca en infestaciones masivas un mayor o menor grado de obstrucción intestinal y a veces del colédoco, provocando estasis biliar reflejándose en una mala digestión, las larvas también provocan irritaciones a diferentes tejidos como son: Pared intestinal, parénquima hepático, cardiaco y pulmonar con ruptura de capilares y alvéolos. En forma paralela ejercen acción expoliatriz histófaga y de líquidos tisulares, acción mecánica obstructiva y además producen inflamación por la secreción activa de antígenos llamados: Antígenos de excreción-secreción (TES) que pueden provocar anafilaxia (28). Cuando la migración larvaria se disemina a todo el organismo la enfermedad resultante es llamado síndrome de *larva migrans visceral* (LMV) (12).

Las lesiones provocadas por las larvas son el resultado de una exagerada respuesta inmunológica contra los TES y la acción traumática que produce la larva al migrar por los tejidos (12). Se estudió la distribución de las larvas en los distintos órganos de ratones infectados con una dosis media de 1,000 huevos, encontrando lesiones en el intestino y presencia de larvas al día uno después de la infección, el hígado también fue afectado en el primer día, pulmón y riñones en el día uno y dos respectivamente, músculo esquelético en el día tres y SNC en el día cuatro (24). En otras investigaciones al inocular nueve monos macacos con dosis de 100,000 a 400,000 huevos viables, se encontró que seis de ellos no presentaron más que poca o moderada invasión larvaria a tejidos y SNC por lo que solo

presentaron moderada inapetencia y depresión por algunas semanas. Los otros tres monos sufrieron un cuadro grave, presentando un gran número de larvas viables no solo en la cavidad torácica y abdominal, sino también en el SNC. El examen hematológico de los animales infestados reveló una reducción transitoria del conteo de eritrocitos y marcada eosinofilia, incremento en la concentración de globulinas, bajos niveles de albúmina y niveles elevados de transaminasas séricas (35). Existen evidencias experimentales de larvas que han persistido viables hasta por diez años en tejidos vivos de primates (7,33).

### 1.3.- Signos clínicos

El género *Toxocara* en general afecta a los cachorros de perros y gatos más que a los animales adultos (15). Los animales sufren retraso en el desarrollo y presentan abdomen abultado y la piel deslúcida y áspera; hay emaciación, signos de anemia, inquietud y diarrea o constipación. Puede producirse la muerte por obstrucción intestinal aguda (34). Otros signos relacionados pueden ser: Tos con descargas nasales que pueden ser mortales o bien desaparecer en un período de tres semanas. En casos de infestación prenatal masiva, hay gran cantidad de gusanos en el intestino y estómago. En algunos casos se pueden presentar signos nerviosos consistentes en convulsiones de duración limitada provocadas por la presencia de larvas migrando en el sistema nervioso central (28,35).

El examen hematológico de animales infestados revela un conteo reducido de eritrocitos y marcada eosinofilia, incremento en la concentración de globulinas, bajos niveles de albúmina y niveles elevados de transaminasas séricas (35)

## 2.- *Larva migrans*

La causa más frecuente del síndrome de *larva migrans visceral* es *T. canis* el gusano común del perro, otros parásitos en los que también se han reportado al humano como hospedero paraténico causándoles enfermedad son: *T. cati*, *Capillaria hepatica*, *Gnathosoma spp*, *Dirofilaria spp*, o como el hospedero definitivo *Ascaris lumbricoides* y *Strongyloides stercoralis*, todos ellos son agentes capaces de generar LMV (12).

Fulleborn en 1921, fue el primero en sugerir a las larvas de nemátodos como una posible causa de enfermedad (12), pero pasaron 30 años para que a través del descubrimiento de larvas migrantes de *T. canis* en los tejidos de varios niños, se estableciera por primera vez el término de *larva migrans visceral* (3,33,35). Se han reportado numerosos casos en todo el mundo de infecciones en humanos por larvas migrantes de *T. canis* (35).

La infección en los ojos por larvas de *T. canis* producen enfermedad ocular llamada *larva migrans ocular* (LMO), frecuentemente en ausencia de manifestaciones de enfermedad visceral, la manifestación clínica específica que resulta de la infección por las

larvas de nemátodos, está dada en función de el número de larvas ingeridas, la frecuencia de la infección, la especie de la larva, la vía migratoria y la intensidad de la respuesta inmunológica del hospedero a las larvas en los tejidos (33).

Uno de los problemas en el estudio experimental de algunas de las infecciones por larvas migrantes, puede ser la falta de modelos de laboratorio adecuados para su estudio. Una excepción a este problema es el caso de la *larva migrans* causada por *T. canis*, este tipo de larvas puede infectar y estar presente en varios animales domésticos e incluso en tejidos humanos (33).

Se demostró en un estudio seroepidemiológico realizado en un Cohorte de Atlanta Georgia, que de 383 niños de entre cinco y siete años de edad, 333 (87%) presentaron seropositividad (títulos Anti-*T. canis* > 1:32) La prevalencia de los niños de la raza negra fue mayor en un 21.3% que la de los niños de raza blanca (37).

La presentación clínica de la enfermedad en los humanos, como se mencionó anteriormente, varía mucho según el número de huevos larvados ingeridos, la duración de la infestación, la presencia de larvas en los lugares críticos y otros factores aun no entendidos (3). El síndrome clínico típico ocurre en niños de todas las edades, especialmente aquellos en el que existe el antecedente clínico de pica y convivencia con cachorros (12,37). Los signos respiratorios son comunes e incluyen jadeo y tos. Aproximadamente el 50 % de los pacientes que presentan signos respiratorios, presentan infiltración pulmonar demostrable



en sus radiografías (12). Se ha establecido que significativamente fueron más los niños asmáticos que presentaron en su circulación Ig-E específicos contra *T. canis* (37). La eosinofilia en al menos el 20% de los casos, está casi siempre presente y persiste. Otros hallazgos patológicos incluyen: Leucocitosis, hipergammaglobulinemia, incremento en las isohemaglutininas y niveles significativos de Ig-E (12). Raramente se han encontrado algunos casos de desenlace fatal en los que se han encontrado afectados el miocardio y el sistema nervioso central (12).

En 1950 Wilder, observó larvas de nemátodos o sus restos en 16 de 24 pacientes con pseudogliomas en los ojos, a los cuales se les practicó la enucleación por una endoftalmitis y presumible retinoblastoma (12). El síndrome de *larva migrans ocular* es una enfermedad ocular típicamente unilateral que afecta principalmente a los niños, resultante de una invasión de el ojo por una o más larvas de *T. canis*, ocasionalmente esto puede ocurrir en forma bilateral en los adultos. La localización y el número de larvas dentro del ojo, determinan la naturaleza y extensión de la enfermedad, ésta puede presentarse como una retinocoroiditis posterior que se identifica como una nébula definida. También puede haber lesión con infiltrado de células inflamatorias en el humor vítreo, con reacción inflamatoria aguda, por la cual puede verse una masa blanca formada por células inflamatorias. Se puede presentar retinocoroiditis periférica aguda y uveoretinitis idiopática. De manera incidental pueden verse granulomas intrarretinales periféricos (12).

Se ha demostrado que una simple infección con *T. canis* en ratones no afecta la sobrevivencia de las larvas de una segunda infección, esto probablemente como consecuencia a un mecanismo de inmunodepresión. La segunda infección, sin embargo, provoca una inmunidad suficiente para matar a una gran proporción de larvas de una tercera infección y a las ya previamente establecidas. También se ha visto un fenómeno similar en los conejos (2)

Las inoculaciones de 5, 7, 10 y 25 huevos infectantes en ratones, dan una respuesta inmune humoral correlacionada con el número de huevos, llegando a su máximo en el día 56 post-infección. Se ha determinado que inoculaciones de 50, 500, 1000 y 2,500 huevos infectantes, producen muy altos niveles de anticuerpos específicos sin que hayan diferencias entre los diferentes grupos (13).

