

11674



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA REPRODUCCION Y
DE LA SALUD ANIMAL**

**“DETERMINACION DE LAS POBLACIONES CECULARES
EN PULMON DE RATONES INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE CON HUEVOS LARVADOS DE
Toxocara canis”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

JAVIER ALEJANDRO BUENDIA JIMENEZ

TUTOR: Dr. FERNANDO ALBA HURTADO
COMITE TUTORAL: Dr. MARCO A. VEGA LOPEZ
Dr. ANDRES ROMERO ROJAS

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO, JUNIO 2004



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.

ÍNDICE

1.0	Abreviaturas	i
2.0	Índice de figuras	ii
3.0	Índice de cuadros y tablas	iii
4.0	Resumen	iv
5.0	Introducción	1
5.1	Morfología de <i>Toxocara canis</i>	1
5.2	Ciclo biológico	4
5.3	Problemas de salud pública	6
5.3.1	Síndrome de <i>Larva Migrans Visceral</i>	6
5.3.2	Síndrome de <i>Larva Migrans Ocular</i>	7
5.4	Respuesta inmune frente a infestaciones con <i>T. canis</i>	8
5.5	Sistema inmune pulmonar	11
5.5.1	Células del espacio alveolar	12
5.5.2	Tejido linfoide asociado a bronquios y bronquiolos (BALT).	12
5.5.3	Células inmunitarias asociadas al espacio intersticial.	15
5.6	Efecto de infecciones en el sistema inmune pulmonar	17
5.7	Antecedentes	20
6.0	Justificación	25
7.0	Hipótesis	27
8.0	Objetivo general.	27
9.0	Objetivos particulares.	27
10.0	Material y métodos	28
10.1	Animales.	28
10.2	Obtención del inóculo.	28
10.3	Diseño Experimental	29
10.4	Procesamiento de cortes histológicos	30
10.5	Procesamiento de cortes histológicos congelados	31
10.6	Anticuerpos monoclonales	31
10.7	Tinción con la técnica de inmunoperoxidasa (Avidina-Biotina)	32
10.8	Determinación del número de células	35
10.9	Análisis estadístico	35
11.0	Resultados	37
12.0	Discusión	63
14.0	Conclusiones	74
15.0	Bibliografía	76
APENDICE I		
APENDICE II		

ABREVIATURAS

Abs	Anticuerpos
Ags	Antígenos
Apb	Área peribronquial
Apv	Área perivascular
AT	Área tisular
BALT	Tejido linfoide asociado a bronquios
DAB	Diaminobencidina
g	Gravedades
hltc	huevos larvados de <i>T. canis</i>
Hltc	Inoculados con huevos larvados de <i>T. canis</i>
IL	Interleucinas
L ₂	Larva L ₂ Infectante
LMO	Larva Migrans Ocular
LMV	Larva Migrans Visceral
MAb	Anticuerpos monoclonales
p.i.	Poisinfección
PAF	Factor activador de plaquetas
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PP	Placas de Peyer
SIgA	Inmunoglobulina A secretora
Tgo	Grupo Testigo

