



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

“Reconocimiento de los antígenos de excreción y secreción de la larva (L2) de *Toxocara canis* por medio del Western blot en sueros de conejos infectados experimentalmente”

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A :
ROCIÓ RINCÓN MONTILLA**

**ASESORES: DR. FERNANDO ALBA HURTADO
M.V.Z. JUAN PABLO MARTÍNEZ LABAT**

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

2002

**TEJIS 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.

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el Trabajo de TESIS:

Reconocimiento de los antígenos de excreción y secreción
de la larva (L2) de Toxocara canis por medio del
Western blot en sueros de conejos infectados
experimentalmente.

que presenta la pasante: Rocío Rincón Montilla
con número de cuenta: 9110770-3 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo 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 HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Mex., a 17 de Mayo de 2001

PRESIDENTE M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL M.V.Z. Juan Pablo Martínez Labat

SECRETARIO M.V.Z. Gabriela Fuentes Cervantes

PRIMER SUPLENTE Dr. Víctor M. Zendejas Eutrón

SEGUNDO SUPLENTE Q.B.P. Amparo Londoño Orozco

DEDICADO:

A mi familia:

Sabiendo que jamás existirá una forma de agradecer toda una vida de lucha, de sacrificio y esfuerzo constante, sólo quiero que sientan que el objetivo logrado también es suyo y que la fuerza que me ayudó a conseguirlo fue su incondicional apoyo.

A mi mamá y mi papá:

Por todos sus sacrificios y esfuerzos que son mi constante fuerza de voluntad, porque sencillamente los amo y sé que siempre estarán conmigo.

A Miguel y Arturo Montilla:

Por quererme, apoyarme en todas mis locuras y ser los mejores tíos.

A Ofelia:

Por ser mi abuela y ser mi ejemplo de trabajo, constancia y lucha por la vida, te amo abuela.

A Smirna M. y Smirna G. M.:

Por quererme y por que las extraño.

A mi hermano y sobrino Fer:

Simplemente porque los amo.

Con amor y admiración
Rocío

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer:

Al M.V.Z. Pablo Martínez Labat, por su infinito apoyo, colaboración, tiempo y consejos para la realización de este trabajo y por su sincera amistad.

Al Dr. Fernando Alba H. por su tiempo y gran apoyo.

Al M.V.Z. Marco A. Muñoz, por brindarme su amistad, colaboración y asesoría.

Al Dr. Valdivia por prestarnos sus instalaciones y por apoyar en este trabajo con sus asesorías.

A Itzía, Adrián, Elizabeth, Miriam, Moni, Kari, Lula, Julio, y Jacob por brindarme su amistad y cariño.

A ti, Alex, por ser un gran amigo, ayudarme, apoyarme y compartir este amor que nació con la elaboración de este trabajo.

Gracias,
Rocío

INDICE

INDICE	I
ABREVIATURAS	II
CUADROS, GRÁFICAS, FIGURAS	III
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
Generalidades del Género <i>Toxocara canis</i>	4
Morfología	5
Ciclo Biológico	7
Epidemiología	12
Mecanismos de acción patógena	18
Cuadro Clínico en Perros	20
Cuadro clínico en Humanos	20
Síndrome de Larva Migrans Visceral	21
Síndrome de Larva Migrans Ocular	25
Antígenos de Excreción y Secreción (Ag-EST)	27
Modelos Experimentales	31
JUSTIFICACIÓN	33
OBJETIVOS	35
MATERIAL Y MÉTODOS	36
Lugar de Realización.....	36
Animales Experimentales.....	36
Obtención y Mantenimiento de hTC.....	37
Inoculación de los Animales con hTC.....	37
Obtención y Almacenamiento de suero de conejo	38
Obtención y Mantenimiento de Larvas Infestantas (L2).....	38
Obtención de Ag-EST.....	40
Electroforesis de Proteínas (SDS-PAGE).....	41
Transferencia de Ag-EST a una membrana de nitrocelulosa.....	42
Western blot (Inmunodetección).....	42
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	59
APÉNDICE I	60
APÉNDICE II	64
APÉNDICE III	66
APÉNDICE IV	69
BIBLIOGRAFÍA	70

ABREVIATURAS

Antígeno de excreción y secreción.....	Ag-EST
Coproparasitoscopico.....	CPS
° Centígrados.....	° C
Huevos larvados de <i>Toxocara canis</i>	hITc
High Molecular Weight.....	HMW
Inmunoglobulina E.....	IgE
Inmunoglobulina G.....	IgG
Inmunodetección.....	ID
Interleucina-5.....	IL-5
Kilogramo.....	kg
KiloDaltons.....	kDa
Larva Migrans Ocular.....	LMO
Low Molecular Weight.....	LMW
Larva Migrans Visceral.....	LMV
Marcadores de Peso Molecular.....	MPM
MiliAmpere.....	mA
Milímetros.....	mm
Peso Molecular.....	PM
Porcentual.....	%
Post-inoculación.....	p.i.
Revolución por minuto.....	rpm
Sistema Nervioso Central.....	SNC
Volts.....	V
<i>Toxocara canis</i>	<i>T. canis</i>

CUADROS, GRÁFICAS Y FIGURAS

CUADRO No. 1 Frecuencia de <i>T. canis</i> en perros de diferentes lugares del mundo. N= Necropsia, CPS= Coproparasitoscópico.....	15
CUADRO No. 2 Frecuencia de <i>T. canis</i> en diferentes lugares de la República Mexicana. N= Necropsia, CPS= Coproparasitoscópico.....	17
CUADRO No. 3 Bandas de Ag-EST reconocidas por sueros de conejos infestados experimentalmente con larvas de <i>Toxocara canis</i> por medio de la técnica de Western blot teñidos con una técnica de peroxidasa.....	52
GRÁFICA No. 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.....	53
GRÁFICA No. 2 Frecuencia de Ag-EST reconocidos por sueros de conejos infestados experimentalmente con 5,000 hITc (lote # 1) a diferentes días post-infección. La determinación se realizó por medio de la técnica de Western blot.....	54
GRÁFICA No. 3 Frecuencia de Ag-EST reconocidos por sueros de conejos infestados experimentalmente con 10,000 hITc (lote # 2) a diferentes días post-infección. La determinación se realizó por medio de la técnica de Western blot.....	55
FIGURA No. 1 <i>T. canis</i>	6
FIGURA No. 2 Huevos de <i>T. canis</i> . A. Microscopia electrónica., B. Huevo no embrionado., C. Huevo embrionado.....	6
FIGURA No. 3 Ciclo biológico de <i>T. canis</i>	11
FIGURA No. 4 Separación de los Ag-EST por electroforesis en gel de SDS-PAGE teñidos por la técnica de Nitrato de Plata.....	56
FIGURA No. 5 Bandas reconocidas por el suero de los conejos inoculados con 5,000 hITc a diferentes periodos después de la inoculación.....	57
FIGURA No. 6 Bandas reconocidas por el suero de los conejos inoculados con 10,000 hITc a diferentes periodos después de la inoculación.....	58

RESUMEN

Toxocara canis es un nemátodo parásito que utiliza a los perros como hospederos definitivos y a otros animales incluyendo al hombre como hospederos paraténicos. En estos, resulta importante conocer como se monta la respuesta inmunológica, ante la lógica imposibilidad de realizar inoculaciones experimentales en humanos se ha recurrido al uso de modelos experimentales en las que el parásito tenga un comportamiento similar.

El suero de conejo se ha utilizado como referencia positiva en pruebas comerciales de ELISA sin embargo en la literatura no existen reportes de la cinética de reconocimiento de los Ag-EST por lo que para poder desarrollar estas técnicas en México se necesita conocer el comportamiento de la respuesta sérica en una infección experimental en conejos.

Por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue determinar los antígenos de excreción y secreción de *T. canis* (Ag-EST), que son reconocidos por sueros de conejos infestados experimentalmente. Se inocularon vía oral dos lotes de 5 conejos cada uno con 5000 y 10,000 huevos larvados de *T. canis* (hITc) respectivamente. Se colectó el suero de todos los animales a los días 0, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85 y 127 post-infección y se congelaron (-20 ° C) hasta su uso, a los 105 días se reinocularon los dos grupos con 5000 y 10,000 hITc respectivamente.

Los Ag-EST se obtuvieron al cultivar larvas 2 de *T. canis* en medios de cultivos RPMI-1640 en esterilidad, el sobrenadante se concentró 100 veces por ultrafiltración con membranas de Amicon. Con los Ag-EST concentrados se hicieron corrimientos electroforéticos en geles de SDS-poliacrilamida, finalmente se realizó la técnica de Western Blot (técnica de inmunodetección (ID)) con los sueros almacenados.

La determinación de los Ag-EST reconocidos por los sueros de los conejos inoculados experimentalmente con hITc se llevó a cabo mediante la técnica de Western blot ó inmunodetección (ID), las bandas proteicas reconocidas por los conejos infestados con 5,000 hITc (lote # 1) tiene un reconocimiento secuencial de estos antígenos, al día 15 reconocen una banda de 66 kDa de PM, al día 22 se reconocen dos bandas, estas bandas con PM de 55 y 66 kDa, entre los días 29 y 50 p.i. se reconocen bandas de 32, 35, 45, 55, 66 y 120 kDa, a partir del día 57 y hasta el final del experimento (día 127 p.i.) se observaron bandas de 32, 35, 45, 55, 66, 120 y 400 kDa de PM. Las bandas de Ag- EST reconocidas por suero de los conejos infestados experimentalmente con 10,000 hITc (lote # 2) también tienen reconocimiento secuencial, al día 15 p.i. se reconocieron bandas de 32, 45, 55 y 66 kDa de PM, entre los días 22 y 36 se reconocen bandas de 32, 35, 45, 55, 66 y 120 kDa de PM, entre el día 43 y hasta el día 127 p.i. se detectaron bandas de 32, 35, 45, 55, 66, 120 y 400 kDa de PM.

Los sueros de los conejos infestados con 5,000 o 10,000 hTC pueden ser utilizados como sueros de referencia en el inmunodiagnóstico de la toxocariasis humana.

INTRODUCCIÓN

Toxocara canis es un nematodo que en su estado adulto afecta el intestino delgado del perro y de otros cánidos. Sus fases larvianas pueden afectar diferentes especies que pueden actuar como hospederos paraténicos entre los que se encuentra el hombre (Beaver et al.1987)

GENERALIDADES DEL Género *Toxocara canis*

Toxocara canis se encuentra dentro de la siguiente clasificación:

SUBREINO: METAZOA

PHYLUM: NEMATHELMINTHES

CLASE: NEMATODA

ORDEN: ASCAROIDEA

FAMILIA: ASCARIDAE

Género: *Toxocara*

Los miembros del orden Ascaridida, superfamilia Ascariodoidea, son por lo general relativamente grandes y están provistos de tres labios bien desarrollados, un esófago cilíndrico y músculos corporales celomarios. Los huevos tienen una cáscara gruesa y no están embrionados cuando se depositan (Luengo et al. 1997).

Las especies del género *Toxocara*, tienen aletas cervicales diferenciadas y labios prominentes que suelen presentar rebordes dentigeros finos; carecen de interlabios, y tienen en el esófago un ventrículo posterior evidente, pero carecen de divertículo ventricular y ciego intestinal. El macho muestra un apéndice caudal digitiforme, y en algunas especies existen aletas caudales. Hay 5 pares de papilas caudales posteriores a la cloaca y muchas anteriores, y existe una papila subventral doble posterior a la cloaca a ambos lados. La vulva de la hembra está en la porción anterior del cuerpo; los huevos presentan depresiones superficiales (Beaver et al. 1987).

MORFOLOGIA

Los machos miden de 4-10 cm y las hembras de 5-18 cm, se han observado longitudes máximas de 13 y 20 cm. Las aletas cervicales son mucho más largas que anchas (2-4mm por unos 0.2mm). el esófago suele medir 5mm, incluido el ventrículo, que tiene 0.5mm tanto de longitud como de anchura. La vulva se sitúa a la altura del primer tercio del cuerpo (Beaver et al., 1987).



Fig. 1 *T. canis*. (Magnaev et al. 1999)

Los huevos son subglobulosos, de unos 85 por 75 μm , presentan depresiones en la cáscara y no están embrionados cuando se depositan, son amarillo-blanquecino; también poseen una cubierta protéica la cuál está uniformemente foseada, poseen una masa protoplásmatica que llena completamente el interior del huevo (Georgi J.R. 1991).



Fig.2 Huevos de *T. canis*: A. Microscopía electrónica, se observa con detalle las fosetas características de la membrana externa de la cáscara; B. Huevo no embrionado en el cual se puede apreciar las tres capas de que está compuesta su cubierta, de exterior a interior se observa: 1. capa albuminosa, 2. capa quitinosa triple, 3. capa lipídica; C. Huevo embrionado con larva (L2) de *T.canis* (Magnaev et al. 1999)

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, calostrai, transmisión directa o infestación por ingestión de un hospedero paraténico (Muñoz, 1997).

El ciclo se inicia con la eliminación de huevos de *T. canis* en el excremento de los perros parasitados (principalmente cachorros), estos huevos son resistentes y duraderos en el ambiente. Sin embargo, la exposición a la luz solar y a una temperatura de 55.5 ° C los mata. El desarrollo de la larva infestante, requiere de 9 a 11 días a 24 ° C y de 3 a 5 días a 30 ° C, en presencia de oxígeno atmosférico y una humedad relativa del 75 % (Olsen,1977; Olson 1979; Beaver et al. 1951).

La infestación ocurre cuando los perros, humanos u otros hospederos susceptibles ingieren huevos larvados, la eclosión ocurre en el duodeno y el segundo estadio larvario atraviesa la pared intestinal; las larvas pasan al flujo linfático o a capilares sanguíneos y por la vena porta llegan al hígado dos días después. Al cuarto día llegan al pulmón viajando por la vena cava, corazón derecho y arteria pulmonar. A partir de este punto, la ruta de migración y desarrollo de las larvas varía dependiendo de que el perro sea joven o adulto, hembra gestante, humano u otra especie animal (Olsen,1974).

En perros adultos, las larvas de segundo estadio que llegan al pulmón regresan al corazón y se distribuyen por todo el cuerpo, llegando principalmente al músculo estriado, hígado, pulmones y riñones, donde permanecen en estado de latencia (Sprent, 1958, Beaver et al. 1951; Soulsby, 1982).