Los ratones inoculados con huevos de *T. canis*, *Ascaris lumbricoides* y *Trichinella spiralis* y posteriormente expuestos a una segunda infección con huevos de *T. canis*, tienen un incremento en su resistencia registrando poca sobrevivencia de las larvas y un retraso en su migración a través del hígado, no siendo así para los ratones inoculados con *Trichinella spiralis* (24).

Los rayos X son capaces de inhibir el desarrollo de las larvas de *T. canis*, afectando la síntesis de proteínas y la actividad biológica de las enzimas. Radiaciones de 60, 90 y 150 Kr inhiben en forma directamente proporcional la migración larvaria a través del

hígado, pulmón y la acumulación en la musculatura de larvas, también se disminuye la virulencia del parásito y mata algunos de ellos en un periodo de tres semanas posteriores a la inoculación sin interferir con la producción de inmunidad específica (2).

### 3.- Antígenos de excreción-secreción (TES)

#### 3.1 Procedencia y naturaleza química

En 1975 se desarrolló un método con el cual incubando la larva 2 de *T. canis* mantenidas con medio mínimo esencial podía recolectarse alrededor de 0.5 a 1.0 mg de proteínas de un total de  $1 \times 10^7$  larvas que fueron reconocidas antigénicamente por los hospederos; estas proteínas anteriormente habían sido identificadas con un experimento *in situ* encontrando precipitados inmunes en los orificios oral y anal de la larva 2, se les llamó antígenos de excreción-secreción (TES) (32). Las larvas infectantes (L2) de *T. canis* tienen una gran capacidad para producir TES *in vitro* (20). Estos antígenos constituyen una serie de complejos glucoconjugados que presentan distintas características bioquímicas (21) y son de gran valor para el diagnóstico de la toxocariasis en ausencia de la evidencia parasitaria (1).

Se ha determinado a través de una técnica de anticuerpos monoclonales que los dos principales sitios donde se encuentran primariamente los TES son las glándulas esofágicas, las cuales tienen salida hacia esófago y por consecuencia a la cavidad oral y una larga rama

de células columnares secretoras que desembocan a un poro secretor en el exterior de la larva (25).

La participación de los TES en la resistencia natural del parásito, radica en la interferencia de los mecanismos inmunes del hospedero, afectando la adherencia inmunomediada de eosinófilos, esto ya ha sido determinada *in vitro*. La exposición de sueros positivos a toxocarías con TES purificados neutraliza algunos componentes del complemento e inmunoglobulinas del tipo IgG que son específicas contra *T. canis* y que participan en la fijación de elementos inmunológicos a la superficie de la larva (14). La liberación de estos productos antigénicos, es tal vez, la mayor adaptación fisiológica del parásito al hospedero (25).

A través de electroforesis han podido detectarse con nitrato de plata un mínimo de 15 bandas de entre 29 y 94 kD de una cantidad de 20 µg de TES simple. Las bandas fueron numeradas del 1 al 15 en orden decreciente de acuerdo al peso molecular (PM), se ha determinado que los mayores componentes de toda la masa antigénica son las bandas 10, 11 y 14 (76, 78 y 88 kD respectivamente) y que las bandas 1 y 3 (29 y 34 kD) son las siguientes más abundantes. Utilizando sueros de pacientes infectados con *T. canis* se observó con la técnica de Western blot (WB) que estos detectaban de 4 a 6 bandas más y calcularon que cada larva produce un total de 8 ng de proteína por día utilizando medio de cultivo RPMI-1640 (1).

En otras investigaciones se definieron por electroforesis una serie de componentes antigénicos en el material sobrenadante de cultivos larvarios con PM aparentes de 32, 55, 70, 120 y 400 kD (19). Posteriormente se realizó un estudio bioquímico de estos componentes encontrando que se tratan de glucoconjugados que presentan principalmente dos azúcares importantes la N-acetilgalactosamida y la galactosa, en menor abundancia, otros como arabitol, manosa, N-acetilglucosamida, glucosa, fucosa y xilosa (21). Estos carbohidratos están presentes en diferentes proporciones en algunos o todos los TES formando epitopos que se encuentran ligados al complejo proteico del antígeno de manera fuerte o débil. Se han determinado ocho epitopos diferentes por medio de anticuerpos monoclonales, indicando que la respuesta inmunológica es fundamentalmente hacia los complejos glicosilados de la molécula (20).

El TES- 32 (32 kD) es una glicoproteína que puede ser teñida con nitrato de plata y azul de Coomassie; como es el mayor componente reactivo al azul de Coomassie es también, presumiblemente, el mayor alérgeno de todo el conjunto de TES (19). Únicamente en este antígeno se encontró presente fuertemente un epitopo tipo 3 y también están débilmente unidos los epitopos tipos 1 y 8 (20).

El TES-120 (120 kD) es un conjunto de tres bandas que migran muy cerradamente y presentan siempre una banda doble y una banda sencilla más lenta y tenue, este conjunto es reconocido por un solo anticuerpo monoclonal para el TES-120 (Tcn-2) lo que sugiere que se trata de un grupo de variantes de una sola molécula común (19). Los epitopos 2, 6 y 8 se

encuentran fuertemente ligados, los restantes lo están de manera débil. El TES-70 presenta al epítopo 3 unido débilmente y a todos los demás con uniones fuertes (20).

El TES-400 (400 kD) es un proteoglican con un pequeño componente peptídico, esta macromolécula no es detectada por el nitrato de plata a pesar de tener un gran número de residuos de metionina. En contraste esta banda es teñida con PAS. Además solamente posee dos epítomos unidos de manera fuerte, el 2 y el 8 (19,20)

Por Western blot se han determinado dos patrones de TES que son reconocidos por sueros humanos a los que se les llamó LMW (Low Molecular Weight) y HMW (High Molecular Weight), estos grupos fueron correlacionados con una prueba de ELISA ampliamente usada para el diagnóstico de toxocariasis, resultando el WB una prueba más específica con la que es posible reducir el margen de error del diagnóstico, ante el riesgo de un falso positivo por reacción cruzada con otros helmintos. En el patrón de HMW formado por bandas de 200, 147 y 132 kD hay mayor reacción cruzada con otros helmintos, mientras que la fracción LMW formada por bandas de 24, 28, 30 y 35 kD es más específica para el género *Toxocara* (16).

### 3.2 Utilidad e importancia

Los TES son ahora ampliamente usadas como antígenos inmunodiagnósticos para la toxocaríasis humana, por lo que consecuentemente, la determinación de sus características moleculares y antigénicas es de gran importancia práctica (19). Los métodos utilizados actualmente para el diagnóstico son el TES-Ag Enzime-linked immunisorbent assay (TES-ELISA) y más recientemente se ha desarrollado el Western-blot (WB inmunoblot) (17)

Existen varios grupos de autores a nivel mundial que han estudiado los TES en diversos modelos experimentales tales como roedores (19), primates (36) y estudios epidemiológicos de campo hechos en humanos (18). Sin embargo, hasta el presente no hay estudios sobre los TES en caninos .

En el presente trabajo se pretende determinar, en primera instancia el comportamiento antigénico de el *T. canis* en los cánidos, específicamente en los perros domésticos (*Canis familiaris*), buscar el patrón de reconocimiento antigénico más común y las posibles variantes que puedan existir, haciendo al mismo tiempo una comparación con lo que se ha determinado ya por otros autores en otras especies y en el ser humano. Se considera importante el determinar las diferencias o semejanzas que puedan existir, por el hecho de que los cánidos, particularmente los cachorros, son los hospederos primarios de

este parásito, y por lo tanto, la fuente primaria de infestación hacia cualquier otro hospedero. No se pretende encontrar o estandarizar un método diagnóstico a la enfermedad pero sí, obtener datos que puedan dar las primeras bases para estudios posteriores que debidamente complementados puedan ser encaminados hacia el diagnóstico o la prevención de la *larva migrans* en los canideos.



## **OBJETIVOS**

### **GENERAL:**

- Contribuir al desarrollo de una herramienta útil en los estudios epidemiológicos de la toxocarías canina.