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Macho y hembra adultos de <i>Toxocara canis</i> .	2
FIGURA 2	Microscopia electrónica de <i>Toxocara canis</i>	2
FIGURA 3	Huevos de <i>Toxocara canis</i>	3
FIGURA 4	Ciclo biológico de <i>Toxocara canis</i>	5
FIGURA 5	Características histológicas del BALT.	14
FIGURA 6	Número de células CD3 ⁺ en pulmones de ratones inoculados con 1500 hltc y sacrificados a diferentes periodos de tiempo (5, 30, 60 días p.i.)	39
FIGURA 7	Promedio de linfocitos T CD4 ⁺ en pulmones de ratones inoculados con 1500 hltc y sacrificados a diferentes periodos de tiempo (5, 30, 60 días p.i.)	43
FIGURA 8	Promedio de linfocitos T CD8 ⁺ en pulmones de ratones inoculados con 1500 hltc y sacrificados a diferentes periodos de tiempo (5, 30, 60 días p.i.)	47
FIGURA 9	Promedio de células IgA ⁺ en pulmones de ratones inoculados con 1500 hltc y sacrificados a diferentes periodos de tiempo (5, 30, 60 días p.i.)	51
FIGURA 10	Promedio de células cebadas en pulmones de ratones inoculados con 1500 hltc y sacrificados a diferentes periodos de tiempo (5, 30, 60 días p.i.)	55
FIGURA 11	Promedio de eosinófilos en pulmón de ratones inoculados con 1500 hltc y sacrificados a diferentes periodos de tiempo (5, 30, 60 días p.i.)	60
FIGURA 12	Tinción inmunohistoquímica (Avidina-Biotina) con el AbM anti CD3 en cortes congelados de pulmón de ratones sacrificados a los 5 días p.i.	40
FIGURA 13	Tinción inmunohistoquímica (Avidina-Biotina) con el AbM anti CD4 en cortes congelados de pulmón de ratones inoculados con 1500 hltc	44
FIGURA 14	Tinción inmunohistoquímica (Avidina-Biotina) con el AbM anti CD8 en cortes congelados de pulmón de ratones inoculados con 1500 hltc.	48
FIGURA 15	Tinción inmunohistoquímica (Avidina-Biotina) con el AbM anti IgA en cortes congelados de pulmón de ratones inoculados con 1500 hltc.	52
FIGURA 16	Cortes histológicos teñidos con Azul de Toluidina de pulmón de ratones inoculados con 1500 hltc.	57
FIGURA 17	Cortes histológicos teñidos con Cromotropo 2R de pulmón de ratones inoculados con 1500 hltc.	62
FIGURA 18	Cortes histológicos de pulmón teñidos con H-E de un ratón inoculado con 1500 hltc. y sacrificado a los 30 días p.i. Lesión granulomatosa, con larva enquistada	67
FIGURA 19	Cortes histológicos teñidos con Azul de Toluidina de pulmón de ratón inoculado con 1500 hltc. Célula cebada desgranulada	70

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1	Anticuerpos monoclonales para linfocitos T y sus características	32
CUADRO 2	Número de linfocitos T CD3 ⁺ /mm ² en pulmones de ratones inoculados con 1500 hltc y sacrificados a diferentes periodos	38
CUADRO 3	Número de linfocitos T CD4 ⁺ /mm ² en pulmones de ratones inoculados con 1500 hltc y sacrificados a diferentes periodos	42
CUADRO 4	Número de linfocitos T CD8 ⁺ /mm ² en pulmones de ratones inoculados con 1500 hltc y sacrificados a diferentes periodos	46
CUADRO 5	Número Células IgA ⁺ /mm ² en pulmones de ratones inoculados con 1500 hltc y sacrificados a diferentes periodos	50
CUADRO 6	Número Células Cebadas/mm ² en pulmones de ratones inoculados con 1500 hltc y sacrificados a diferentes periodos.	54
CUADRO 7	Número Eosinófilos/mm ² en pulmones de ratones inoculados con 1500 hltc y sacrificados a diferentes periodos.	61

RESUMEN

Las larvas de *Toxocara canis* en su migración por diferentes órganos en los hospedadores paraténicos, afectan al pulmón. En estudios histopatológicos en pulmón se han observado granulomas e infiltrados celulares. Debido a esto se han realizado trabajos en los cuales se han analizado las poblaciones celulares presentes en lavados bronquiales así como de sangre periférica de individuos infectados con *Toxocara*, pero no existen trabajos morfométricos de los tipos celulares *in situ*. Así el objetivo de este trabajo fue analizar *in situ* las poblaciones celulares en el pulmón de ratones infectados experimentalmente con *T. canis*, determinar cuales son las poblaciones predominantes y establecer la distribución histológicas de los diferentes tipos celulares.