En cachorros, las larvas abandonan los capilares pulmonares, penetran en los alvéolos y migran por las vías respiratorias hasta la faringe (migración traqueal), en donde son deglutidas. Las larvas viven en el estómago hasta el décimo día post-infestación, posteriormente. En este tiempo los parásitos son sexualmente maduros, se aparean y se inicia la producción de huevos fértiles entre las 4 y las 5 semanas post-infestación (Olsen, 1977; Soulsby, 1982).

Además de la infestación post-natal por la ingestión de huevos embrionados, los cachorros casi siempre se infestan prenatalmente en condiciones naturales. Esto último quizá bajo la influencia de las hormonas de las hembras de gestación, las larvas somáticas son reactivadas y penetran a los fetos entre los días 42 y 43 de la gestación (Douglas y Beker, 1959; Olsen, 1977). Esta última condición se ha podido reproducir experimentalmente al aplicar prolactina, hidrocortisona y oxitocina. Cuando las larvas alcanzan el hígado del feto tiene lugar una muda, transformándose en larvas de tercer estado, las cuales, al nacer los cachorros, aparecen en los pulmones y así permanecen durante la primera semana de vida. La muda al cuarto estadio se produce durante la primera semana, cuando

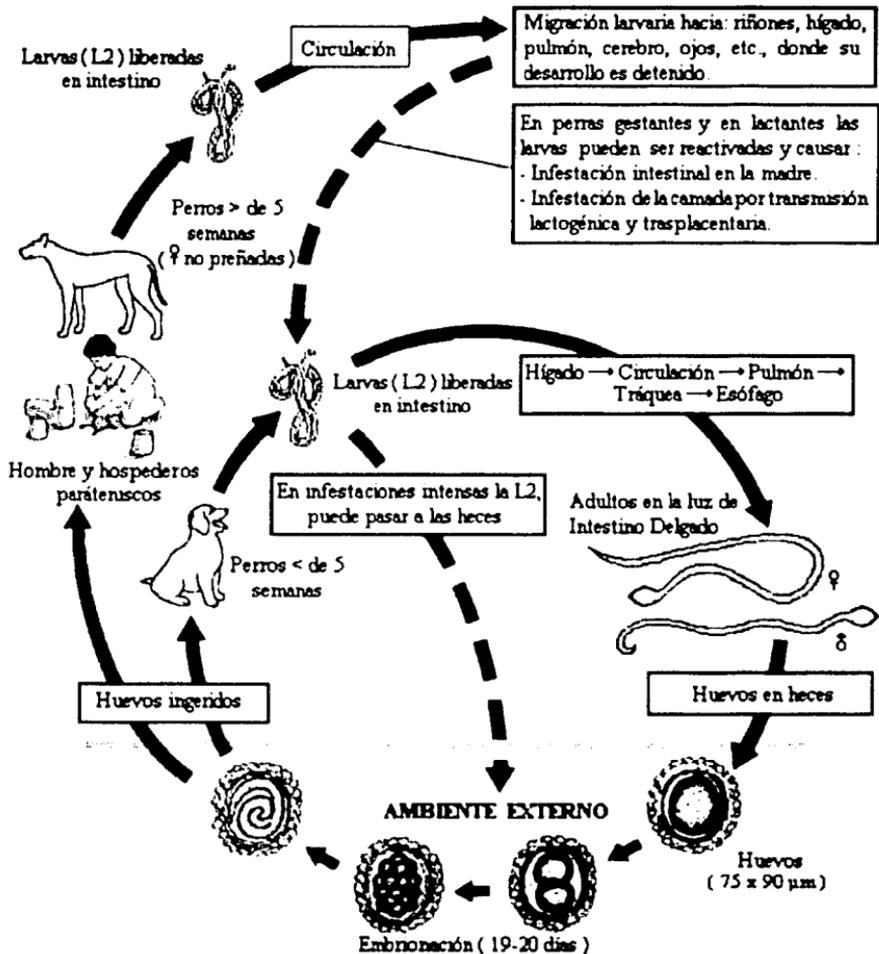
las larvas están en pulmones o posteriormente en estómago. Hacia el fin de la segunda semana, las larvas mudan al quinto estadio. Posteriormente, experimentan un rápido crecimiento y los adultos pueden encontrarse al final de la tercera semana. El período de patencia de las infestaciones prenatales varía entre los 23 y los 40 días después del nacimiento (Soulsby, 1982; Kirk, 1984).

Hasta ahora sólo se han mencionado las larvas de segundo estadio somático en perros adultos (adquiridas por la ingestión de huevos larvados). Estos raramente tienen parásitos adultos en el intestino. Sin embargo, después del parto, las larvas somáticas reactivadas pueden llegar al intestino de perras exentas de parásitos adultos. Estos parásitos maduran a los 25 o 26 días post-parto y persisten en un promedio de 60 días antes de ser expulsado espontáneamente (Shrand, 1964; Olsen, 1974). No todas las larvas somáticas abandonan los tejidos durante la primera gestación, pues las subsecuentes camadas pueden nacer infestadas, difiriéndose las infestaciones (Soulsby, 1982).

La reactivación de las larvas somáticas continúa en la perra lactante y las larvas ganan acceso a la glándula mamaria, siendo expulsada en la leche e infestando a la camada. La infestación postnatal de cachorros durante la lactancia es cuantitativamente tanto o más importante que la infestación prenatal in útero (Martínez, 1989).

El humano se puede infestar por la ingestión de huevos larvados de *T. canis*, estas evaden los alvéolos del pulmón y migran a diversos órganos como hígado, otras partes del pulmón, cerebro y ojo (Olsen, 1977; Cypess, 1977; Soulsby, 1982).

CICLO DE VIDA DE *Toxocara canis*



EPIDEMIOLOGIA

La toxocariasis es una de las principales enfermedades parasitarias de los perros. Su distribución geográfica es mundial, por su incidencia y patogenicidad al humano es un importante problema de salud pública (Schantz, 1979; Soulsby, 1982).

En climas templados, la toxocariasis humana es probablemente la más común helmintiasis zoonótica, Beaver et al. (1951) describe el primer caso de Larva Migrans Visceral (LMV) debido a *T. canis*. El género *Toxocara* incluye a *T. canis* y *T. cati*, ascáridos del perro y gato, respectivamente. Estos tienen un problema crónico, en animales jóvenes, y el estado de susceptibilidad dura 6 meses tras ese lapso, los gusanos desaparecen y automáticamente se vuelven hospederos paraténicos, alojándose en: músculo esquelético, cerebro, bazo, hígado, riñón, pulmón, corazón (Gueglio, 1994).

Para el diagnóstico de la toxocariasis es esencial tener tanto datos epidemiológicos como biológicos, porque la elección de la terapia es difícil.

Los experimentos realizados implican el ciclo de maduración del huevo de *T. canis* que ha sido llevado a cabo por de Savigny (1975).

Esto ha permitido el desarrollo de muchas pruebas serológicas sensibles y específicas utilizando el antígeno excreción y secreción de *T. canis* (Ag-EST).

Debido a los determinantes antigénicos comunes entre los diferentes nemátodos tropicales y *Toxocara spp.*, la interpretación serológica puede ser difícil si el paciente ha vivido en áreas tropicales, es por esta razón que el inmunodiagnóstico de la toxocaríasis es utilizado principalmente para pacientes en zonas templadas, especialmente en casos de eosinofilia (Gueglio, 1994).

Estudios realizados en México y en otros lugares del mundo demuestran la alta incidencia de esta parasitosis en perros (Cuadro 1 y 2). Aunque estos se realizaron de manera aislada y presentaron diferencias en cuanto a la manera en la que se llevaron a cabo, dejan claro que son mucho más afectados por gusanos adultos los cachorros menores de seis meses que los perros adultos. Una causa de la alta incidencia de esta parasitosis es el alto poder biótico que presentan estos parásitos, ya que las hembras depositan hasta 200,000 huevos diarios (Shrand, 1964; Warren et al. 1977). Los huevos son altamente resistentes a las condiciones ambientales y son la fuente de infestación de perros, humanos y otros hospederos paraténicos (Soulsby, 1982).

La infestación por *Toxocara* se presenta en casi todas las crías de perros y gatos. Estos animales, que a menudo viven en los hogares en los que hay niños, expulsan a diario y durante meses cantidades enormes de huevos en las heces, aunque estas heces se eliminan en un lapso corto, los huevos que contienen se acumulan en el entorno. Cuando están protegidos de la luz solar directa y la desecación, los huevos se desarrollan hasta alcanzar la fase infestante en unas tres semanas y persisten en el suelo meses. De este modo el suelo de las zonas en

las que defecan los perros y gatos con huevos de *Toxocara* se considera una fuente de infestación constante. Además, debido a la acción de las lluvias, es posible que los huevos se transporten a lugares distantes y alcancen grandes concentraciones en algunos puntos. Unos miligramos de tierra recogida de la superficie de estos sitios pueden contener centenares de huevos infestantes, lo que hace posible que un niño se lleve tierra a la boca ingiera miles de estos huevos y que niños mayores o adultos adquieran infestaciones ligeras, al ingerir cantidades imperceptibles de material altamente contaminado. El examen del suelo de parques y campos de juego de distintas ciudades ha demostrado la presencia de huevos infestivos de *T. canis*, que constituyen una fuente de infestación a niños y contribuyen a los elevados índices de parasitosis en perros y gatos, así como de otros hospederos (Borg & Woodruff, 1973; Dada & Linquist, 1979; Dunsmore et al., 1984; Duwel, 1984; Emehelu & Kakae, 1986; Salinas et al., 1987; Umeche, 1989; Horn et al, 1990; Choo, 1990; Abo-Shehada 1991; Holland et al, 1991).

CUADRO # 1

Frecuencia de *T. canis* en perros de diferentes lugares del mundo.

LUGAR	AÑO	# PERROS EXAMINADOS	TIPO DE EXAMEN	FRECUENCIA (%)
Canadá	1975	239	CPS	43.5
Accra, Ghana	1975	100	N	40.0
Londres, Ing.	1977	1000	CPS	7.2
Indiana, EEUU	1978	108	N	18.3
Halifax, Escocia	1978	474	CPS	26.6
Iowa st. EEUU	1978	33594	CPS	3.0
Zaria, Nigeria	1979	180	CPS	41.1
Pretoria, Sudafrica	1979	253	N	32.0
Bangkok, Tailandia	1980	107	CPS	6.5
Praga, Checoslovaquia	1982	500	CPS	4.2
Chicago, EEUU	1982	846	CPS	4.3
Sabah, Malasia	1984	175	CPS	81.0
Freetown, Sierra Leona	1984	2938	CPS	9.0
Hessian Necker Valley, Alemania	1985	155	CPS	5.8
Calabar, Nigeria	1985	254	CPS	26.7
Tenerife, España	1985	463	CPS	16.2
Baghdad, Irak	1986	20	N	40.0
Atlanta, EEUU	1987	143	CPS	12.0
La Plata, Argentina	1988	2895	CPS	14.2
Curasao, Brasil	1988	133	CPS	7.5
Grecia	1988	232	CPS	22.4

Asturias, España	1989	354	CPS	1.1
Kingston, Jamaica	1989	141	CPS	8.0
Belgica	1991	2324	CPS	17.4
Chinamora, Zinbabwe	1991	42	N	9.0
Ankara, Turquía	1992	121	CPS	13.2
Ankara, Turquía	1992	269	CPS	26.0
Ankara, Turquía	1992	33	N	9.0
Montenegro, Yugoslavia	1992	15	N	30.0
Nairobi, Kenia	1993	156	N	3.0
Oklahoma EEUU	1993	21583	CPS	4.0
Dakar, Senegal	1993	72	N	8.7
Ivaraki, Japón	1993	153	N	9.4
Hannover, Alemania	1993	3329	CPS	6.9
Melbourne, Australia	1993	493	CPS	17.4
Dublín, Irlanda	1994	350	CPS	82.6
Kansas, EEUU	1994	218	CPS	4.0
Lugano, Suiza	1995	217	CPS	17.0
Sao Paulo, Brasil	1995	314	CPS	16.6
Ibaraki, Japón	1997	916	N	79.9
Amsterdan, Holanda	1997	272	CPS	2.9
Taimet, Taiwan	1997	96	N	27.0

Frecuencia de *I. canis* en perros de diferentes lugares del mundo. N= Necropsia, CPS=Coproparásitoscópico (Alba H. F., 1999).

CUADRO # 2

LUGAR	AÑO	# PERROS EXAMINADOS	TIPO DE EXAMEN	FRECUENCIA (%)
México, D.F.	1955	100	N	30.0
México, D.F.	1967	120	CPS	93.0
México, D.F.	1969	50	CPS	20.0
Veracruz, Ver.	1970	300	CPS	9.6
Monterrey, N.L.	1972	100	N	5.0
Guadalajara, Jal.	1973	450	CPS	16.2
Cuernavaca, Mor	1974	719	CPS	15.0
Aguascalientes	1983	294	CPS	47.6
México, D.F.	1986	200	CPS	21.0
México, D.F.	1987	176	N	58.5
México, D.F., Pungarabato y Cutzamala, Gro.	1989	106	CPS	37.7
Veracruz, Ver.	1989	447	CPS	74.0
México, D.F.	1990	463	CPS	4.9
México, D.F.	1992	240	CPS	3.6
Culliacán, Sin.	1996	100	CPS	7.0
México, D.F.	1996	47	CPS	100.0
México, D.F.	1998	100	N	15.0
México, D.F.	1998	470	CPS	19.8

Frecuencia de I. CBOS en diferentes lugares de la República Mexicana. N=Neoplasia,
CPS=Coproparasitoscópicos. (Alba H. F., 1999).

Estudios recientes encontraron una relación entre la edad, el sexo, localización y factores de riesgo incluyendo la geofagia y las mascotas que son factores significantes con la infección de *Toxocara*. Los hombres son más susceptibles a ser infectados que las mujeres; esto es debido a que los hombres menores de 10 años tienen un mayor riesgo de infección de toxocariasis ya que estos tienen por costumbre jugar en zonas con tierra que posiblemente están contaminadas con huevos de *Toxocara* y tener mayor contacto con mascotas que las niñas (Bass J.L. et al. 1987).