### **PARTICULARES:**

- 1.- Obtener separados por geles de SDS-poliacrilamida en bandas de acuerdo a su peso molecular los antígenos de excreción-secreción de la larva 2 de *Toxocara canis*.
- 2.- Identificar por su Peso Molecular a través de la técnica de Western blot los antígenos reconocidos por sueros de cachorros infestados de manera natural.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **1).- Lugar de realización**

El presente trabajo fue realizado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FES-C) Campo 4 de la UNAM, que se encuentra ubicada en Cuautitlán Izcalli, Estado de México. Se llevo a cabo en los laboratorios de Parasitología, Virología y Reproducción.

### **2).- Obtención y mantenimiento de huevos de *T. canis***

Se recolectaron ejemplares adultos de *T. canis* a partir de necropsias realizadas a cachorros de entre uno y tres meses de edad, provenientes del Centro Antirrábico de Cuautitlán, Edo. de México. Las hembras fueron separadas para realizar una disección del útero y así obtener el mayor número de huevos posible, después con un colador fino se eliminaron los restos y membranas de los órganos del parásito; los huevos se separaron por centrifugación (2000 rpm por 5 minuto) desechando el sobrenadante por decantación, la masa de huevos sedimentados se resuspendió en una solución de formol al 2 % y se incubaron en cajas de Petri estériles dentro de una estufa bacteriológica a una temperatura de 25 °C alrededor de 28 días según se describe en la técnica de Savigny (7,32).

### **3).- Obtención y mantenimiento de larvas**

La obtención de las larvas se hizo siguiendo el método desarrollado por Savigny y modificado por Bowman (2), una vez transcurridos los 28 días de incubación, los huevos se observaron al microscopio para verificar el desarrollo de la larva infestante L2 pasiva (7). Después se hicieron tres lavados por centrifugación y resuspensión en S.S.F. Posteriormente un lavado en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % y por último, dentro de una campana de flujo laminar, cuatro lavados asepticos con medio de cultivo estéril RPMI 1640 buferado con HEPES a un pH de 7.2 con 100 µg/ml de gentamicina y glucosa al 1 % (19,20) Posteriormente se sometieron a agitación por medio de un agitador magnético por 10 minutos para producir la eclosión de los huevos. De la suspensión resultante se separaron las larvas viables por el método de migración larvaria de Baermann (7) Se utilizaron microaparatos de Baermann esteriles elaborados con pipetas Pasteur, a las cuales se les introdujo un algodón, colocadas dentro de tubos de ensaye de 30 ml con tapa metálica sin sello hermético. La suspensión fue colocada en la parte superior del algodón por dentro de las pipetas Pasteur y en el tubo de ensaye se puso medio de cultivo estéril hasta tocar el algodón por la parte inferior. Después de 24 horas de incubación a 37 °C en estufa de CO<sub>2</sub> se colectaron del fondo del tubo de ensaye las larvas viables y se realizó una segunda colecta a las 48 horas. Las larvas recolectadas y resuspendidas en medio de cultivo RPMI-1640 fueron puestas en cajas de cultivo de 15 ml a una concentración de 1000 larvas/ml e incubadas en estufa a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad (7).

#### **4).- Obtención y almacén de sueros**

A los 31 cachorros que se utilizaron para obtener los parásitos adultos, antes del sacrificio se les tomó una muestra sanguínea de la cual, por centrifugación (2,500 rpm por 2 minutos) se separó el suero y éste fue almacenado en viales a -20 °C. Posteriormente se identificaron como positivos aquellos sueros obtenidos de cachorros a los cuales en la necropsia se les encontró *T. canis* adultos siendo un total de 27.

#### **5).- Obtención de TES**

El sobrenadante de las cajas se colectó por aspiración aséptica dentro de la campana de flujo laminar, sedimentando primero a las larvas en un extremo de la caja por gravedad. Posteriormente se restituyó medio de cultivo fresco a las cajas. El medio era reemplazado semanalmente (1,19). Se utilizó un equipo Amicon con membranas de 10,000 D con el cuál se concentraron 100 veces los antígenos en el medio. La concentración final de proteínas fue determinada por la técnica de Bradford ,realizada con un lector de ELISA portatil MR-250 Portable Microplate Reader, utilizando un filtro de 630 nm y comparando con la curva patrón de la albúmina sérica bovina.

#### **6).- Separación de los TES en gel de SDS-poliacrilamida por electroforesis (SDS-PAGE)**

El equipo utilizado fue una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN II electrophoresis cell (Bio-Rad Labs.) de 16 cm largo, 12 cm ancho y 18 cm de espesor, el tamaño del gel: 7 cm largo y 8 cm de ancho y con Voltaje límite de 600 VDC.

Los TES fueron separados en geles de poliácridamida con las siguientes características: El gel separador de aproximadamente 50 mm fue preparado a una concentración de acrilamida del 12 % 0.375 M Tris y pH de 8.8; se utilizó como gel concentrador uno de 10 mm, preparado con 4 % de acrilamida 0.125 M Tris y pH de 6.8 (Apéndice 1) (4). El antígeno fue corrido siempre con un carril de comparación con marcadores de peso molecular (MPM) preteñidos, a 150 V con 120 mA para el gel concentrador por 10 minutos y a 70 mA para el gel separador por 60 minutos. Una vez terminado el corrimiento se realizaron las tinciones de Comassie y nitrato de plata (apéndice 2). Los PM de los antígenos obtenidos fueron determinados por medio de una curva patrón, realizada graficando el logaritmo del PM de los marcadores preteñidos, contra su migración a través del gel expresada en centímetros (6). Los MPM fueron: Miosina 203 kD; beta-galactosidasa 118 kD; albúmina sérica bovina 86 kD; ovalbúmina 51kD; anhidrasa carbónica 34 kD; inhibidor de la tripsina 29 kD; lisosima 19 kD y aprotinina 7.5 kD.

### **7).- Transferencia de TES a papel de nitrocelulosa**

Se utilizó un equipo Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell para electrotransferencia semiseca que consta de dos platos electrodos de carbón. Se cortaron piezas de papel de nitrocelulosa al tamaño de los geles de poliacrilamida y ambos se colocaron entre capas de papel filtro Wattman 0.2  $\mu\text{m}$  remojados en un buffer especial de transferencia y cortados al mismo tamaño del gel. Los antígenos obtenidos de la electroforesis se transfirieron a 12 V con una corriente de 0.8 mA/cm<sup>2</sup> por un tiempo de 35 minutos (Apéndice 3) (5).

Posteriormente la trasferencia de los TES fue verificada por la presencia en el papel de los marcadores de peso molecular preteñidos y con una tinción reversible de rojo de Ponceau S, sumergiendo el papel en el colorante por 5 minutos, una vez que aparecieron las bandas más aparentes la tinción se eliminó con agua destilada. El resto de la membrana fue bloqueado con Tris-Buffer Salino con 5 % de leche descremada en polvo a 4 °C por toda la noche (31).

### **8).- Desarrollo del Western blot**

Una vez obtenidos los antígenos en el papel de nitrocelulosa, éste se cortó en tiras de 5 mm y se sometieron a incubación por 2 horas con los sueros obtenidos de los cachorros infestados con *T. canis*, para cada uno se trabajó con dos diferentes diluciones: 1:10 y

1:20 (27), posteriormente se lavaron con PBS-Tween 0.1% 5 veces por 3 minutos, después se incubaron con un conjugado cabra anti-perro marcado con peroxidasa por 1 hora. Se lavaron nuevamente con PBS-T 7 veces por 1 minuto para agregar después la solución del sustrato: Peróxido de hidrógeno al 0.01 % v/v 4, cloro -1-n- naftol 0.05 % p/v en metanol 16.6 % en PBS 0.1 M en el que permanecieron 24 horas hasta la aparición de las bandas (apéndice 4) (31).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1).- Mantenimiento de larvas

En total se obtuvieron tres cajas con un estimado total de 70,000 larvas viables, las cuales se mantuvieron por un período de más de diez meses en condiciones de esterilidad y un bajo porcentaje de mortalidad, semanalmente se recolectó un promedio de 25 ml de sobrenadante. En el protocolo hecho por Savigny en 1975, reporta que se pueden mantener larvas viables por 18 meses con un estimado de producción de 4 a 8  $\mu\text{g}$  de proteína por larva por día, en el presente estudio se obtuvo un estimado de 100  $\mu\text{g}$  /ml en el concentrado y una producción estimada de 1 ng por larva por día. Esta diferencia puede explicarse por el tipo de medio de cultivo utilizado en cada trabajo, Savigny utilizó medio mínimo esencial el cual proporciona a las larvas menor cantidad de nutrientes que el medio RPMI- 1640 utilizado en este estudio. Sin embargo, en otras investigaciones se utilizó este mismo medio de cultivo se reporta una producción de 8 ng por larva al día (1), lo que hace una diferencia de 7 ng con respecto a lo obtenido. Esto pudo ocurrir por diferencias en el método de conteo de las larvas o bien , por diferencias en cuanto a los días de cultivo, ya que estos autores solo cuantificaron la proteína recolectada en dos meses de cultivo y en el presente estudio por el volumen requerido se trabajó con recolecciones de seis meses adelante. El método de cuantificación también fue diferente, en el trabajo de referencia utilizaron un espectrofotómetro calibrado a 280 nm mientras que en el presente se utilizó un lector de



ELISA calibrado a 630 nm lo que finalmente pudo ocasionar diferencias en la cuantificación de proteína.

## 2).- Separación de TES en el SDS-PAGE

### a).- Azul de Coomassie

Ninguna proteína pudo ser teñida mediante esta técnica de manera clara. Solamente reveló muy levemente una banda de entre 25 y 20 kD, lo que indica que este rango de PM es el más abundante en el conjunto de TES. Cabe mencionar que esta técnica tiene una sensibilidad del rango de los microgramos, si se considera que en cada carril se corrió un estimado de 2 a 3 µg se puede considerar normal la ausencia o la pobre tinción de las proteínas separadas.

### b).- Nitrato de plata

Mediante esta tinción que es 1000 veces más sensible que el azul de Coomassie (rango de los nanogramos) (4), se pudieron identificar un total de 11 bandas de manera constante en cada corrimiento, cuyos PM fueron determinados con una curva patrón dada por los marcadores de peso molecular (MPM) de referencia (figura 1) y con la comparación directa con los WB. Las bandas determinadas correspondieron a los siguientes PM: 200, 120, 38, 32, 28, 24, 23, 16 y tres bandas de menos de 7.5 kD. De nuevo las bandas más

fuertemente teñidas fueron las del rango de los 23 y 24 kD lo que indica que son las más abundantes en el conjunto de TES (figura 3). Se ha reportado al TES-32 como la proteína más abundante del complejo (20), en este trabajo se logró determinarla, sin embargo no fue la más abundante.

Existe una constancia en cuanto a los antígenos presentes en el sobrenadante con respecto al tiempo de mantenimiento pero también una variación en cuanto a las cantidades de cada proteína producida, lo que puede explicar la diferencia en cuanto a este antígeno (1).

El análisis y la caracterización de los TES obtenidos en cultivo siempre ha tenido variaciones y discrepancias entre distintos autores en cuanto a su número de componentes y PM, esto puede deberse en gran parte a detalles diferenciales de las metodologías empleadas. Se han reportado diferencias entre dos lotes de TES obtenidos y analizados bajo el mismo protocolo en dos laboratorios distintos. La variación de los TES obtenidos en diferentes lugares no tiene una base biológica definida, sin embargo, esto aparentemente no afecta la sensibilidad de las pruebas diagnósticas aunque sí constituye una desventaja para el estudio aislado de cada antígeno (1).

Los componentes de menos de 7.5 kD migraron por debajo del último MPM (aprotinina 7.5 kD) por lo que no fue posible estimar su PM, además ninguna de estas bandas fue reconocida por los sueros y su tinción con nitrato de plata fue pobre. Ninguna de estas bandas ha sido reportada de manera importante en el patrón de otros autores como

Maizels y col. o Maganaval, estas bandas pueden tratarse efectivamente de proteínas secretadas por la larva pero no necesariamente son antigénicas, también puede tratarse de fragmentos de otras proteínas no definidas.

### 3).- Western blots

Un total de 16 bandas fueron identificadas y caracterizadas de acuerdo a su PM: 398.11, 199.53, 165.96, 147.91, 95.5, 85.9, 74.13, 66.07, 46.77, 38.46, 30.9, 28.97, 25.12, 23.17, 19.95, 16.22 kD (cuadro 1). Seis de estos PM son muy cercanos a los reportados por otros autores, por lo que se considera que se trata de las mismas bandas. Se ha reportado un conjunto de tres bandas las cuales migran muy cerradamente y que son reconocidas por un solo Ac-monoclonal, por lo que las han designado como un solo complejo de 120 kD (20). En el presente estudio fue posible identificar tres bandas de 165.96, 147.91 y 95.5 kD (cuadro 1 sueros 6 y 7) que tienen las siguientes características semejantes a las descritas por Maizels en 1984: migran de manera muy cercana, a la tinción con Plata, es aún más estrecha la relación entre ellas apareciendo como una sola banda gruesa, invariablemente en los WB aparecen las tres bandas o ninguna y el promedio de sus PM es 136.45 kD. En base a lo anterior estas tres bandas fueron ajustadas al valor de 120 kD para ser manejadas con el mismo valor de TES-120 (figura 2).

Los TES finales determinados entonces fueron: TES-400, 200, 120, 86, 74, 66, 47, 38, 32, 28, 24, 23, 20 y 16. lo que hacen un total de 14 bandas (figura 4), su distribución y

moda se muestran en la figura 2. Los antígenos más frecuentes en orden descendente fueron TES-66 (92.5%), TES-38 (81.4%), TES-200 (77.7%) y TES-32 (74.07%); los TES-120 (70.3%), TES-28 (62.96%), TES-16 (55.5%), TES-100 (40.74%), TES-24 (37.03%) y TES-23 (33.3%) que fueron reconocidos por más de 10 cachorros y finalmente los menos frecuentes fueron TES-74 (22.2%), TES-86 (14.8%) y TES-20 (14.8%).

El TES-66 (figura 5) fue reconocido por 25 de los 27 (92.5%) sueros positivos siendo el más reconocido del patrón. En estudios hechos con sueros de ratón se reportan bandas de 55 y 70 kD (20), por lo que es probable que corresponda con alguna de estas bandas, sin embargo, no necesariamente debe de serlo ya que este, es un estudio hecho en canideos. Esta es la proteína más comúnmente reconocida del complejo antigénico, sin embargo, para determinar la importancia de esta o cualquiera de las bandas encontradas en cuanto a la especificidad hacia *T. canis*, es necesario realizar una comparación por WB entre los sueros de perros inoculados con *T. canis*, *Ancylostoma caninum* y *Dipylidium caninum* ya que se reportan algunas reacciones cruzadas con otros helmintos como *Ascaris lumbricoides* y fases evolutivas de *Taenia hydatigena*. Esto ocurre sobre todo con los antígenos de alto PM (>100kD) (18). También se ha visto resistencia incrementada de ratones contra *T. canis* cuando son inoculados previamente con *Ascaris lumbricoides* (24). Así pues, es claro que los TES pueden reaccionar de manera cruzada con antígenos de otros helmintos incluyendo céstodos. Por medio de un estudio comparativo de WB con sueros humanos, se determinó que los TES más específicos para *T. canis* son los de bajo PM (<40kD) (18). En el presente trabajo se clasificaron las bandas detectadas por WB en

tres complejos antigénicos: Uno de alto PM con bandas de 400, 200, 120 kD; uno intermedio más abierto formando por bandas de 86, 74, 33, 47 y 38 kD y otro grupo cerrado de bandas con bajo PM de 32, 28, 24, 23, 20 y 16 kD (figura 6).