MECANISMOS DE ACCIÓN PATÓGENA

El gusano adulto de *T. canis* ejerce 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 (Quiroz, 1988).

En forma paralela las larvas ejercen acción expoliatriz, histófaga y de líquidos tisulares, acción mecánica obstructiva y además producen un proceso de inflamación por la secreción activa de antígenos llamados antígenos excreción y secreción (Ag-EST) que pueden provocar anafilaxia (Quiroz, 1988). Las lesiones

provocadas por las larvas son el resultado de una exagerada respuesta inmunológica contra los Ag-EST y la acción traumática que produce la larva al migrar por los tejidos (Glickman et al. 1990).

En ratones infestados experimentalmente con una dosis media de 1,000 hTc (huevos larvados de *T. canis*), se han encontrado lesiones en el intestino y presencia de larvas al día uno después de la infestación, el hígado también afecta desde 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 (Olson, 1979). En otro estudio, al inocular nueve monos macacos con dosis de 100,000 a 400,000 hTc, se encontró que seis de ellos no presentaron más que poca o moderada invasión larvaria a tejidos y SNC por lo que 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 (Tomimura et al., 1976). Existen evidencias experimentales de larvas que han persistido viables hasta por diez años en tejidos vivos de primates (Soulsby, 1982; Bowman, 1987).

CUADRO CLÍNICO EN PERROS

Cuando el género *Toxocara* infesta y produce enfermedad a esta se le llama toxocarías. El género *Toxocara* en general afecta a los cachorros de perros y gatos más que a los animales adultos (Lapage, 1981). Los cachorros sufren retraso en el desarrollo y presentan un abdomen abultado y la piel es deslúcida y áspera; hay emaciación, signos de anemia, inquietud y diarrea o constipación. Puede producirse la muerte por obstrucción intestinal aguda (Soulsby, 1982).

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 las larvas migrando en el sistema nervioso central (Quiroz, 1988; Tomimura, 1976).

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 (Soulsby, 1982). Las principales expresiones clínicas son astenia, dolor gástrico y manifestaciones respiratorias.

CUADRO CLÍNICO EN HUMANOS

Muchas de las infestaciones humanas son asintomáticas, con tan sólo eosinofilia y serología positiva. Las dos principales formas clínicas de la toxocariasis humana son los síndromes de;

- Síndrome de Larva Migrans Visceral
- Síndrome de Larva Migrans Ocular u Oftálmica

Y un tercero, llamado Síndrome benigno, el cuál ha sido descrito recientemente (Magnaval et al. 1997). En este, la sintomatología no es específica, consiste en debilidad crónica asociada con moderada eosinofilia pero persistente. (Gueglio et al. 1991).

SINDROME DE LARVA MIGRANS VISCERAL

El síndrome de larva migrans visceral descrita por Beaver et al. (1952), es usualmente asociada con hepatomegalia, hiperglobulinemia, fiebre, dolor abdominal, expectoraciones y asmáticos, el sistema nervioso central se ve implicado, y eosinofilia persistente. La mayoría de los pacientes se recuperan y solo algunos llegan a morir (Dunn, 1983; Beaver et al., 1987). En el hígado, la invasión larvaria causa una reacción del hospedero con la formación de granulomas, la hepatomegalia parece ser una condición característica del padecimiento.

La causa más frecuente del síndrome de LMV en humanos es *T. canis*, sin embargo otros parásitos como son: *T. cati*, *Capillaria hepatica*, *Gnathostoma spp*, *Dirofilaria spp.* y *Ascaris lumbricoides* la pueden llegar a producir, (Glickman et al., 1987).

El primero en sugerir que larvas de nemátodos que afectan naturalmente a los animales podrían infectar a los humanos y causar enfermedad fue Fulleborn en 1921 (Glickman y Shofer, 1987). Después de casi 30 años en 1950, Merck et al. identificaron larvas de nemátodos ascaroideos en biopsias hepáticas de niños con un síndrome caracterizado por eosinofilia, hepatomegalia, infiltración pulmonar y sílvidos (Glickman y Shofer, 1987). Beaver et al. en 1952 identificaron que la causa más frecuente de esta enfermedad eran larvas de *T. canis* y propusieron el término de Larva Migrans Visceral.

En México el primer caso comprobado de toxocariasis humana (LMV) fue reportado en 1960 por Baez y Alemán, mediante un examen histopatológico de una muestra de tejido hepático de una paciente de 7 años de edad.

Clínicamente, la gravedad de la enfermedad varía mucho según el número de huevos larvados ingeridos, la duración de la infestación, la presencia de larvas en lugares críticos y otros factores aun no entendidos (Beaver et al., 1986). La mayoría de las infestaciones humanas por *T. canis* cursan asintóticamente o con síntomas muy leves (Bass et al., 1987). El signo más notorio es la eosinofilia crónica, algunos estudios demuestran que las secreciones y excreciones de las larvas del parásito estimulan la producción de interleucina 5 (IL-5) que es la responsable de la eosinofilia (Coffman et al., 1989; Kusama et al., 1995; Sugane y Ohima, 1984; Yamaguchi et al., 1990).

Clínicamente algunos pacientes presentan manifestaciones de inflamación pulmonar y tos (Markell et al., 1986), otros cursan sin manifestaciones pulmonares (Beaver et al., 1987). Se ha encontrado que pacientes con asma tienen más frecuentemente anticuerpos de la clase IgE que controles sin manifestaciones asmáticas (Dosowitz, 1981; Buijs et al., 1994; Lokman-Hakim, et al., 1997). Algunos pacientes pueden presentar edema en nódulos linfoides sin otras manifestaciones (Amir et al., 1995). Cuando las larvas alcanzan la circulación general pueden dirigirse a los riñones, en donde hasta ahora no se han detectado en la persona viva y solo hay reportes de necropsia en personas que murieron por otras causa (Dunn, 1983). En un estudio realizado por Huntley et al. en 1965, se

encontró que en el 28% de los pacientes con LMV tenían antecedentes de convulsiones. Otros reportes indican que la infestación por *T. canis* no se asocia frecuentemente a epilepsia (Glickman y Cypess, 1979; Woodruff et al., 1996). Además se ha asociado la seropositividad a *T. canis* con bajo desarrollo de la inteligencia en niños (Nelson et al., 1996).

SÍNDROME DE LARVA MIGRANS OCULAR

La toxocariasis ocular se observa generalmente en ausencia de otros signos y síntomas de LMV, se piensa o considera que este síndrome se presenta en personas que han sido expuestas a un número pequeño de larvas, las cuales migran libremente por varios órganos sin desencadenar una respuesta inmunológica importante y accidentalmente llegan al ojo (Schantz et al., 1979; Glickman, 1987).

Larva Migrans Ocular (LMO) se define como la presencia y daño producido por larvas de *T. canis* en el ojo, este síndrome ocular fue descrito en 1950 por Wilder, el cual encontró larvas de *T. canis* en 24 de 46 pseudogliomas en ojos enucleados por endoftalmitis con aparente retinoblastoma (Wilder, 1950; Glickman et al., 1979; Glickman y Shofer, 1987; Small et al., 1989; Liolet et al., 1992). El primer caso de LMO en México fue en 1966 reportado por De Buen, el cual describió como una endoftalmitis por nemátodos. Este caso era una niña de 5 años de edad, la cual tenía falta de agudeza visual y desviación del ojo izquierdo hacia fuera; después en 1982 Equihua reportó a una niña de 9 años de edad con un diagnóstico de atrofia óptica bilateral, como secuela de toxocariasis en el sistema nervioso (Equi-Aguilar 1998)

La toxocariasis ocular puede tener varios cuadros clínicos, ninguno de ellos patognomónicos, las manifestaciones que se presentan son falta de agudeza visual, estrabismo, leucorrea, irritación ocular y endoftalmitis (Shields, 1984). Las

lesiones detectadas en ojos han sido granulomas ubicados cerca del disco óptico o intrarretinales, retinocoroiditis posterior y periférica, panuveitis, papilitis óptica, uveitis, deformación o desprendimiento de retina, membranas idiopáticas epiretinales, infiltración de células inflamatorias en humor vitreo, lesiones hemorrágicas y neuroretinis como secuela de migración de larvas en retina (Smith Y Greer, 1971; Shantz et al., 1979; Gass y Braunstein, 1983; Sorr, 1984; Margo et al., 1986; Glickman, 1987; Desai et al., 1996).

El síndrome de LMO es una enfermedad típicamente unilateral que afecta principalmente a los niños, resultante de una invasión del ojo por una o más larvas, 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 (Glickman y Shofer, 1987).

ANTÍGENOS DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN (Ag-EST)

En ausencia de evidencia parasitológica en la toxocariasis, se ha tenido que buscar técnicas para poder diagnosticar y estos han sido métodos inmunológicos. Ensayos serodiagnósticos altamente sensibles y específicos han sido desarrollados usando propiedades excretoras y secretoras del parásito (de Savigny, 1975; Glickman et al., 1985)

De Savigny en 1975 desarrolló un método para obtener Ag-EST. En este se incuban larvas (L2) de *T. canis* en un medio mínimo esencial, después de una semana el sobrenadante contiene proteínas que pueden ser reconocidas antigénicamente por los hospederos; estas proteínas ya habían sido identificadas en un experimento *in situ* encontrando precipitados inmunológicos en los orificios oral y anal de L2, a las cuales se les llamó antígenos de excreción y secreción (Ag-EST) (de Savigny, 1975). Las L2 de *T. canis* tienen una gran capacidad para producir Ag-EST *in vitro* (Maizels et al., 1987). Diferentes autores han descrito modificaciones de estos medios de cultivo y han descrito diferentes antígenos de estos sobrenadantes.

Por medio de técnicas como lo son la electroforesis y el Western Blot (técnica de inmunodiagnóstico (ID)) se han analizado a los Ag-EST, y han demostrado que estos antígenos constituyen una serie de complejos glucoconjugados que presentan distintas características bioquímicas (Meghji y Maizels, 1986) y son de gran importancia en el diagnóstico de la toxocariasis en

ausencia de evidencia parasitaria (Badley et al., 1987). Los Ag-EST son glicoproteínas que tienen dos azúcares importantes la N-acetilglucosamina y la galactosa, en menor abundancia están el arabinol, manosa, N-acetilglucosamida, glucosa, fucosa y xilosa (Meghji y Maizels, 1986).

A través de una técnica de anticuerpos monoclonales se ha determinado los dos principales sitios donde se encuentran los Ag-EST, estos son, las glándulas esofágicas, las cuales tienen salida esófago y por consecuencia a la cavidad oral y una larga rama de células columnares secretoras que desembocan a el poro excretor en el exterior de la larva, por la naturaleza de estos órganos dentro de la larva, se ha propuesto que en estos lugares se producen los Ag-EST (Page et al., 1992).

Los carbohidratos anteriormente mencionados, se encuentran en diferentes proporciones en los Ag-EST formando epítomos que están ligados al complejo proteínico del antígeno de manera fuerte o débil. En diferentes estudios se ha determinado ocho epítomos diferentes por medio de anticuerpos monoclonales, indicando que la respuesta inmunológica desarrollada que esta dirigida principalmente hacia los complejos glicosilados de la molécula (Maizels et al., 1987), también se han encontrados lípidos pero contra estos no hay una respuesta inmunológica y aun no sea determinado cual es su papel biológico (Niedfeld et al., 1993).

La adaptación fisiológica del parásito al hospedero, está en la liberación de productos antigénicos como lo son los Ag-EST, ya que estos interfieren en los

mecanismos inmunológicos del hospedero, afectando la adherencia de eosinófilos (Page et al., 1992). Jane et al. en 1987 confrontó sueros positivos a toxocarías con Ag-EST purificados, dando como resultado una neutralización de algunos componentes del complemento e inmunoglobulinas del tipo IgG que son específicas con *T. canis* y que participan en la fijación de elementos inmunológicos a la superficie de la larva. A los Ag-EST se les atribuyó la respuesta inmune exacerbada, la eosinofilia y la activación policlonal de linfocitos B productores de IgE (Meghji y Maizels, 1986).

El éxito de estos parásitos en evadir la inmunidad puede deberse en parte a su habilidad para deshacerse de antígenos de superficie, anticuerpos enlazados a superficie y granulocitos adherentes *in vitro* e *in vivo*. La relación entre antígenos de superficie del parásito y la respuesta inmunológica del hospedero a éstos determinantes es crucial para las consecuencias de la infección, para *Toxocara*, las glicoproteínas de superficie, o la cutícula, o ambas. Los antígenos expuestos en superficie para la larva infectiva de *T. canis* no están asociados íntegramente con la cutícula, sino que forman parte de una cubierta lábil de superficie, distal de la epicutícula, que ya fue desprendida con facilidad cuando se enlazó con anticuerpos específicos (Page et al. 1992)

Los análisis y caracterización de los Ag-EST han demostrado discrepancias en el número de componentes y su peso molecular detectado por electroforesis en gel de poliacrilamida y filtración en gel. Además éstas pueden ser altamente atribuibles a diferencias en la metodología, Speiser y Gottstein en 1984 reportaron

diferencias en 2 lotes de Ag-EST obtenidos y analizados por el mismo protocolo en dos laboratorios separados. Las bases biológicas de la variación aparente no es conocida y además no parecen afectar la sensibilidad de los antígenos cuando son utilizados en el serodiagnóstico, (Meghji y Maizels, 1986; Badley et al., 1987)

En 1987, Badley detectó 15 bandas proteínicas en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata. Las bandas más frecuentes fueron las 76, 78 y 88 kDa seguidas de las bandas de 29 y 34 kDa. Otros autores mencionan que las bandas más frecuentes son las 32, 55, 70, 120 y 400 kDa (Maizels et al., 1984; Meghji y Maizels, 1986; Badley et al., 1987).