El TES-400 es un proteoglican con un pequeño componente peptídico que no es detectable con el nitrato de plata por lo cual no apareció en el gel de SDS-PAGE, sin embargo, si aparece en algunos WB (figura 6). Pero sin un índice alto de reconocimiento por los cachorros (40.74%).

De las necropsias realizadas a los cachorros 11 fueron negativos, de estos, 4 fueron negativos también al WB (figura 7), los restantes 7 detectaron bandas del antígeno de TES aún estando ausente el parásito adulto en intestino. Esto puede deberse a varios factores como inmunidad pasiva materna adquirida ya sea por la vía transplacentaria o a través del calostro (10,23), otra causa probable es que hubieran larvas en migración en sus tejidos por lo que el cachorro produjo anticuerpos contra la larva y por último, posibles reacciones cruzadas con otros parásitos principalmente *Ancylostoma caninum* y *Dipylidium caninum* (18), los cuales fueron encontrados en varios cachorros, sin embargo no se llevó el registro de ellos.

El WB da un mayor porcentaje de seguridad para el diagnóstico definitivo de la toxocariasis humana que la prueba de ELISA, por las reacciones cruzadas que existen entre este parásito y otros helmintos (18). Sería interesante determinar si este fenómeno ocurre en

la misma proporción en los canideos, es decir, si hay la misma diferencia entre estas dos pruebas, lo que finalmente sería un reflejo de la antigenicidad cruzada que puede existir en esta especie, esta debe ser diferente en teoría ya que la gama de parásitos que atacan a humanos o perros es diferente. Sin embargo, actualmente no hay una prueba de ELISA estandarizada en los perros, pero puede estandarizarse de la misma forma en que fue realizado este trabajo, ya que ahora se sabe que efectivamente hay por lo menos 14 antígenos que son reconocidos por los perros y que algunos de ellos son del mismo PM a los reconocidos por otras especies como roedores y humanos (18,20), además también reconoce de manera muy importante otro antígeno que no está reportado en ninguna. A partir de este antígeno puede empezarse a investigar en cuanto a especificidad para *T. canis* lo que puede resultar en una prueba diagnóstica eficaz para la *larva migrans* que puede ser aplicado en perros con ausencia de evidencia parasitaria.

## CONCLUSIONES

- 1) .- El suero de todos los perros positivos a *T. canis* en necropsia reconoció algunas bandas de TES por la técnica de Western blot.
- 2) .- 7 sueros de 11 perros negativos a la necropsia reconocieron de 3 a 12 bandas de TES.
- 3) .- Los pesos moleculares de los TES que fueron reconocidos por sueros de los perros fueron: 400, 200, 120, 86, 74, 66, 47, 35, 32, 28, 24, 23, 20 y 16 kD.
- 4) .- El antígeno reconocido con mayor frecuencia fue TES-66
- 5) .- Los antígenos reconocidos con menor frecuencia fueron TES-86 y TES-20.
- 6) .- Para descartar las bandas que presentan antigenicidad cruzada se deben realizar pruebas comparativas con otros helmintos como pueden ser *Ancylostoma caninum* y *Dipylidium caninum* los cuales fueron encontrados en las necropsias realizadas.

**BANDAS RECONOCIDAS POR LOS PERROS**

No.	cm	LOG(MW)	PM (kD)	AJUSTE	MODA	REFERENCIA (kD)
1	0.2	2.6	398.11	400	11	400 <sup>1</sup>
2	0.7	2.3	199.53	200	21	200 <sup>1</sup>
3	1	2.22	165.96	166	19	120 <sup>1</sup>
4	1.1	2.17	147.91	148	19	
5	1.4	1.98	95.50	95	19	
6	1.5	1.93	85.90	86	4	
7	1.8	1.87	74.13	74	6	
8	2	1.82	66.07	66	25	
9	2.7	1.67	46.77	47	12	
10	3	1.585	38.46	38	22	
11	3.6	1.49	30.90	32	20	32 <sup>1</sup>
12	3.8	1.462	28.97	28	17	28 <sup>2</sup>
13	4	1.4	25.12	24	10	24 <sup>2</sup>
14	4.15	1.365	23.17	23	9	
15	4.3	1.33	19.95	20	2	
16	4.7	1.21	16.22	16	15	

Muñoz G.M.A. (1997)

**CUADRO 1.-** Bandas de TES reconocidas por sueros caninos con infección natural de *T. canis* por medio de WB teñidos con una técnica de peroxidasa. Los valores con similitud a antígenos reportados por Maizels<sup>1</sup>; (1984), y Magnaval<sup>2</sup>; (1991), fueron tomados como tales. Los demás valores fueron redondeados a números enteros.



### RESULTADOS DE WESTERN BLOT

SUERO	NEC <sup>a</sup>	BANDAS RECONOCIDAS (kD)	TOTAL
1	1	200,120,74,66,47,38,32,28,24,23,16	11
2	1	200,120,74,66,47,38,32,20,19	9
3	2	200,120,74,66,38,32,28,20,16	9
4	1	38,32,28	3
5	1	400,200,120,86,66,47,38,32,28,24	10
6	1	400,200,120,74,66,47,38,32,28,24,23,16	12
7	1	400,200,120,86,66,38,32,28,24,23,16	12
8	1	400,200,66,47,28,20	6
9	2	400,200,120,83,66,47,38,32,28,24,23,16	12
10	2	ninguna	0
11	1	200,120,66,38	4
12	1	400,200,120,86,66,47,38,32,28,16	10
13	1	74,66,38,23	4
14	2	ninguna	0
15	2	400,200,120,66,47,38,32,28,16	9
16	2	400,200,120,86,66,38,32,28,23,16	10
17	2	400,200,120,66	4
18	2	200,120,66	3
19	2	ninguna	0
20	1	200,120,66,38,32,28,24,23,16	9
21	1	66,38,32	3
22	1	200,120,66,38,32,16	6
23	1	200,120,74,66,47,38,32,28,24,23,16	11
24	1	66,38,32,28	4
25	1	200,120,66,47,38,32,28	7
26	1	200,120,66,47,38	5
27	1	200,120,66,47,38,32,28,24,23,16	10
28	1	400,66,32,28,24,16	6
29	1	400,200,120,66,38,32,28,24,23,16	10
30	2	ninguna	0
31	2	400,200,120,74,66,38,32,28,24,23,20,16	12

$$\begin{aligned}
 \bar{X} &= 8.115384615^* \\
 S^2 &= 10.26923077 \\
 S &= 3.204564053
 \end{aligned}$$

Muñoz G. M. A. (1997)

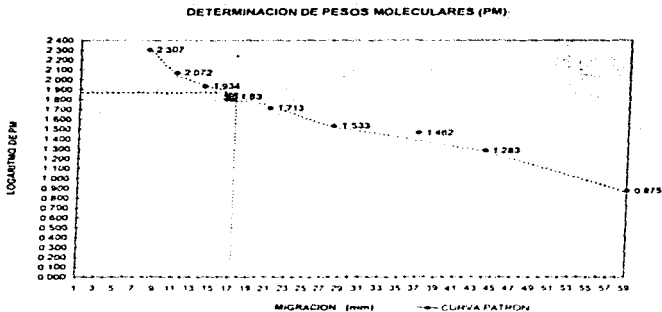
<sup>a</sup> Se le dio a los positivos el valor de 1 y a los negativos el valor 2.

<sup>b</sup> Solo se tomaron para la media aritmética los positivos al WB.

$S^2$  = Varianza

S = desviación Estándar.

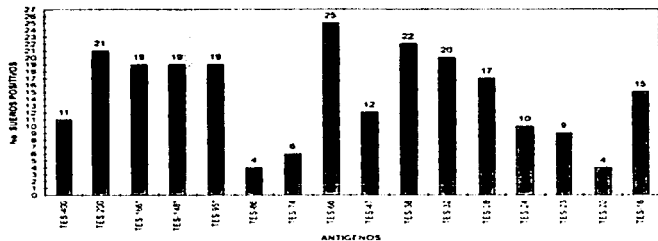
**CUADRO 2.-** Resultados de los WB hechos a los 31 cachorros muestreados. Se presenta el patrón individual de reconocimiento de los TES<sup>b</sup> de *T. canis* en cada suero, cuatro sueros no reconocieron ninguno de los TES.



Muñoz G M A (1997)

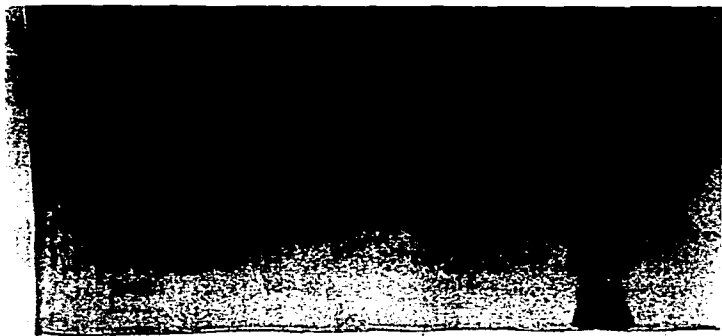
**FIGURA 1.-** La determinación de los pesos moleculares (PM) fue realizada por medio de una curva patrón con los marcadores de peso molecular (MPM), colocándose en el eje Y el logaritmo de los PM conocidos de los marcadores y en el eje X su migración o desplazamiento a través del gel en milímetros. Como puede observarse en el ejemplo, el logaritmo que se determina para una banda que se desplazó 18mm es 1.83 lo que nos da un antilogaritmo de 66 por lo que el PM estimado de esta banda es 66 kD. Los MPM fueron: Miosina 203 kD, beta-galactosidasa 118 kD, albúmina sérica bovina 86 kD, ovalbúmina 51kD, anhidrasa carbónica 34 kD, inhibidor de la tripsina 29 kD, lisosima 19 kD y aprotina 7.5 kD.

DISTRIBUCION DE LOS TES RECONOCIDOS

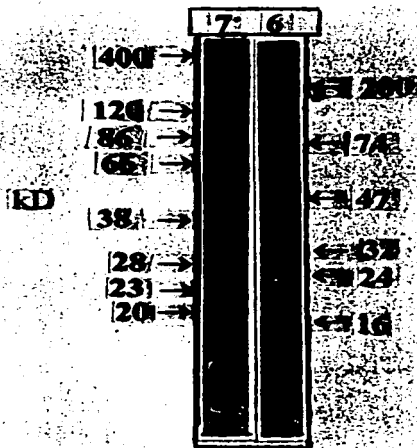


Muñoz G.M.A. (1997)

FIGURA 2.- Frecuencia encontrada de cada uno de los TES de *T. canis* que fueron reconocidos por sueros de 27 cachorros positivos. La determinación se realizó por la técnica de Western blot.



**FIGURA 3.-** Separación de los TES de *T. canis* por electroforesis en geles de SDS-Poliacrilamida teñidos con la técnica de Nitrato de Plata. Al lado derecho aparecen los 54 kDa.



**FIGURA. 4.-** Patrón de bandas reconocidas por los cachorros en los WB. Los TES de *T. canis* fueron separados por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida y transferidos a papel de nitrocelulosa para la realización de los WB. Los sueros 6 y 7 reconocieron a la mayoría de los TES de *T. canis*. El suero 7 a diferencia del suero 6 no reconoce los TES-74 y TES-47 pero sí el TES-86.



**FIGURA 5.-** Resultados de los WB. Los TES de *T. canis* fueron separados por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida y transferidos a papel de nitrocelulosa para la realización de los WB, del lado izquierdo aparecen los PM de los marcadores utilizados en los corrimientos. Los números 1,2,3, etc. corresponden a los antígenos reconocidos por sueros de diferentes cachorros.

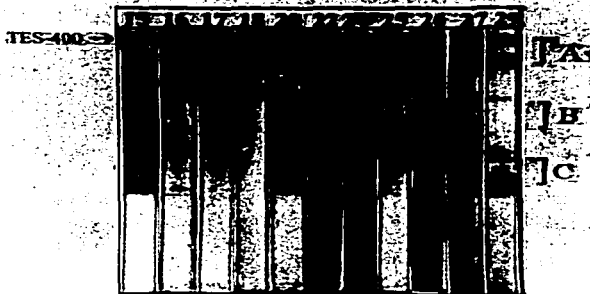
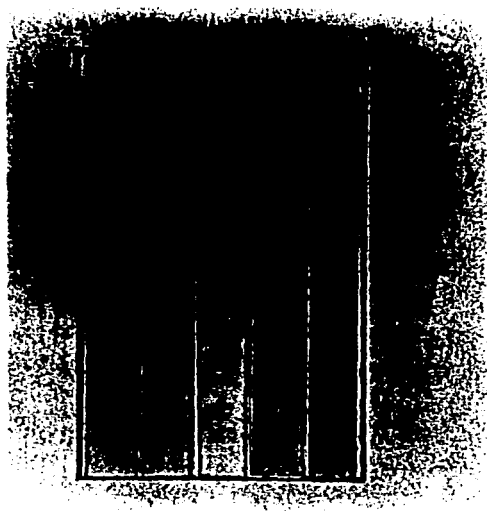


FIGURA 6.- Resultados de los WB. Los TES de *T. canis* fueron separados por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida y transferidos a papel de nitrocelulosa para la realización de los WB. En el suero 15 es muy evidente la banda de 400 kD del lado izquierdo. Del lado derecho: A)- Patrón de alto PM, B)- Patrón de PM intermedio y C)- Patrón de bajo PM.



**FIGURA 7.-** Sueros negativos al WB. Las sueros de los cachorros 10, 13, 19 y 30 no reconocieron ninguna banda de los TES de *T. canis*. Al lado izquierdo el suero 23 como referencia positiva.



## APENDICE I

Material para la preparación del gel:

-Acrilamida-bisacrilamida (30:0.8):

Se prepara disolviendo 30 g de acrilamida y 0.8 g de bisacrilamida en un volumen total de 100 ml de agua desionizada. Se filtra la solución a través de papel filtro Whatman No. 1 y se almacena a 4 °C en una botella ámbar.

-Dodecil sulfato sódico (SDS) 10 % w/v :

Se prepara disolviendo 10 g de SDS en 100 ml de agua desionizada. La solución debe ser clara e incolora. Si la temperatura del agua es muy baja, no todo el SDS se disolver y ser necesario calentar la solución.

-Buffer del gel separador 3.0 M Tris-HCl (pH 8.8) :

Mezclar 36.6 g de Tris (Tris[hydroxymethyl] aminometano) en 48 ml de 1.0 M de HCl y ajustar a un volumen final de 100 ml. Una vez disuelta la solución se filtra a través de papel filtro Whatman No. 1 y se almacena a 4 °C.

**-Buffer del gel concentrador 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8):**

Disolver 6.0 g de Tris en 40 ml de agua desionizada, se agrega 1.0 M de HCl gota a gota ( 48 ml hasta alcanzar un pH de 6.8, se ajusta a un volumen final de 100 ml. Una vez disuelta la solución se filtra a través de papel filtro Whatman No. 1 y se almacena a 4 °C.

**Buffer de corrida 0.25 M Tris HCl 1.92 M Glicina, 1 % SDS (pH 8.3):**

Disolver 30.3 g Tris, 144.0 g glicina y 10.0 g de SDS en un litro de agua destilada. Esta solución es diez veces concentrada (solución 10X) y se almacena a temperatura ambiente. Para preparar 500 ml de buffer de corrida se toman 50 ml de la solución 10X y se ajusta a 500 ml.

**-Buffer de muestra o buffer Laemmli:**

0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8): 2 % SDS, 5 % 2-mercaptoetanol, 10 % Glicerol, 0.002 % azul de bromofenol. Estas son las concentraciones finales que deben tener cada reactivo. Para facilitar la preparación de este buffer es conveniente utilizar soluciones prehechas con una concentración mayor.