Por medio de la técnica de ID se han encontrado dos patrones de Ag-EST que son reconocidos por sueros humanos positivos a toxocariasis a los que les denominó High Molecular Weight (HMW) que está formado por las bandas de 200, 147 y 132 kDa y Low Molecular Weight (LMW) y está formado por bandas de 24, 28, 30 y 35 kDa; este último patrón presenta mayor especificidad hacia *T. canis* que el patrón HMW, ya que este puede cruzar antigénicamente con antígenos de otros helmintos como lo son: *Strongyloides sp.*, *Fasciola hepatica*, *Ascaris suum*, *Toxascaris leonina*, *Schistosoma sp.* y *Onchocerca sp.* (Magnaval et al., 1991, Cuellar et al., 1995; Stevenson y Jacobs, 1977; Nicholas et al., 1984). En otro estudio se encontró que los Ag-EST de 32, 70 y 120 kDa están unidos a la cutícula de las larvas de *T. canis* (Page et al., 1992)

MODELOS EXPERIMENTALES

En el estudio de la toxocariasis se han empleado modelos experimentales de diferentes especies de animales, entre las cuales podemos mencionar a los siguientes: ratones (Abo-Shehada & Herbert, 1984; Dunsmore et. Al., 1983; Ohima, 1961), ratas (Olson & Rose, 1966), monos (Tomimura et al. 1976), pollos (Gavin, 1964; Agnihotri et al., 1987; Maruyama et al., 1994b), codornices (Nakamura et al., 1991; Maruyama et al., 1994a), hámster (Agnihotri et. Al., 1987), cobayos (Bujis et. Al., 1995), cerdos (Stevenson & Jacobs, 1977), jerbos (Flores-Alatorre, 1993) y conejos (Glickman & Shofer, 1987). El modelo más utilizado ha sido el ratón, pues ya que tiene ventajas en comparación a los demás, como lo son: cepas singénicas, bajo costo, fáciles de mantener y reproducir.

En lo que se refiere a los conejos se han utilizado en diferentes estudios como testigos, por ejemplo, Badley et al. en 1987 utilizaron a un conejo blanco Nueva Zelanda inmunizado con Ag-EST, del cual obtuvieron el suero y le determinaron el nivel de títulos que contenía por medio de la técnica de ELISA y por medio de la técnica de Western blot o inmunodetección (ID) determinaron que componentes de los Ag-EST reaccionaban con los anticuerpos del suero, en otro estudio realizado por Magnaval et al. en 1991 utilizó un conejo el cual infesto experimentalmente por vía oral con 2,000 huevos larvados de *T. canis* (hTc) al cual determino el título de anticuerpos por la técnica de ELISA y cuales bandas se reconocen por la técnica de ID; sin embargo, no existen reportes sobre la

identificación de bandas por ID de los antígenos de excreción y secreción de las larvas de *T. canis* más frecuentemente reconocidas en suero de conejos a diferentes tiempos post-inoculación con hITc.

JUSTIFICACIÓN

Toxocara canis es uno de los nematodos más comunes que afectan a los perros, principalmente a cachorros, sin embargo es más importante por los problemas de zoonosis que genera. Este parásito se transmite al hombre por la ingestión de huevos larvados provenientes de materia fecal de perros; al tratarse de una enfermedad zoonótica, que afecta principalmente a niños, la toxocariasis se ha considerado un problema de salud pública. En hospederos paraténicos no cánideos, las larvas están detenidas en su desarrollo, pero activas metabólicamente, se reporta de que pueden permanecer viables hasta por 9 años en tejidos de mono (Beaver 1966).

Uno de los mayores problemas que se presenta en la toxocariasis es en el diagnóstico, ya que por técnicas parasitológicas no se puede detectar en el humano y por esto se ha implementado el inmunodiagnóstico, utilizando los antígenos excretores y secretores de la larva (L2) de *T. canis*. Ya que se presume que la liberación de productos funcionales del parásito constituye una adaptación fisiológica principal para sobrevivir dentro del hospedero mamífero (Fenoy et al. 1992, Maizels et al. 1987).

En este trabajo se pretende colaborar a los estudios de diagnóstico, utilizando como modelo experimental al conejo, ante la imposibilidad de utilizar al ser humano. Existen reportes sobre reconocimiento de bandas por medio de la técnica de ID en perros (Muñoz, 1997). Es importante conocer los patrones de

reconocimiento antigénico por medio de la técnica de ID y si estos pueden variar con el tiempo en los sueros de conejos infectados experimentalmente con hTc a diferentes dosis.

OBJETIVOS

GENERAL:

- Contribuir al desarrollo de una herramienta útil en los estudios de diagnóstico de la toxocariasis.

PARTICULARES:

- Obtener y purificar antígenos de secreción y excreción de larvas de *Toxocara canis*.
- Estudiar el efecto de la inoculación de las diferentes dosis de huevos larvados de *Toxocara canis* sobre la producción de anticuerpos séricos.
- Identificar por Western blot (inmunodetección (ID)) los antígenos de secreción y excreción de las larvas de *Toxocara canis* a diferentes tiempos post-inoculación y cuáles son más frecuentemente reconocidos por sueros de conejos inoculados experimentalmente con el parásito.

MATERIAL Y METODOS

LUGAR DE REALIZACIÓN

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Parasitología y en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4 de la Universidad Nacional Autónoma de México, que se encuentra ubicada en Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

ANIMALES EXPERIMENTALES

Se utilizaron 10 conejos machos de raza Nueva Zelanda de aproximadamente 1 mes de edad y 1kg de peso corporal. Se hicieron dos grupos, el grupo # 1 esta compuesto de 5 conejos (identificados del número 1 al 5 respectivamente) y el grupo # 2 esta compuesto por 5 conejos (identificados del número 6 al 10 respectivamente). Se alimentaron con alimento comercial (Conejina) y agua potable ad libitum, se colocaron en jaulas especiales y el mantenimiento de limpieza y alimentación fue diario

OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE hITc

Se realizaron necropsias a cachorros de uno a tres meses de edad provenientes del Centro Antirrábico de Cuautitlán, Estado de México, se disectó el intestino de los cachorros de los cuales se obtuvieron los gusanos adultos hembras, se les realizó una disección a nivel de útero para obtener huevos de *T. canis*, obtenidos los huevos; se utilizó un colador de poro fino para eliminar los restos y membranas del parásito; los huevos se separaron por centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos desechando el sobrenadante por decantación, la pastilla se resuspendió en una solución de formol al 2%, se colocaron en una caja Petri y se incubaron a 37° C durante 15 a 21 días (de Savigny, 1975, Bowman et al., 1987). Se verificó al microscopio el porcentaje de huevos larvados, así como la viabilidad mediante la observación al microscopio compuesto del movimiento larvario.

INOCULACIÓN DE LOS ANIMALES CON hITc

Una vez transcurridos los 15 a 21 días de incubación, se verifica el desarrollo de la larva infestante L2, por medio de observación microscópica; se colocó en un portaobjetos 20µL de la solución de formol al 2% de las cajas petri incubadas, se contó los huevos larvados de *T. canis* (hITc) y los huevos no larvados, se multiplica por el factor 50 para obtener el número de huevos larvados

y huevos no larvados en 1mL, se sacó el porcentaje de huevos larvados y huevos no larvados, este proceso se realizó 10 veces y se calculó el promedio; y al tener un porcentaje mayor al 70% hITc, se preparó una suspensión de hITc con solución salina fisiológica, de la cual se utilizó para la inoculación de los animales. Al grupo # 1 se le inoculó un total de 5,000 hITc, al grupo # 2 se le inoculó 10,000 hITc por vía oral con una sonda esofágica en el día cero y se repitió al día 105 post-infección.

OBTENCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE SUERO DE CONEJO

Se extrajo una muestra sanguínea por punción venosa a los dos lotes en los días 0, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85 y 127 post-infección, para la obtención de suero las muestras sanguíneas se colocaron en baño maría a 37° C, se removió el coágulo con un aplicador de madera, se centrifugó a 2500 rpm durante 2 minutos, el suero se colocó en tubos ependorf los cuales se rotularon con el número de identificación del conejo y fecha, y para su almacenamiento se congeló a -20 ° C.

OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LARVAS INFESTANTES (L2)

La obtención de las larvas se realizó siguiendo el método de Savigny y modificado por Bowman. Se partió teniendo una suspensión de hITc en solución

salina fisiológica, la cual se colocó en tubo de plástico de 60ml, donde se realizaron 4 lavados de la siguiente manera: se centrifugó a 4500 rpm durante 5 minutos, se decanto el sobrenadante y la pastilla se reconstituyo en solución salina fisiológica estéril. Se realizaron otros 4 lavados, pero se reconstituyo la pastilla con solución de cloro al 1 %, en donde se dejo reposar durante 10 minutos, después se centrifugo a 4500 rpm durante 5 minutos, se decanto el sobrenadante; en la campana de flujo laminar la pastilla se resuspendió con medio de cultivo RPMI-1640, glucosa 1 % estéril y se cambio de tubo de plástico de 60ml, se centrifugo a 4500 rpm durante 5 minutos, realizando este último paso 4 veces y en condiciones estériles (de Savigny, 1975; Bowman et al., 1987).

Se resuspendió la pastilla con medio RPMI-1640 y se somete a agitación por medio de una plancha magnética, durante 15 a 20 minutos, para inducir la eclosión de la larva infestante L2, se monitorea por observación microscópica el porcentaje de eclosión de L2, al tener una eclosión $\geq 80\%$ se detuvo la agitación y se transfirieron las larvas a un microaparato de Baermann estéril, el cuál esta compuesto de un tubo de plástico y un cono hecho con cuatro capas de papel limpia lentes colocado de tal forma que tenga contacto con el medio RPMI-1640, se incuba a 37 ° C durante 24 horas en un estufa de CO₂, después de las 24 horas de incubación las larvas viables se encuentran en el fondo del tubo de plástico, se realizo un conteo de larvas L2 viables, se recolectaron y se distribuyeron en cajas Falcon ($\pm 10,000$ larvas viables (L2)/10ml de medio RPMI-1640 glucosa 1%), se

rotularon las cajas Falcon con fecha, y se incuban a 37 ° C con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad.

OBTENCIÓN DE Ag-EST

Cada semana se colectó el medio RPMI-1640 glucosa 1 % de las cajas Falcon por medio de sedimentación por gravedad y aspiración aséptica, se colectaron 8ml aproximadamente de medio el cual contiene proteínas liberadas por las larvas L2 de *T. canis* a las cuales se les conoce como Ag-EST o antígenos de excreción-secreción. Después se restituyo medio de cultivo fresco a las cajas Falcon.

Con el medio colectado semanalmente se forma un lote, el cual se congeló a -20 ° C, después por medio de una ultrafiltración con un sistema AMICON utilizando una membrana de 0.2 μ , se concentró el medio RPMI-1640 glucosa 1 %, se formaron alícuotas de 500 μ L y se almacenaron en tubos ependorff y se congelaron a -20 ° C hasta su utilización.

La cantidad de proteínas (Ag-EST) se cuantificaron por el método de Bradford, en un laboratorio externo (Laboratorio VALAR).

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS (SDS-PAGE)

Para la caracterización del perfil de proteínas de los Ag-EST se utilizaron geles de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). la separación de los componentes proteínicos se llevo a cabo con algunas modificaciones por el método descrito por Laemli en 1970.

Se preparó un gel separador de acrilamida al 10%, 0.375M Tris y pH = 8.8 y un gel concentrador de acrilamida al 4% 0.125M Tris y un pH = 6.8; por medio de una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN II electrophoresis cell (Bio-Rad Labs.) de 16 cm de largo, 12 cm de ancho y 18 cm de espesor, el tamaño del gel fue de 7 cm de largo y 8 cm de ancho, se corrió el Ag-EST con un carril de comparación con marcadores de peso molecular (MPM) preteñidos a 120 V con 120 mA para el gel concentrador por 15 minutos aproximadamente y a 100 V con 70 mA para el gel separador durante 75 minutos.

Una vez terminado el corrimiento electroforético se realizó una tinción con nitrato de plata; los PM de los antígenos obtenidos se determinaron por medio de una curva patrón, graficando el logaritmo del PM de los marcadores preteñidos, contra su migración electroforética a través del gel expresado en milímetros. Los PM de los marcadores de peso molecular son: Miosina 203 kDa, β -galactosidasa 118 kDa, albúmina sérica bovina 86 kDa; ovalbúmina 51 kDa; anhidrasa carbónica 34 kDa; inhibidor de la tripsina 29 kDa; lisosima 19 kDa y aprotinina 7.5 kDa.

TRANSFERENCIA DE Ag-EST A UNA MEMBRANA DE NITROCELULOSA

Se utilizó un equipo Trans-Blot Sem-Dry Electrophoretic Transfer Cell para electrotransferencia semiseca que consta de dos platos de electrodo de carbón. Se limpiaron los dos platos con agua destilada; se cortaron piezas de papel de nitrocelulosa al tamaño de los geles de poliacrilamida y ambos se colocaron entre capas de papel filtro Whatman 0.2 μ remojados en buffer de transferencia. Los antígenos separados por electroforesis se transfirieron a 12 V con una corriente de 0.3 mA/cm² por un tiempo de 45 minutos. La transferencia de los Ag-EST fue verificada por la presencia en la membrana de nitrocelulosa de los marcadores de peso molecular preteñidos. La membrana se bloqueó con Tris-Buffer Salino al 5 % de leche descremada en polvo a 4 ° C por toda la noche.

WESTERN BLOT (INMUNODETECCIÓN (ID))

Una vez bloqueada la membrana de nitrocelulosa, se cortó en tiras de 5 mm y se sometió a incubación por 2 horas con los sueros obtenidos de los conejos a una dilución 1:20 en PBS al 3 % de leche descremada, después se realizaron lavados con PBS-Tween 20 al 0.1 % 5 veces por 3 minutos, posteriormente se incubaron con el conjugado de conejo α -IgG marcado con peroxidasa por 2 horas, se realizaron 7 lavados por 1 minutos con PBS-Tween 20 al 0.1 %, después se realizó el revelado con una solución de H₂O₂ al 0.01 % (v/v), 4-cloro.1-n-naftol

0.05 % (p/v) en MeOH 16.6 % en PBS 0.1M, durante 15 a 30 minutos. Cuando se hizo evidente la reacción por la aparición de bandas se lavaron las membranas con agua destilada y se secaron sobre un papel filtro.