**Persulfato de amonio:**

15 % w/v ; se disuelven 1.5 g de persulfato de amonio en 10 ml de agua desionizada. Esta sustancia es inestable y debe ser preparada justo antes de ser usada.

**-TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine):**

Se usa tal como se compra, es estable cuando no se diluye, se debe almacenar a 4 °C y en botella ámbar.

### Preparación del gel de Poliacrilamida:

#### a).- Gel Separador.-

Agua desionizada	4.5 ml
Tris-HCl pH 8.8 3.0 M	1.25 ml
10 % SDS stok	100 $\mu$ l
Acrilamida (30:0.8)	4.0 ml
Persulfato de amonio	500 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l

#### b).- Gel Concentrador.-

Agua desionizada	6.0 ml
Tris-HCl pH 6.8 0.5 M	2.5 ml
10 % SDS stok	100 $\mu$ l
Acrilamida	4.0 ml
Persulfato de amonio	500 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l

## APENDICE 2

### A).- Tinción de Azul de Comassie

	- Sol. Teñidora	- Sol. Desteñidora
Azul de Comassie G 250	50 mg	-- --
Etanol absoluto	25 ml	25 ml
Ac. ortofosfórico	50 ml	50ml
Agua deionizada	c.b.p. 500 ml	c.b.p. 500 ml.

- 1.- Sumergir el gel en sol. colorante por 30 min. en agitación.
- 2.- Sumergir en sol. desteñidora y cambiar cada 15 min hasta que solo queden visibles las bandas.
- 3.- Conservar en ácido acético al 1 %.

### B).- Tinción de plata

- 1.- Agregar 12.5  $\mu$ l de una solución de DL- Dithiothreitol 20 mg/ml a 100 ml de etanol 50% v/v, para un gel. Mantener en agitación a 50 rpm durante 1-2 horas.
- 2.- Lavar con agua destilada 150 ml/gel a 50 rpm durante 1 hora.
- 3.- Sumergir en solución: 200  $\mu$ l Tiosulfato de Sodio Pentahidratado (100 mg/ml) en 100 ml de agua destilada durante 1 minuto.

- 4.- Lavar con agua destilada 3 X 20 segundos.
- 5.- Preparar 20 ml de Hidróxido de Sodio al 0.4 %, mezclar con 1.5 ml de sol. de Amonia (0.88 sg  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) y agregar la sol. de plata gota a gota con agitación continua. Posteriormente ajustar la solución a 100 ml. Mantener el gel sumergido en agitación 70 rpm por 30 min. Para preparar la solución de plata se disuelve 0.8 g de Nitrato de Plata ( $\text{AgNO}_3$ ) en 4 ml de agua destilada.
- 6.- Lavar con agua destilada 150 ml/gel a 70 rpm 3 veces X 5 min.
- 7.- Revelado: 200 mcl de solución de Formaldehido (40% p/v (HCHO) mezclarlo con 2.5 ml de Ac. cítrico al 1 %, agregar 20  $\mu\text{l}$  de la solución de Tiosulfato de Sodio y ajustar a 500 ml. Utilizar 150 ml/gel. Cambiar el revelador de 1 a 3 veces cada diez minutos según aparezcan las proteínas teñidas.
- 8.- Para detener la Tinción se desecha la solución reveladora y se agrega Metanol al 50 % y ácido Acético al 5 % 100 ml/gel durante 10 min.
- 9.- El gel teñido se puede conservar en Etanol o Metanol al 10 % a 4 °C 100 ml/gel.

### APENDICE 3

Buffer de transferencia pH 8.3 .-

Tris	25 mM
glicina	192 mM
SDS	0.05 % (P/V)
metanol	20 %

Tris buffer salino (TBS) .-

30 ml de una Sol. de NaCl 5 M

20 ml de una Sol. Tris-HCl 1 M pH 7.5

llevar a un litro con agua destilada.

Separe sus muestras en geles de SDS-PAGE estándar. Al finalizar la electroforesis, retire el gel de las placas, corte el gel concentrador y marque el gel de tal manera que conozca su orientación. sumerja el gel en buffer de transferencia.

1.- Limpie las placas de carbón del aparato con agua destilada.

2.- Corte seis piezas de papel absorbente (Whatman 2 mm o equivalente) y una de membrana de Nitrocelulosa del tamaño del gel. Si el papel sobrepasa el borde del gel,

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

disminuir la corriente que pasa a través del gel, obteniendo de esta manera una transferencia eficiente.

3.- sumerja la membrana de Nitrocelulosa en agua destilada. Esta se debe mojar colocándola cuidadosamente sobre la superficie del agua. La Nitrocelulosa se moja por capilaridad desde la parte inferior (varios minutos). sumerja después la membrana por dos minutos en buffer de transferencia. Remoje el papel absorbente sumergiéndolo en buffer de transferencia.

4.- Ensamble el papel, gel, Nitrocelulosa y papel absorbente de la siguiente manera:

-electrodo inferior

-tres capas de papel absorbente remojados en buffer de transferencia

- membrana de Nitrocelulosa remojada de agua y equilibrada en buffer de transferencia

-gel de poliacrilamida remojada en buffer de transferencia

-tres capas de papel absorbente remojado en buffer de transferencia.

5.- Evite la formación de burbujas, en caso de estar presentes retírelas rodando una pipeta Pasteur sobre el sandwich. Seque el exceso de buffer que rodea al sandwich no separe la membrana del gel para evitar la sobreposición de bandas.

6.- coloque cuidadosamente la tapa de carbón (electrodo superior) sobre el sandwich. Conecte los electrodos y comience la transferencia.

7.- Al finalizar la transferencia, desconecte la fuente de poder. Desensamble cuidadosamente el aparato. Marque la membrana de nitrocelulosa para saber su orientación.



8.- El gel de poliacrilamida se puede teñir con Azul de Coomassie para verificar la eficiencia de la transferencia.

9.- La membrana se tiñe con solución de Rojo de Ponceau S para verificar la transferencia. Se tiñe durante 5 min con agitación, y se destiñe con agua destilada. Esta tinción es reversible y no interfiere con el reconocimiento antigénico de las bandas.

10.- Los sitios de unión de proteína restantes en la membrana se Nitrocelulosa se bloquean incubando la membrana con 5 % de leche semidescremada en TBS durante toda la noche a 4 °C.

NOTA: La unión de las proteínas a la membrana es bloqueada por aceites u otras proteínas . Se deben utilizar guantes durante todo el proceso de transferencia y membranas nuevas, nunca reutilizarlas. El buffer de transferencia NO es reutilizable.

## APENDICE 4

### INMUNOBLOTS.-

- 1.- Bloquear los sitios de unión de proteína restantes incubándola con 5 % de leche semidescremada en TBS durante toda la noche a 4 °C.
- 2.- El papel transferido y bloqueado se puede cortar en tiras para realizar varios inmunoblots con los mismos antígenos.
- 3.- Recubrir las tiras con 2 ml de la dilución del suero problema en regulador de Bloqueo (PBS adicionado con albúmina o caseína bovina leche Sveltes 3 %, durante 2 a 3 horas a 37 C en agitación o toda la noche a 4 °C.
- 4.- Se lava con PBS-Tween 20 al 0.1 % 5 veces / 3 min. c/u.
- 5.- Se agregan 2 ml de la dilución optima del conjugado de peroxidasa detector 1 hora a 37 C o toda la noche a 4 °C.
- 6.- Se hacen siete lavados de 1 min. c/u con PBS-T .
- 7.- Después de lavar se revelan con una solución de sustrato: Peróxido de hidrógeno al 0.01 % v/v en 4-cloro-1-n-Naftol al 0.05 % p/v en metanol al 16.6 % en PBS 0.1 M en agitación a temperatura ambiente hasta la aparición de las bandas.
- 8.- Se enjuaga muy bien con agua de la llave y se deja secar.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Badley J.L., Grieve R.B., Bowman D.D., Glickman L.T., and Roockey J. H.: Analysis of *Toxocara canis* Larval Excretory-Secretory Antigens: Phisicochemical characterization and Antibody Recognition. *J. Parasitol.* 73: 593-600 (1987).
- 2.- Barriga O.O. and Myser C.: Effects of Irradiation on the Biology of the Infective Larvae of *Toxocara canis* in the Mouse. *J. Parasitol.* 73: 98-94 (1987).
- 3.- Beaver P.C.: The Nature of Visceral Larva Migrans. *J. Parasitol.* 55: 3-12 (1969).
- 4.- Bio-Rad : MiniPROTEAN II Electrophoretic Transfer Cell. Instruction Manual, 1996.
- 5.- Bio-Rad : Trans Blot SD Electrophoretic Transfer Cell Instruction Manual Catalog. 170-3940, 1996.
- 6.- Bjerrum O. J.: Handbook of immunoblotting of Proteins Vol. I y II CRC-PRESS, Florida USA, 1988.
- 7.- Bowman D.D., Grieve M.M., and Grieve R.B.: Circulating Excretory-Secretory Antigen levels and especific Antibody Responces in Mice infected with *Toxocara canis*. *Am. J. Trop. Med. Hvg.* 36: 75-82 (1987).

- 8.- Flores N. M.: Estudio Histopatológico y de Migración de larvas de *Toxocara canis* en riñón de Gerbos (*Meriones unguiculatus*). Tesis de Licenciatura *Fac. De Med. Vet. Y Zoot. FES-Cuautitlán UNAM*, 1997.
- 9.- García G.: Antígenos de *Entamoeba histolytica* Reconocidos por Anticuerpos Clase IgA en Sueros y Calostros puesperos de Absceso Hepático Amibiano. Tesis de Licenciatura *Químico Fármaco Biólogo*, Univ. Autónoma de Chiapas, 1987.
- 10.- Georgi J.R. and Georgi M.E.: Canine Clinical Parasitology. **LEA & FEBIGER USA**, 1991.
- 11.- Georgi J.R. and Georgi M.E.: Parasitology for Veterinarians. **W.B. SAUNDERS COMPANY USA**, 1990.
- 12.- Glickman L.T. and Shofer F.S.: Zoonotic Visceral and Ocular Larva Migrans. *Veterinary Clinics Of North America Small Animal Practice*. 17: 39-53 (1987).
- 13.- Havasiová-Reiterová K., Tomasiocavá O. and Dubinský P.: Effect of Various doses of Infective *Toxocara canis* and *Toxocara cati* Eggs on the Humoral response and distribution of Larvae in Mice. *Parasitol. Res.* 81: 13-17 (1995).

- 14.- Jane E.B., Grieve R.B., Rokey H.J. and Glickman T.L.: Immune mediated adherence of Eosinophils to *Toxocara canis* infective Larvae: the role of the Excretory-Secretory Antigens. *Parasitol. Immunol.* 9: 133-143 (1987).
- 15.- Lapage G.: Parasitologia Veterinaria 2ª edición. CECOSA México, 1976
- 16.- Magnaval J.F., Fabre R., Maurières P., Charlet J.P. and Larrard B.: Application of the Western Blotting procedure for the Immunodiagnosis of Human Toxocarasis. *Parasitol. Res.* 77: 697-702 (1991)
- 17.- Magnaval J.F., Fabre R., Maurières P., Charlet J.P. and Larrard B.: Evaluation of an Immunoenzymatic Assay Detecting Specific Anti-*Toxocara* Immunoglobulin E for Diagnosis and Posttreatment Follow-Up of Human Toxocarasis. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2269-2274 (1992)
- 18.- Magnaval J.F.: Comparative Efficacy of Diethylcarbamazine and Mebendazole for the Treatment of Human Toxocarasis. *Parasitol.* 110: 529-533 (1995).
- 19.- Maizels R.M., Savigny D. and Ogilvie B.M.: Characterization of Surface and Excretory-Secretory Antigens of *Toxocara canis* Infective Larvae. *Parasitol. Immunol.* 6: 23-34 (1984).

20.- Maizels R.M., Kennedy M.W., Meghji M. Robertson B.D. and Smith H.V.: Shared Carbohydrate Epitopes on distinct Surface and Secreted Antigens of the Parasitic Nematode *Toxocara canis*. *J. Immunol.* 139: 207-214 (1987).

21.- Meghji M. and Maizels R.M.: Biochemical Properties of Larval Excretory-Secretory Glicoproteins of the Parasitic Nematode *Toxocara canis*. *Mol. And Biochem. Parasitol.* 18: 155-170 (1986).

22.- Niemand. Hans G.: Prácticas de la Clínica Canina. **CECSA** México, 1990.

23.- Normand D.L.: Tratado de Parasitología Veterinaria. **ACRIBA** España, 1978.

24.- Olson L.J.: Organ Distribution on *Toxocara canis* Larvae in normal Mice previously infected with *Toxocara canis*, *Ascaris lumbricoides* or *Trichinella*. *J. Parasitol.* 12: 651-657 (1962).

25.- Page A.P. Hamilton A.J. and Maizels R.M.: *Toxocara canis* Monoclonal Antibodies to Carbohydrate Epitopes of Secreted (TES) Antigens localize to diferent Secretion-Related Structures in Infective Lavae. *Exp. Parasitol.* 75: 56-71 (1992)

- 26.- Parsons J.C., Dwight D., Bowman D. and Grieve R.: Tissue localization of Excretory-Secretory Antigens of Larval *Toxocara canis* in Acute and Chronic Murine Toxocariasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35: 974-981 (1986).
- 27.- Peña R. M.A.: Detección de Anticuerpos específicos contra *Trichinella* mediante ELISA e inmunoelectrotransferencia en los Cánidos y Félidos albergados en el Zoológico de Chapultepec. Tesis de Licenciatura *Fac. De Med. Vet. Y Zoot. FES-Cuautitlán UNAM*, 1995.
- 28.- Quiroz R. H. : Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos. **LIMUSA** México, 1988.
- 29.- Ramp T., Eckert J. And Gottstein B.: Cryopreservation and Long-term In Vitro Maintenance of Second Stage Larvae of *Toxocara canis*. *Parasitol. Res.* 73: 165-170 (1987).
- 30.- Read A. F., and Skorping A.: The Evolution of Tissue Migration by Parasitic Nematode Larvae. *Parasitol.* 111: 359-371 (1995).
- 31.- Salinas T. M.R.: Análisis longitudinal de los tres Antígenos de *Trichinella spiralis*. Tesis doctoral *Esc. Nat de C. Biol.* 1995.

- 32.- Savigny D.H.: In Vitro Maintenance of *Toxocara canis* Larvae and a Simple Method for the Production of *Toxocara canis* ES Antigens for Use in Serodiagnostic Test for Visceral Larva Migrans. *J. Parasitol.* 61: 781-782 (1975).
- 33.- Soulsby.: Immunity to Animal Parasites. **ACADEMIC PRESS INC. USA**, 1972.
- 34.- Soulsby.: Parasitología y enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos. **INTERAMERICANA México**, 1987.
- 35.- Tomimura T., Yokota M., and Takiguchi H.: Experimental Visceral Larva Migrans in Monkeys I.- Clinical, Hematological, Biochemical ad Gross Pathological Observations on Monkeys Inoculated with Embryonated Eggs of the Dog Ascarid, *Toxocara canis*. *Jap. J. Vet. Sci.* 38: 533-548 (1976).
- 36.- Wade S. E. and Georgi J. R.: Radiolabeling and Autoradiographic Tracing of *Toxocara canis* Larvae in Male Mice. *J. Parasitol.* 73: 116-120 (1987).
- 37.- Worley G. and Green A.: *Toxocara canis* Infection: Clinical and Epidemiological Associations with Seropositivity in Kindergarten Children. *J. Infec. Dis.* 149: 591-596 (1984).
- 38.- Wray W.: Analitical Biochemistry *Mol and Biochem Parasitol.* 118: 197-203 (1981).