Las tiras transferidas que contenían los marcadores de peso molecular, así como las bandas reconocidas por los sueros de conejo, se escanearon y las imágenes fueron analizadas en el programa Microsoft Photo Editor, en el cual se midió la migración de las bandas, obtenido esto, con los datos de los pesos moleculares se realizó una curva patrón, colocándose en el eje y el logaritmo de los pesos moleculares conocidos de los marcadores y en el eje x su migración o desplazamiento a través del gel en milímetros, después se interpolaron los datos de las bandas de los sueros de los conejos para así obtener el peso molecular de la banda.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se obtuvieron 8 cajas con aproximadamente 80,000 larvas viables cada una, las cuales se mantuvieron por un período de más de 4 meses en condiciones de esterilidad y con un bajo porcentaje de mortalidad, semanalmente se recolectó un promedio de 64 ml de sobrenadante. Se obtuvo un volumen de aproximadamente 500ml de sobrenadante, el cual se concentró hasta un volumen aproximado de 20 ml, obteniendo una concentración final de 100 μg de proteína /ml, con una producción de 1 ng de proteína por larva por día. De Savigny en 1975, reportó que las larvas se pueden mantener viables por más de 18 meses con una producción de 4 a 8 pg de proteína por larva por día. La diferencia en la cantidad de antígeno producido se puede deber al tipo de medio de cultivo empleado, pues de Savigny utilizó un medio mínimo esencial, y en este trabajo se utilizó RPMI-1640, la diferencia entre estos medios es que el utilizado por de Savigny proporciona a las larvas una cantidad menor de nutrientes que el utilizado para este trabajo. En otro estudio, realizado por Smith et al 1983, reporta una concentración de proteína de 0.2 mg/ml, es decir 200 μg /ml, esto se puede deber a que utilizaron huevos embrionados totalmente y los suspendieron en PBS hasta obtener el segundo estado larvario (L2), después las larvas (L2) fueron mantenidas *in vitro* con un medio mínimo esencial de Eagle con sal de Hank's.

Las larvas de *T. canis* migran por diferentes tejidos de sus hospedadores paraténicos, durante esta migración se monta una respuesta inmunológica contra ellos. Se ha evaluado esta respuesta en diversos hospedadores, como en ratones (Abo-Shehada & Herbert, 1984; Dunsmore et al. 1983; Ohima, 1961), humanos (Magnaval et al. 1991) y jerbos (Alba, 1999). Existe un KIT comercial de ELISA para el diagnóstico de la toxocariasis humana, en donde el suero control positivo es de conejos infectados experimentalmente. Sin embargo, no se menciona dosis de infección o el tiempo después de la infección en que se obtuvo el suero, tampoco existen en la literatura reportes de cinéticas de producción de anticuerpos en conejos ni los antígenos que reconoce el suero de estos animales.

Para desarrollar una prueba comercial de ELISA en México y no depender tecnológicamente del extranjero se requiere de controles positivos, ante la dificultad de conseguir suero humano positivo a toxocariasis en cantidades suficientes para dichas pruebas comerciales, se podría también recurrir como control positivo al suero de conejos infestados experimentalmente. Romero S. G. A. (tesis en prensa) evaluó la cinética de producción de anticuerpos en conejos y nosotros queremos aclarar que antígenos de secreciones y excreciones de *T. canis* son reconocidos por sueros de conejos infestados experimentalmente.

Se han utilizado antígenos solubles de adultos de *T. canis* o de la ruptura de huevos larvados para el inmunodiagnóstico de la toxocariasis (Cypess et al., 1977; Enayat & Pezeshki, 1977; Smith et al., 1982), en la actualidad se considera que los antígenos de Ag-EST tienen una mayor especificidad que los antígenos solubles o

totales (Magnaval et al., 1991; Sugane & Ohima, 1983). Por lo anterior, estos antígenos fueron los seleccionados en el presente trabajo.

En 1975 De Savigny reportó que larvas 2 de *T. canis* mantenidas durante largos periodos en medios nutritivos libres de suero y suplementados con glucosa, liberaban grandes cantidades de proteínas al medio y que estas son reconocidas por el suero de los diferentes hospedadores, por lo que se les llamó Ag-EST.

En este trabajo se obtuvieron los sobrenadantes de los cultivos de larvas en RPMI-1640, se concentraron por ultrafiltración y el filtrado se consideraron como los Ag-EST. Para evaluar la pureza e integridad de dichos antígenos se corrieron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se teñeron con nitrato de plata. En la figura 4, se presenta una fotografía del gel SDS-PAGE de los Ag-EST. A partir de este gel, se identificaron un total de 11 bandas, cuyos pesos moleculares fueron determinados con una curva patrón dada por los marcadores de peso molecular de referencia. Las bandas detectadas correspondieron a los siguientes pesos moleculares: 200, 120, 38, 35, 31, 28, 24, 23, 16 y 3 bandas de menos de 7.5 kDa., no se observó degradación de las bandas proteicas. Las bandas más fuertemente teñidas fueron las de 23 y 24 kDa de peso molecular, lo que indica que son las proteínas más frecuentes del aislado.

La mayoría de las bandas encontradas en este trabajo corresponden a las reportadas por otros autores (Alba, 1999; Maizels et al., 1984; Meghji & Maizels, 1986), aunque no corresponden totalmente a ellas. Lo cual no es extraño, pues generalmente, el análisis y la caracterización de los Ag-EST obtenidos a partir

cultivos siempre ha tenido variaciones y discrepancias entre diferentes autores en cuanto al número de componentes y al peso molecular de estos. Lo anterior, puede deberse en gran parte a las diferentes metodologías empleadas para su obtención. La variación de los Ag-EST obtenidos en diferentes lugares no tiene una base biológica definida, aunque aparentemente no afecta la sensibilidad de las pruebas diagnósticas si constituye una desventaja para el estudio aislado de cada antígeno (Badley et al., 1987).

Se han detectado en geles SDS-PAGE diversas bandas proteínicas que constituyen los Ag-EST, las mas abundantes que se han reportado tienen un peso molecular de 32, 120 y 400 kDa (Maizels et al., 1984; Meghji & Maizels, 1986; Sugane & Oshima, 1983). De estos, en el presente estudio no se reconoció el de 400 kDa que es una banda formada por una pequeña cadena peptídica y una gran cantidad de carbohidratos, esta banda no se tiñe con nitrato de plata. La forma en la que se ha detectado la abundancia de esta banda, es marcando con Iodo radiactivo las proteínas de superficie de larvas en cultivo y después buscando estas proteínas por autoradiografías (Maizels et al., 1984) o tiñendo los geles con una tinción de ácido periódico de Schiff (PAS) que es específica para carbohidratos (Meghji & Maizels, 1986).

La determinación de los Ag-EST reconocidos por sueros de los conejos inoculados experimentalmente con hITc se llevó a cabo mediante la técnica de ID. En la figura 5 se muestran las bandas proteicas reconocidas por los conejos infectados con 5000 hITc (grupo # 1), en esta figura podemos observar un

reconocimiento secuencial de estos antígenos, el día 15 reconocen una banda de 66 kDa de PM. El día 22 se reconocen dos bandas, estas con PM de 55 y 66 kDa. Entre los días 29 y 50 p.i. se reconocen bandas de 32, 35, 45, 55, 66 y 120 kDa. A partir del día 57 y hasta el final del experimento (día 127 p.i.) se observaron bandas de 32, 35, 45, 55, 66, 120 y 400 kDa de PM.

En la figura 6 se muestran las bandas de Ag-SET reconocidas por suero de los conejos infestados experimentalmente con 10 000 hTc (grupo # 2). El día 15 p.i. se reconocieron bandas de 32, 45, 55 y 66 kDa de PM. Entre los días 22 y 36 se reconocen bandas de 32, 35, 45, 55, 66 y 120 kDa de PM. Entre el día 43 y hasta el día 127 p.i. se detectaron bandas de 32, 35, 45, 55, 66, 120 y 400 kDa de PM.

Comparando las bandas detectadas por los dos grupos podemos observar que son las mismas, pero estas son detectadas en días diferentes p.i.. Las bandas en general son detectadas primero por los conejos del grupo # 2, probablemente debido a que el inóculo fue mayor y por lo tanto la cantidad de larvas y los antígenos producidos es mayor en comparación al grupo # 1 y por lo tanto la respuesta es más rápida. También podemos observar que después de la segunda inoculación (días 105 p.i.) no se detectaron nuevas bandas.

El antígeno de 66 kDa fue el primero detectado por grupo # 1 y uno de los primeros del grupo # 2, esta banda no fue detectada en la tinción de nitrato de plata. La banda de 66 kDa es la banda más reconocida por sueros de perros (Muñoz, 1994), pero no es reconocida por sueros de humanos o jerbos con

toxocariasis (Alba, 1999; Magnaval, 1991). Page et al en 1992 reportaron una banda de 70 kDa en geles SDS-PAGE que forma parte de la epicutícula de las larvas y que es secretada por las larvas, esta banda reportada probablemente sea la que los sueros de conejos detectaron en el presente trabajo.

Otra banda detectada por los sueros de los conejos pero no observada en la tinción de plata fue la de 400 kDa, esta banda es la de mayor PM reportada en la literatura y es reconocida por perros (Muñoz, 1994) y humanos (Meghji et al., 1986). Aunque esta banda cruza antigénicamente con *Ascaris sp.* (Maizels et al.,).

La banda de 120 kDa es la más frecuentemente reportada en la literatura, probablemente es una proteína a la que se le pueden pegar diferentes cantidades de carbohidratos que le den diferente peso molecular pero que tienen la misma antigenicidad puesto que son reconocidas por un mismo anticuerpo monoclonal (Page et al, 1992 a). Esta banda también es reconocida por sueros de perros (Muñoz, 1994) y humanos (Magnaval, 1991). Se ha demostrado que esta proteína es la más abundante en la epicutícula de las larvas de *T. canis* (Page et al., 1992 B).

La banda de 55 kDa se ha reportado que es reconocida por perros (Muñoz, 1994) y jerbos (Alba, 1999), y ha sido detectada por anticuerpos monoclonales (Page et al., 1992a). Sin embargo, no es reconocida por humanos (Magnaval et al., 1991). La banda de 45 kDa no se ha reportado que sea reconocida por suero

de algún hospedador, sin embargo se ha encontrado en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) por algunos autores (Badley et al., 1987; Ramp et al, 1987).

Las bandas de 35 y 32 kDa de PM, probablemente sean las mismas que son reconocidas por humanos (Magnaval et al 1991), perros (Muñoz, 1994) y jerbos (Alba H. F. 1999), pero que por usar variantes de la técnica de separación de proteínas en los geles de poliacrilamida tienen un corrimiento ligeramente diferente.

El papel biológico que tienen los Ag-EST probablemente sea el de evadir la respuesta inmunológica del hospedero y facilitar la supervivencia de la larva. Se ha demostrado que los Ag-EST son producidos por las glándulas esofágicas y por células secretoras presentes en el poro excretor (Page et al., 1992 b). Los Ag-EST producidos, durante un tiempo cubren la superficie de la larva, la boca y el poro anal. Posteriormente se desprenden tanto en forma espontánea como cuando se unen a anticuerpos específicos (Page et al, 1992b). También se ha descrito que los Ag-EST son los responsables de la eosinofilia presente en los animales infectados (Sugane et al., 1984) y que induce activación policlonal de linfocitos (Wang et al, 1995) y cambios en las subpoblaciones de linfocitos (Kusama et al., 1995; Yamaguchi et al, 1990).

En términos generales, los resultados del presente trabajo indican que los sueros de los conejos infestados experimentalmente reconocen proteínas que son secretadas por larvas de *T. canis*. Estas proteínas son similares a las reconocidas por los sueros de humanos y otros hospedadores con toxocarías. Los datos

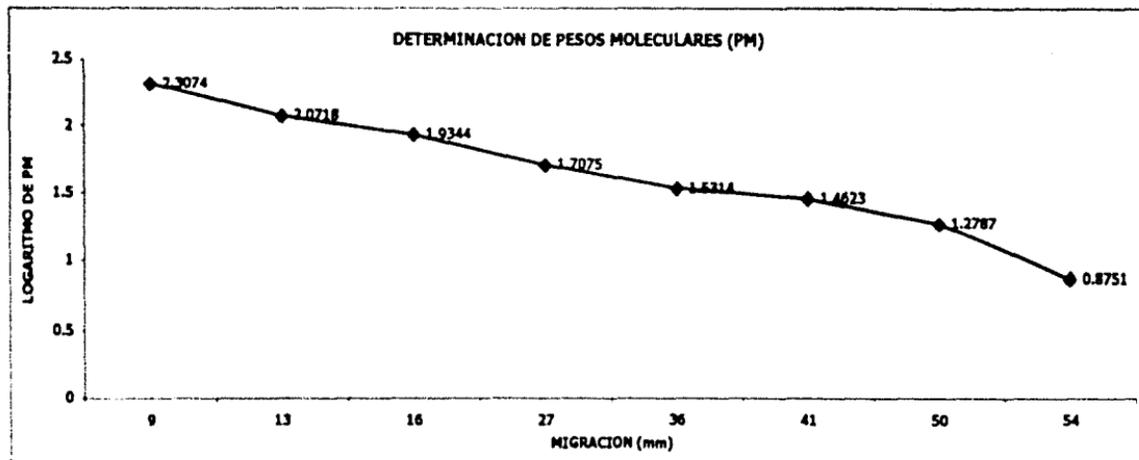
obtenidos en este estudio unidos a los datos de un estudio paralelo de la cinética de producción de anticuerpos en conejos (Romero, 2001) inoculados con las mismas cantidades de hTc nos permiten recomendar que los días más adecuados para la obtención del suero son del día 57 al 127 p.i.. En estos días se conjunta la máxima producción de anticuerpos y el máximo reconocimiento de bandas proteínicas. Además del reconocimiento antigénico por parte de los conejos, el bajo costo y la facilidad de manutención, nos permiten considerar al conejo como un modelo en el que se puede obtener sueros de referencia positivos a la toxocariasis para su posible uso en Inmunodiagnóstico.

**BANDAS RECONOCIDAS POR LOS SUEROS DE CONEJOS INFESTADOS
EXPERIMENTALMENTE CON *Toxocara canis***

No.	mm	LOG(PM)	PM(kDa)	AJUSTE	REFERENCIA
1	0.4	2.5690	370.68	400	1,5
2	1.3	2.867	122.09	120	1,2,3,5
3	1.8	1.8187	65.87	66	2,3,5
4	2.4	1.7622	57.83	55	1,5
5	3.0	1.6516	44.83	45	2,3
6	3.5	1.5595	36.27	35	4,1
7	3.9	1.4858	30.61	32	1,2,5

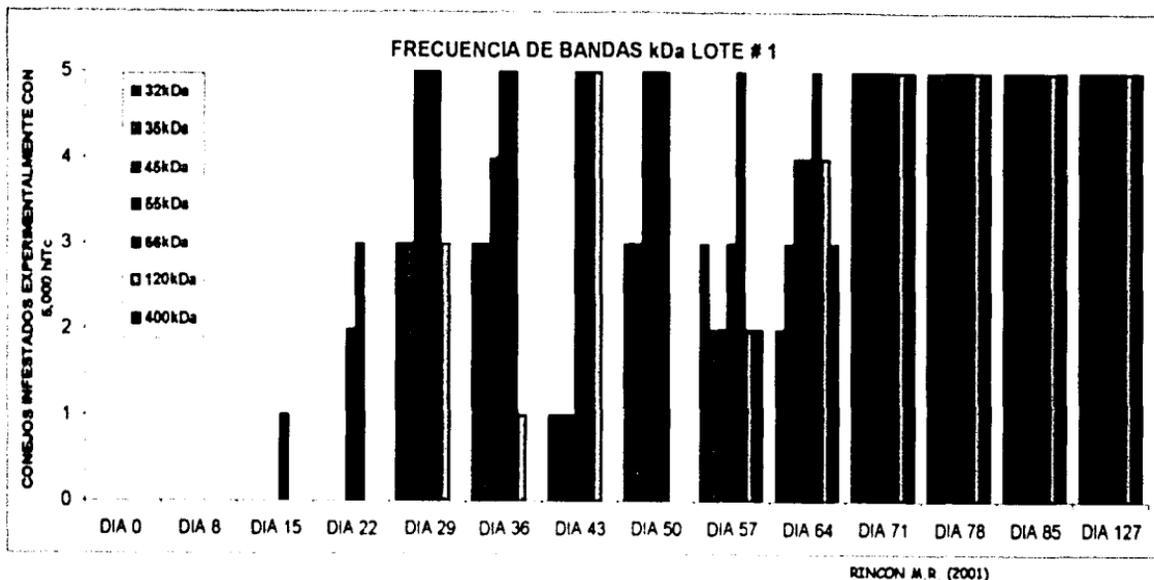
CUADRO No.3 Bandas de Ag-EST reconocidas por sueros de conejos infestados experimentalmente con larvas de *Toxocara canis* por medio de la técnica de Western blot teñidos con una técnica de peroxidasa. Los valores con similitud a antígenos reportados por Meghji & Maizels¹ (1986); Badley y col.² (1987); Ramp y col.³ (1987); Magnaval y col.⁴ (1991); Page, Hamilton y Maizels⁵ (1992).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

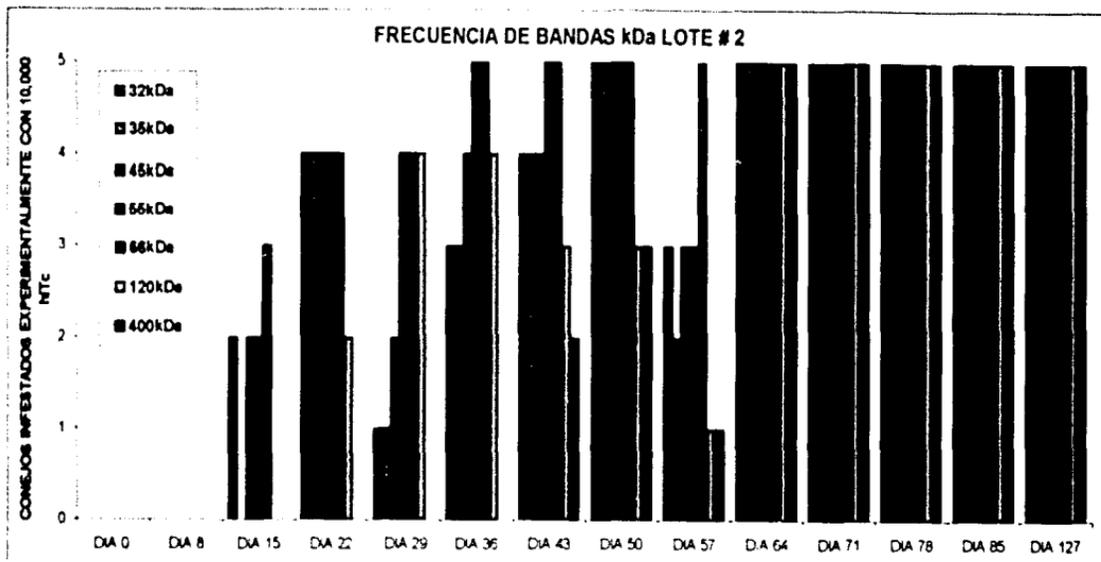


RINCÓN M. R. 2001

GRAFICA No. 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. Los MPM fueron : Miosina 203 kDa, β -galactosidasa 118 kDa, albúmina sérica bovina 86 kDa, ovalbúmina 51 kDa, anhidrasa carbónica 34 kDa, inhibidor de la tripsina 29 kDa, lisosima 19 kDa y aprotinina 7.5 kDa.



GRAFICA 2.- Frecuencia de Ag-EST reconocidos por sueros de conejos infestados experimentalmente con 5,000 hTc (Lote # 1) a diferentes días post-infección. La determinación se realizó por medio de la técnica de Western Blot.



RINCON M. R. (2001)

GRAFICA No. 3.- Frecuencia de Ag-EST reconocidos por sueros de conejos infestados experimentalmente con 10,000 hTc (Lote # 2) a diferentes días post-infección. La determinación se realizó por medio de la técnica de Western Blot.

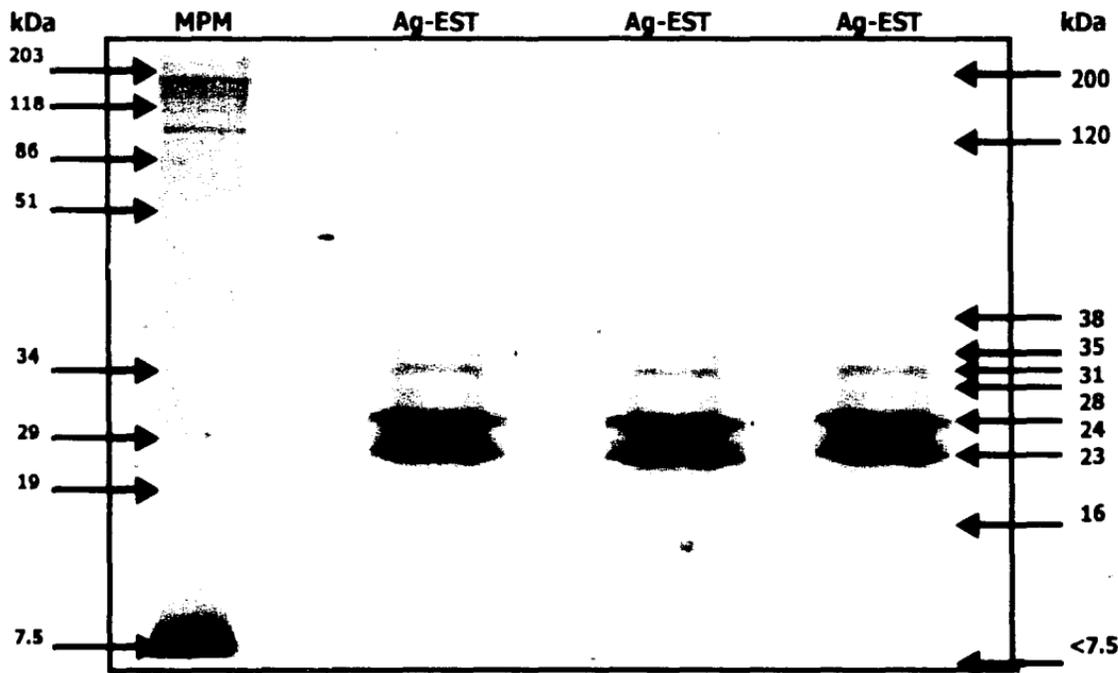


FIGURA No. 4 Separación de los Ag-EST por electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida teñidos por la técnica de Nitrato de Plata, del lado izquierdo se encuentran los marcadores de peso molecular (MPM), en el lado derecho el peso molecular de los Ag-EST.

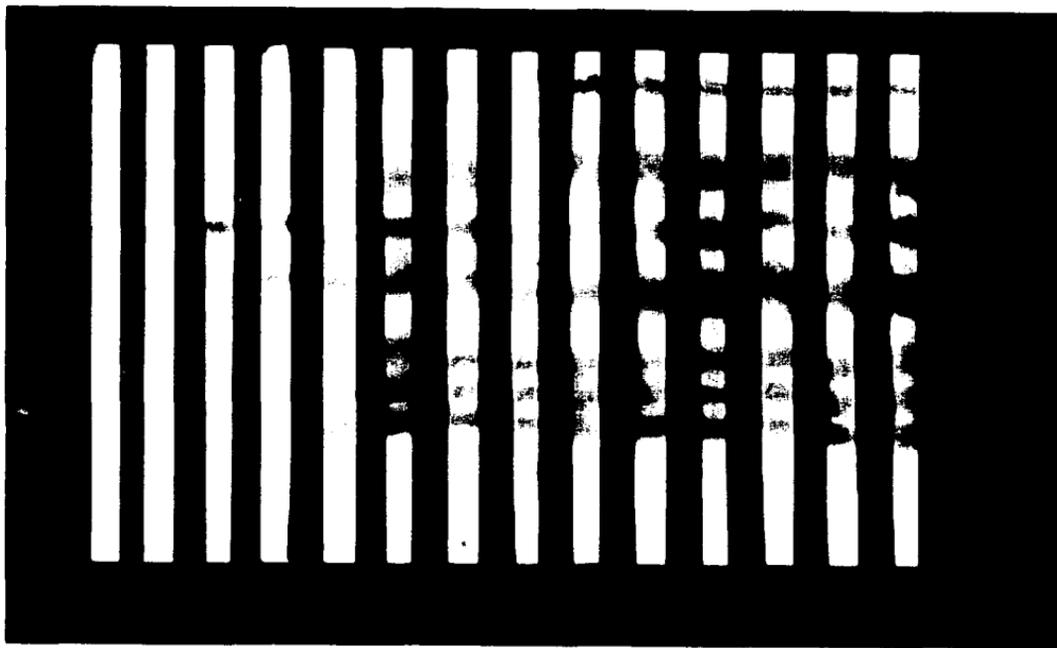


FIGURA No. 5 Bandas reconocidas por el suero de conejos inoculados con 5,000 HIUc a diferentes períodos de tiempo después de la inoculación.

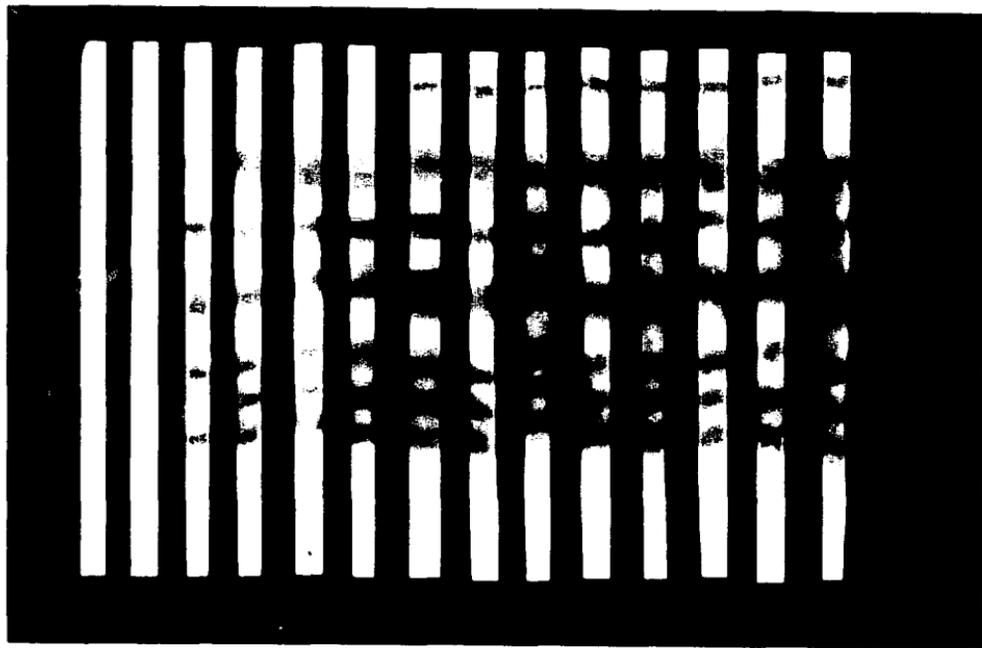


FIGURA No. 6 Bandas reconocidas por el suero de los conejos inoculados con 10,000 hITc a diferentes períodos de tiempo después de la inoculación.

CONCLUSIONES

- El PM de los Ag-EST reconocidas en el gel de SDS-PAGE y teñidas con AgNO_3 son de: 200, 120, 38, 35, 32, 28, 24, 23, 16 y tres bandas de menos de 7.5 kDa
- Por Western blot o inmunodetección se observó un reconocimiento secuencial de los Ag-EST.
- Las bandas de 32, 35, 45, 55, 66, 120 y 400 kDa de PM en el grupo de 5,000 hITc se detectaron a partir del día 57 hasta el día 127 p.i. mientras que en el grupo de 10,000 hITc se detectaron a partir del día 43 hasta el día 127 p.i.
- Los sueros de los conejos infestados con 5,000 o 10,000 hITc pueden ser utilizados como sueros de referencia en el inmunodiagnóstico de la toxocarías humana.

APÉNDICE I

Reactivos para la electroforesis

ACRILAMIDA-BISACRILAMIDA (30:0.8)

- Pese 30g de acrilamida
- Pese 0.8g de bisacrilamida
- Disuelva en agua desionizada hasta obtener 100ml,
- Filtre la solución a través de papel filtro Whatman No.1
- Almacene a 4° C y protéjalo de la luz.

DUODECIL SULFATO SODICO (SDS) 10%(p/v)

- Pese 10g de SDS
- Disuelva en agua desionizada hasta obtener 100ml
- La solución obtenida debe ser clara e incolora, si no se disuelve completamente el SDS, caliente la solución hasta disolverse.

BUFFER 3.0M TRIS-HCl (pH 8.8)

- Pese 36.6g de Tris (Tris(hydroxymethyl) aminometano)
- Disuelva en 48ml de HCl 1.0M
- Ajuste la solución hasta obtener 100ml, con agua desionizada.
- Filtre la solución a través del papel filtro Whatman No. 1
- Almacene a 4° C.

BUFFER 0.5M TRIS-HCl (pH 6.8)

- Pese 6.0g de Tris
- Disuelva en 40 ml de agua desionizada
- Agregue HCl gota a gota hasta alcanzar un pH de 6.8
- Ajuste a un volumen de 100ml, con agua desionizada.
- Filtre la solución a través de papel Whatman No. 1
- Almacene a 4° C

BUFFER DE CORRIMIENTO 0.25 M TRIS-HCl, 1.92M GLICINA, 1%

SDS (pH 8.3)

- Pese 3.03 g de Tris, 14.4g de glicina y 1.0g de SDS
- Disuelva en 1 litro de agua desionizada
- Ajuste a un pH 8.3 con HCl, gota a gota
- Almacene a temperatura ambiente.

BUFFER DE LAEMMLI

- 0.0625M Tris-HCl (pH 6.8)
- 2% SDS
- 5% 2-mercaptoetanol
- 10% Glicerol
- 0.002% azul de bromofenol

PERSULFATO DE AMONIO 15%(p/v)

- Pese 15.0 g de persulfato de amonio
- Disuelva en 10ml de agua desionizada
- Esta sustancia es inestable y debe ser prepara justo antes de ser utilizada.

TEMED (N,N,N',N',-TETRAMETILENEDIAMINA)

Se utiliza tal y como se compra, es estable siempre y cuando no se diluya, se debe mantener a 4° C y protegido de la luz.

PREPARACIÓN DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA PARA LA ELECTROFORESIS.

GEL SEPARADOR

En un vaso precipitado de 50 ml y con pipetas graduadas (todo el equipo debe estar limpio y estéril), coloque:

- 4.5ml de agua desionizada,
- 1.25ml de Tris-HCl 3.0 M pH 8.8
- 100 μ l de SDS 10% (p/v)
- 4.0ml de acrilamida (30:0.8)
- 500 μ l de persulfato de amonio 15%(p/v)
- 5 μ l de TEMED

GEL CONCENTRADOR

En un vaso precipitado de 50ml y pipetas graduadas (limpias y estériles) coloque:

- 6.0ml de agua desionizada
- 2.5ml de Tris-HCl 0.5M pH 6.8
- 100 μ l de SDS 10% (p/v)
- 4.0ml de acrilamida
- 500 μ l de persulfato de amonio 15% (p/v)
- 5 μ l de TEMED

APÉNDICE II

TINCIÓN DE PLATA

Para un gel, prepare la siguiente solución:

- De una solución de DL-Dithiothreitol (20mg/ml) tome 12.5µl y afofe a 100ml con etanol (50% (v/v))
- Mantenga en agitación a 50 rpm durante 1-2 horas.
- Lave con agua destilada 150ml/gel a 50 rpm durante 1 hora
- Sumerja en la siguiente solución: 200µl de Tiosulfato de sodio Pentahidratado (100mg/ml) en 100 ml de agua destilada durante 1 minuto.
- Lave con agua destilada por 20 segundos, 3 veces.
- Prepare una solución de plata de la siguiente manera: pese 0.8g de Nitrato de plata (AgNO_3) y disuelva en 4ml de agua destilada.
- Prepare 20ml de Hidróxido de sodio al 0.4%, mezcle con 1.5 ml de solución de amonía (0.88g NH_4OH) y agregue la solución de plata gota a gota con agitación continua, ajuste la solución hasta 100ml.
- Mantenga el gel sumergido y en agitación a 70rpm por 30min.
- Lave con agua destilada 150ml/gel a 70rpm por 5 minutos, 3 veces.
- Prepare la solución reveladora: mezcle 200µl de solución de formaldehído al 40% (p/v) con 2.5 ml de ácido cítrico 1%, agregue 20µl de la solución de tiosulfato de sodio y ajuste a 500ml. Utilice

150ml/gel por 10 minutos de 1 a 3 veces según aparezcan las proteínas teñidas.

- Para detener la tinción deseche la solución reveladora y agregue 100ml de la siguiente solución: metanol al 50% y ácido acético al 5% para formar 100ml, 100ml/gel durante 10min.
- Conservación del gel: 100ml de Etanol o metanol al 10% a 4° C por gel.

APÉNDICE III

REACTIVOS PARA LA TRANSFERENCIA DE PROTEINAS

BUFFER DE TRANSFERENCIA pH 8.3

- Tris 25mM
- Glicina 192mM
- SDS 0.05%(p/v)
- Metanol 20%

TRIS BUFFER SALINO (TBS)

Mezcle:

- 30ml de una solución de NaCl 5M
- 20ml de una solución de Tris-HCl 1M pH 7.5
- y afore a 1 litro con agua desionizada.

TRANSFERENCIA DE PROTEINAS

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.
- Corte seis piezas de papel filtro Whatman No.1 y una membrana de nitrocelulosa del tamaño del gel.
- Limpie las placas de carbón del aparato con agua destilada.
- Sumerja la membrana de nitrocelulosa en agua destilada, se coloca cuidadosamente sobre la superficie del agua, para que se hidrate por capilaridad, por 10 minutos.
- Después sumerja la membrana en buffer de transferencia por 5 minutos.
- Sumerja el papel filtro Whatman No.1 en buffer de transferencia, por 10 minutos.
- Ensamble de la siguiente manera, en el electrodo inferior:
- Tres capas de papel filtro Whatman No. 1 .
- Membrana de nitrocelulosa
- Gel de poliacrilamida
- Tres capas de papel filtro Whatman No.1
- Evite la formación de burbujas, en caso de estar presentes retírelas rodando una pipeta Pasteur sobre el sándwich formado.

- Coloque cuidadosamente el electrodo superior sobre el sándwich
- Conecte los electrodos y comience la transferencia
- Al finalizar la transferencia, marque la membrana de nitrocelulosa para saber su orientación.
- Los sitios de unión de proteína restantes en la membrana de 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 debe utilizar guantes durante todo el proceso de transferencia y membranas nuevas, el buffer de transferencia no es reutilizable.

APÉNDICE IV

WESTERN BLOT (INMUNODETECCIÓN (ID))

- La membrana de nitrocelulosa, se corta en tiras de 3-5mm de ancho.
- Las tiras se colocan en los pozos marcados para identificarlas.
- Se agrega 2ml de la dilución del suero problema en buffer de bloqueo (PBS-Leche Sveltes 5%) , incube durante 2 horas a 37° C
- Lave con PBS-Tween 20 al 0.1% por espacio de 3 minutos, 5 veces.
- Agregue 2 ml de la dilución óptima del conjugado, incube por 1 hora a 37° C.
- Lave con PBS-Tween 20 al 0.1 % durante 1 minuto, 7 veces.
- Agregue 2ml de la solución sustrato (Peróxido de hidrogeno 0.01%(v/v), 4-cloro-1-n-Naftol 0.05%(p/v) Metanol 16.6%(v/v) en PBS) manténgalo en agitación y protegido de la luz hasta la aparición de las bandas.
- Enjuague con agua de la llave y deje secar.

BIBLIOGRAFÍA

Abo-Shehada, M. N.; Al-Zubaidy, B. A. & Hebert, I. V. (1984). The migration of larval *Toxocara canis* in mice I. Migration through the intestine in primary infections. **Vet. Parasitol.**, 17(6):65-73.

Abo-Shehada, M. N. & Herbert I. V. (1984). The migration of larval *Toxocara canis* in mice II post-intestinal migration in primary infections. **Vet. Parasitol.**, 17:75-83.

Agnihotri, R.K., Bhatia B. B. & Kumar D. (1987) Visceral larva migrans 1. Migratory behaviour of *Toxocara canis* larvae in golden hamster and chicken. **Ind. J. Ann. Sc.** 57(8):853-855.

Alba H. F. (1991) *Toxocara canis* un problema de salud pública. **Av. Med. Vet.** Año V Vol X. 5: 187-191.

Alba H. F., Flores-Alatorre L., Cuellar O. J. A., Martínez L. J. P. (1994) Desarrollo de un nuevo modelo de toxocariasis ocular. Memorias del XXV Congreso Nacional de Microbiología. Ciudad Obregón, Sonora.

Alba H. F. (1999) Evaluación de un modelo de toxocariasis ocular y sistémica empleando jerbos (*Meriones unguiculatus*). Tesis de Doctorado. **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.**

Alba H. F, Tortora P. J. L., Tsutsumi, V. & Ortega Pierres M. G. (2000) Histopatological investigation of experimental ocular toxocariasis in gerbils. **Int. J. Parasitol.** 30 (2): 143-147

Aljeboori T. I. & Ivey M. H. (1970) *Toxocara canis* infections in baboons. I. Antibody, white-cell, and serum protein responses following infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 19: 249-254.

Amir J., Harel L., Eidlitz-Markus, T. & Varsano I, (1995). Lymphedema as a presenting sign of toxocarasis. **Infection**. 23 (6):389-390.

Baez M. y Alemán p. (1960) *Larva Migrans Visceral*. Primer caso comprobado en México. **Rev. Ins. Salubr. Enf. Trop.** 20: 168-171.

Badley J. E., Grieve R. B., Bowman D. D., Glickman L.T., Rockey J.H. (1987), Analysis of *Toxocara canis* larval excretory-secretory antigens: Physicochemical characterization and antibody recognition. **J. Parasitol.** 73(3): 593-600.

Bardon R. Guillen J.L., and Aguila C. (1994), Idiotypic replica of a *Toxocara canis* excretory/secretory antigen epitope., **Intern. J. Parasitol.**, 25(1) 105-111.

Bass J.L, Mehta K. A., Glickman L.T., Blocker R. Eppes B.M. (1987), Asymptomatic Toxocarasis in children. A prospective Study ant Treatment trial. **Clinical Pediatrics**, 26(9): 441-446.

Beaver P.C., Snyder C.H., Carrera G.M., Dent J.H. and Lafferty J.W. (1951), Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. **Am. J. trop. Med. Hyg.**, 7-18.

Beaver P.C. (1969), The natural of visceral larva migrans, **The J. Parasitol.** 55(1); 3-12

Beaver P. C., Jung R, C, & Cupp E. W., (1987) *Clinical Parasitology*. Lea & Febiger USA.

Bio-Rad. Trans Blot SDS electrophoretic transfer cell instruction manual. Cat. 170-3940. 1996.

Borg O. A. and Woodruff A. W. (1973). Prevalence of infective ova of *Toxocara* species in public places. **Br. Med. J.** 4: 470-472.

Bowman D. D., Mika-Grieve M., Grieve Robert B. (1987) Circulating excretory-secretory antigen levels and specific antibody responses in mice infected with *Toxocara canis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 36(1): 75-82.

Buendía J. J. A., (2000) Evaluación de las lesiones histopatológicas producidas por larvas *Toxocara canis* en jerbos (*Meriones unguiculatus*) después del tratamiento con moxidectina. Tesis de Licenciatura **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.**

Buijs J., Lokhorst W. H., Robinson J. and Nijkamp F.P. (1994), *Toxocara canis*-induced murine pulmonary inflammation: analysis of cells and proteins in lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid. **Parasite Immunology**; 16: 1-9.

Buijs J., Egbers M. W. and Nijkamp K. P. (1995) *Toxocara canis* induced airway eosinophilia and tracheal hyporeactivity in guinea pigs and mice. **Eur. J. Pharmacol.**, 293 (3):207-215.

Choo L. N. (1990). Contamination of children's playgrounds with *Toxocara* hookworm larvae in Singapore. **Sing. Vet. J.** 14: 66-69.

Coffman R. L., Seymour B. W. P., Hudak S., Jackson, J. , Rennick D. (1989) Antibody to interleukin-5 inhibits helminth induced eosinophilia in mice. **Sci.**245: 308-309.

Cuéllar C., Fenoy S. & Guillén J. L. (1995) Cross-reactions of sera from *Toxascaris leonine* and *Ascaris suum* infected mice with *Toxocara canis*, *Toxascaris leonine* and *Ascaris suum* antigens. **Int. J. Parasitol.**, 25 (6):731-739.

Cypess R.H., Karol M. H., Zidian J.L., Glickman L.T., Gitlin D. (1977), Larva-specific antibodies in patients with visceral larva migrans. **The J. of Infections Diseases**, 135(4): 633-642.

Dada B. J. O. (1979), A new technique for the recovery of *Toxocara* eggs from soil, **J. of Helminthology**. 53: 141-144

DeBuen S., Biagi F. Y Pérez R. T. (1996). Primer caso de toxocariasis ocular en México. **Pres. Med. Méx.** 1: 168-171.

Desai U. R., Blinder K. J., and Dennehy P. J. (1996) Vitrectomy and juvenile epiretinal membrane. **Ophthalmic. Surg. Lasers.** 27(2):137-139.

DeSavigni D. H. (1975) In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. **J. Parasitol.** 61:781-782.

DeSavigni D. H. & Thizard I. R. (1977) Toxocaral larva migrans: the use of larval secretory antigens in haemagglutination and soluble antigen fluorescent antibody tests. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 71(6): 501-507.

DeSavigni D. H., Vollmer A. & Woodruff A. W. (1979) Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. **J. Clin. Pathol.** 32 (3): 284-288.

Douglas J. R. & Beker N. R. (1959). The chronology of experimental intrauterine infection with *Toxocara canis* (Werner, 1782) in the dog. **J. Parasitol.** 45:43-44.

Dunn A. M., (1983) *Helmintología veterinaria*. 2ª edición, Editorial El Manual Moderno, México.

Dunsmore J. D., Thompson R. C., Bates L. A., (1983) The accumulation of *Toxocara canis* larvae in the brain of mice. **Int. J. Parasitol.** 13: 517-521.

Duwel D. (1984) The prevalence of *Toxocara* eggs in the sand in children's playgrounds in Frankfurt. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, 78 (6):633-636.

Equi-Aguilar (1998) Análisis ecológico de comunidades de helmintos intestinales de perros obtenidos en centros de control canino del D.F., México. Memorias del XIII Congreso Nacional de Parasitología, Zacatecas, Zac.

Enehelu C. O. & Fakae B. B. (1986) Prevalence of *Toxocara canis* ova on playgrounds of nursery schools in Nsukka, Nigeria. **Int. J. Zoonoses.** 13 (3):158-161,

Enayat M. S. & Pezeshki M. (1977). The comparison of counterimmunoelectrophoresis with indirect haemagglutination test for detection of antibodies in experimentally infected guinea pigs with *Toxocara canis*. **J. Helminthol.** 51(2):143-148.

Fenoy S., Cuellar C., Aguila., and Guillen J. L. (1992), Persistence of immune response in human toxocariasis as measured by ELISA, **Intern. J. Parasitol.**, 22 (7); 1037-1038.

Finkelman F.D., Gause W. C., and Urban J.F. (1995), Cytokine control of protective immunity against nematode infections. **Mol. App. Parasitol.** 467-476.

Flores-Alatorre H.L. (1993) Estudio histopatológico de las lesiones causadas por larvas de *Toxocara canis* en ojos de gerbos (*Meriones unguiculatus*). Tesis de Licenciatura. **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.**

Fulleborn F. (1921) Askarisin fertion durch verzeahren eingekapselter larven und ubre gelungene intrauterine askarisin fertion. **Arch. Schiffs Tropen. Hyg.** 25:367-375.

Gass J. D. & Braunstein R. A. (1983). Further observations concerning the diffuse unilateral subacute neuroretinitis syndrome. **Arch. Ophthalmol.** 101(11):1689-1697.

Gavin I. J. (1964) Experimental *Toxocara canis* infection in chicken and pigeons. **J. Parasitol.**, 50: 124-127.

Gems D., and Maizels R.M. (1996), An abundantly expressed mucin-like protein form *Toxocara canis* infective larvae: The precursor of the larval surface coat glycoproteins, **Med. Sci.**,; 93; 1665-1670.

Glickman L., Cypess R., Hiles D. and Gessner T. (1979), *Toxocara canis* antibody in the serum and aqueous humor of a patient with presumed ocular and visceral toxocariasis. **Am. J. trop. Med. Hyg.**, 28(1): 29-33.

Glickman L. T., Shofer F. S. (1987) Zoonotic viscerak and ocular larva migrans, **Vet. Clin. Nth. Am. Small. Ann. Pract.** 17(1): 39-53.

Glueglio B. De-GrentileL. Nguyen J. M., Achard j., Chabasse D. & Marjolet M. (1994) Epidemiologic approach to human toxocariasis in western France. **Parasitol. Res.** 80(6):531-536.

Hakim L. S., Thadasavanth M., Shamila R., and Yogeswari S. (1997), Prevalence of *Toxocara canis* antibody among children with bronchial asthma in Klang Hospital, Malaysia. **Trans. R. Soc. Trop Med. Hyg.** 91; 528-529.

Havaslová-Reiterová K. Tomasovicová O., Dubinsky P. (1995), Effects 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.

Heiwigh A. B. , Lland P. Nansen P. (1999), Visceral larva migrans migratory pattern of *Toxocara canis* in pigs. **Int. J. Parasitol.** 29:559-565.

Holland C.V., O'Lorcain P. Taylor M.R.H. and Kelly A. (1994), Sero-epidemiology of toxocariasis in school children. **Parasit. Immunol.**, 535-543.

Horn K. Schenieder T & Stoye M. (1997) Contamination of public children's playgrounds with helminth eggs in Hannover. **Deut. Tier. Wonchen.** 97(3):124-125.

Huntley C. C., Costas M. C. & Lyerly A. (1965). Visceral larva migrans síndrome: Clinical characteristics and immunologic studies in 51 patients. **Pediatrics** 36 (4): 523-536.

Inuo Gen, Akao N., Kohsaka H., Saito I., Miyasaka N. (1995), *Toxocara canis* adult worm antigen induces proliferative response of healthy human peripheral blood mononuclear cells. **Parasit. Immunol.**, 17: 77-84.

Jimenez J. F., Valladares B., Fernández-Palacios J. M., Armas de F., Castillo de, A. (1997). A serologic study of human toxocariasis in the Canary Island (Spain): environmental influences **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 56(1):113-115.

Jones R. E., Finkelman F.D., Hester R.B. and Kayes S.G. (1994), *Toxocara canis*: failure to find IgE receptors (FcεR) on eosinophils from infected mice suggests that murine eosinophils do not kill helminth larvae by an IgE-dependent mechanism. **Experim. Parasitol.**, 78:64-75.

Kirk R. W. (1984) *Práctica de clínica canina en pequeñas especies*. 4ªed. Edit. Interamericana, México D. F.

Kornblatt A.N., Schantz P. M.(1989), Veterinary and public health considerations in canine roundworm control: A survey of practicing veterinarians. **JAVMA**, 177 (12): 1212-1215.

Kusama Y., Takamoto M., Kasahara T., Takatsu K. Nariuchis H. & Sugane K. (1995) Mechanisms of eosinophilia in BALB/c-un/+ and congenitally athypic BALB/c-un/un mice infected with *Toxocara canis* **Immunology** 84:461-468.

Laemli W. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 **Nature**, 227:680-685.

Liotet, S. , Bloch M. E., Petithory J. C., Betellier L & Chaumeil C. (1992) Biological modifications of the vitreous in intraocular parasitosis: Preliminary study. **Int. Ophthalmol.** 61(2):75-80.

Lokman-Hakim S., Thadasavanth M., Raden-Shamillah R. H. & Yogeswari S. (1997) Prevalence of *Toxocara canis* antibody among children with brochial asthma in Klanh Hospital, Malaysia. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 91:528-529.

Luengo, J. A., Castellanos R.R., Martínez G. H., (1997) *Manual de Parasitología*, Barcelona

MagnaVal J. F., Fabre R., Maurières P., Charlet J.P., and Larrard B. de I. (1991), Application of the Western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. **Parasitol. Res.** 77: 697-702.

MagnaVal J.F., Fabre R., Maurières P., Charlet J.P., and Larrard B. (1992), Evaluation of an immunoenzymatic assay detecting specific anti-*Toxocara* immunoglobulin E for diagnosis and Post-treatment follow-up of human toxocariasis. **J. fo Clin. Microbiology**, 30 (9); 2269-2274.

MagnaVal J. F., Galindo V., Glickman L. T. & Clanet M. (1997) Human *Toxocara* infection of the central nervous system and neurological disorders: a case control study. **Parasitol.** 115:537-543.

Maizels R. M., Kennedy M. W., Meghji M., Robertson B. D. & Smith H. V. (1987) Shared carbohydrate epitopes on distinct surface and secreted antigen of the parasitic nematode *Toxocara canis* **J. Immunol** 139:207-214.

Maizels R. M. , Savigny D., Olgvie B.M. (1984) Biochemical properties of larval excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. **Parasitol. Immunol.** 6;23-34.

Maruyama S., Nino T., Yakamoto K. & Katsube y. (1994a) Parasitism of *Toxocara canis* larvae in chickens inoculated with the ascarid eggs. **J. Vet. Med. Sci.** 56(1): 130-141.

Maruyama S., Nino T., Yakamoto K. & Katsube y. (1994b) Infectivity of *Toxocara canis* larvae from Japanese quail in mice, **J. Vet. Med. Sci.** 56(2):399-401.

Meghji M., Maizels R.M. (1986), Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. **Mol. And Bioch. Parasitol.**, 18: 155-170.

Muñoz M. A. (1997) 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. Tesis de Licenciatura. **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.**

Nakamura S., Sotoyama T., Hayasaka S., Kameyama Y., (1991) Parasitism of *Toxocara canis* larvae in Japanese quail by inoculation of the ascarid eggs. **J. Vet. Med. Sci.** 53(5):865-872.

Nelson S., Greene T. & Enhart C. B. (1996) *Toxocara canis* infection in preschool age children: risk factors and the cognitive development of preschool children. **Neurotoxicol. Teratol.**, 18 (2): 167-174.

Niedfel G., Pezzani B., Minvielle M., Basualdo-Fajart, (1991) Presence of lipids in the secretory-excretory products from *Toxocara canis* **Vet. Parasitol.**, 51 (1): 1551-1558.

Ohima T. (1961) Standardization of techniques for infecting mice with *Toxocara canis* and observations on the normal migration routes of the larvae. **J. Parasitol.** 17: 652-656.

Olsen O. W. (1974) animal parasites Park Press, Baltimore, USA.

Olsen O. W. (1977) Parasitología animal Vol. 2 Editorial Aedos España.

Olson L. J., Rose J. E., (1979), Effect of *Toxocara canis* infection on the ability of white rates to solve maze problems. **Exp. Parasitol.** 19: 77-84.

Page A. P., Hamilton A.J., Maizels R.M. (1992a), Monoclonal Antibodies to Carbohydrate epitopes of secreted (TES) Antigens Localize to Different Secretion-Related Structures in Infective Larvae. **Experimental Parasitology.** 75:56-71.

Page A. P., Rudini W., Fluri E., Blaxter M.L. & Maizels R. M. (1992b) *Toxocara canis*: A labile antigenic surface coat overlaying the epicuticle of infective larvae. **Exp. Parasitol.** 75:72-86.

Page A. P., Rudini W., Maizels R. M. (1992c), Lectin binding to secretory structures, the cuticle and the surface coat of *Toxocara canis* infective larvae. **Parasitology.** 105:285-296.

Parsons J. C., Coffman R. L., Grieve R. B. (1993), Antibody to interleukin 5 prevents blood and tissue eosinophilia but not trapping in murine larval toxocariasis. **Parasite Immunology.** 15: 501-508.

Quiroz R. H.,(1984), Parasitología y enfermedades de los animales domésticos. 1ª edición. Editorial LIMUSA, México.

Ramp T., Ecker J., Golstein B. (1987), Cryopreservation and long-term in vitro maintenance of second stage of *Toxocara canis*. **Parasitol. Res.** 73:165-170.

Read A. F., Skorping A. (1995), The evaluation of tissue migration by parasitic nematode larvae. **Parasitology.** 111: 359-371.

Romero S. G. A. (Tesis en prensa) Evaluación por ELISA de IgG específica contra antígenos de excreción y secreción de la larva L2 de *Toxocara canis* en conejos

inoculados experimentalmente. Tesis de Licenciatura. **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.**

Schacher J. F. (1957), A contribution to the life history and larval morphology of *Toxocara canis*. **Trop. Med. And Public Health.**, 599-610.

Schantz P. M. , Meyer D., Glickman L. T. (1979), Clinical, serologic and epidemiologic characteristics of ocular Toxocariasis, **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 28(1): 24-28.

Sher A. (1995), Regulation of cell-mediated immunity by parasites: the ups and downs of an important host adaptation., 431-442.

Shields E.S. (1984) Ocular toxocariasis. A review., **Sury, Ophthalmol.** 28:369-379.

Shofer F. S., Glickman L.T. & Marmor M. (1985) Zoonotic dog roundworm (*Toxocara canis*) infection of children. Epidemiologic and neuropsychologic findings **Am. J. Epidemiol.** 122:515-516.

Shrand H., Cape Town M. B. (1964), Visceral larva migrans. *Toxocara canis* infection. **The Lancet.**, 1357-1359.

Smith H. V., Kusel J. R., Girdwood W. A. (1983), The production of human A and B blood group like substances by in vitro maintained second stage *Toxocara canis* larvae: their presence on the outer larval surfaces and in their excretions secretions. **Exp. Immunology** 54: 625-633.

Smith H. V., Quinn R., Bruce R. G. Gridwood R. W. (1982), Development of the serological response in rabbits infected with *Toxocara canis* and *Toxocara leonine*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 67 (1): 89-94.

Sprent J. P. (1958) Observations on the development of *Toxocara canis* in the dog. **Parasitol.** 48: 184-209.

Stevenson P. & Jacobs D. E. (1977) *Toxocara* infection in pigs. The use of indirect fluorescent antibody tests and an in vitro larval precipitate test for detecting specific antibodies. **J. Parasitol.** 51 (2): 149-154.

Sugane K., Oshima T. (1982), Eosinophilia, granuloma formation and migration behaviour of larvae in the congenitally athymic mouse infected with *Toxocara canis*. **Parasitol. Immunol.** 4: 307-318.

Sugane K., Oshima T. (1983), Purification and characterization of excretory-secretory antigen of the *Toxocara canis* larvae. **Immunol.**, 50: 113-118.

Takamoto M., Kusuma Y., Takutsu K., Nariuchi H., Sugane K, (1995), Occurrence of interleukin-5 production by CD4 CD8 (double-negative) T cells in lungs of both normal and congenitally athymic nude mice infected with *Toxocara canis*. **Immunology.** 85: 258-291.

Takamoto M., Sugane K. (1993), Mechanisms of eosinophilia in *Toxocara canis* infected mice: In vitro production of interleukin-5 by lung cells of both normal and congenitally athymic nude mice. **Parasite. Immunology.** 15: 493-500.

Tomimura T., Yokota M., Hiroaki. T. (1976), Experimental larva migrans in monkeys I. Clinical hematological and gross pathological observations on monkeys

with embrionated eggs of dog ascarid, *Toxocara canis*. **Jap. J. Vet. Sci.** 38: 533-548.

Umeche N. (1989) Helminth ova in soil from children's playgrounds in Calabar, Nigeria.

Wang M. Q., Jiang H. J., Inoue H., Myozaki M. Yamashita U., (1995), B cell mitogenic activity of *Toxocara canis* adult worm antigen. **Parasite Immunology**. 17: 609-615.

Worley G., Green J.A. Frothingham T. E., Sturner R.A., Walls K.W., Pakalnis V. A., and Ellis G.S. (1984), *Toxocara canis* infection: Clinical and epidemiological associations with seropositivity in Kindergarten children, **The J. of Infectious diseases**, 149(4), 591-598.

Yahiro S., Cain G., Butler J. E., (1998), Identification, characterization of *Toxocara canis* nematode polyprotein allergen TBA-1. **Parasite Immunology**, 20: 351-357.

Yang J., Keystone J. S., McIntyre L., and Spenci H. (1982), *Toxocara* antibodies in veterinary personnel. **Can-vet. J.** 23: 126-128.