Se utilizaron 60 ratones divididos en 6 grupos de 10 ratones cada uno, tres grupos fueron designados como experimentales y los grupos restantes como testigo. Los animales experimentales fueron inoculados intragástricamente con 1500 huevos larvados de *T. canis* (hltc) en 0.2 ml. de SSF. Los animales testigo recibieron únicamente 0.2 ml. de SSF. Animales de un grupo testigo y un experimental fueron sacrificados a los días 5, 30 y 60 pos-inoculación (p.i.) para obtener sus pulmones. Los pulmones izquierdos se fijaron en formol al 10% en PBS y se utilizaron para cortes histológicos con diferentes tinciones (Hematoxilina-Eosina, Azul de toluidina y Cromotropo 2R) para identificar eosinófilos y células cebadas. Los pulmones derechos se infiltraron e incluyeron con medio de criopreservación y se congelaron. Estos pulmones se utilizaron para realizar cortes con el criótomo, y con estos hacer tinciones inmunohistoquímicas, para determinar las subpoblaciones de linfocitos IgA⁺, CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺. Las células se contaron utilizando un sistema de análisis de imágenes por computadora semi-automático. Se contaron las células positivas y se midió con exactitud el área de tejido en donde aparecieron, expresando los resultados como número de células por mm² de área de tejido. Para la cuantificación se establecieron tres áreas pulmonares diferentes: células tisulares, células asociadas a vasos sanguíneos y células asociadas a bronquios.

En general, el número de células de la respuesta inmune fue mayor en los animales inoculados que en los testigos. En las células CD3⁺ se observaron diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre los animales inoculados y los testigo, en los tres compartimientos a los 30 días p.i. y a los 5 días únicamente en el espacio intersticial. También el número de células CD4⁺ del grupo experimental en general fue estadísticamente mayor que el grupo testigo ($p < 0.05$), en los tres compartimientos únicamente a los 60 días p.i.. El número de células CD8⁺ de los animales del grupo experimental en general fue mayor que en los del grupo testigo, esta diferencia fue significativa ($p < 0.05$) en los tres compartimientos a los 5 días p.i. y a los 30 días p.i. únicamente en el espacio peribronquial.

El número de células IgA⁺ presentes en el pulmón de animales experimentales en general fue mayor que en los del grupo testigo, esta diferencia fue significativa ($p < 0.05$) en el compartimiento perivascular a los 5 días p.i.. También hubo diferencias a los 30 y 60 días p.i. en el espacio peribronquial.

El número de células cebadas de los animales del grupo experimental en general fue mayor que en los del grupo testigo, esta diferencia fue significativa ($p < 0.05$) en el espacio intersticial a los 60 días p.i. y a los 5 días únicamente en el espacio peribronquial. Finalmente, el número de eosinófilos presentes en el pulmón de los animales experimentales en general fue mayor que en los del grupo testigo, esta diferencia fue significativa ($p < 0.05$) en el espacio intersticial a los 5, 30 y 60 días p.i. En los espacios perivascular y peribronquial esta diferencia solo fue estadísticamente representativa ($p < 0.05$) a los 60 días p.i.

La infección experimental por larvas de *T. canis* ocasiona que las células que intervienen en la respuesta inmune se establezcan en diferentes compartimientos: perivascular, peribronquial e intersticial. Los compartimientos pulmonares que mostraron tener mayor número de células asociadas, fueron el compartimiento perivascular y peribronquial en relación al compartimiento intersticial, mostrando ser diferentes estadísticamente.

Las células $CD3^+$ aumentaron su número en la fase aguda del padecimiento y disminuyen paulatinamente hacia la fase crónica y de reparación. Las células $CD8^+$, aumentan en la fase inicial de la enfermedad y posteriormente disminuyen conforme evoluciona el padecimiento hacia la fase crónica y posteriormente de reparación. Las células $CD4^+$, se encontraron disminuidas en la etapa aguda y crónica aumentando en la fase final. Los eosinófilos se mantuvieron aumentados durante todo el experimento, sin embargo, únicamente en la etapa de reparación mostraron tener diferencias significativas, lo que correlacionó con las diferencias observadas con las células $CD4^+$. Las células cebadas presentaron diferencias irregulares durante las diferentes etapas del padecimiento. Las células IgA^+ aumentaron en los dos últimos periodos de sacrificio (etapa de conicidad y reparación) solamente a nivel bronquial, muy probablemente para poder realizar la secreción de IgA en la luz bronquial.

Los resultados en este trabajo demostraron que los tipos celulares varían en relación al tiempo después de la infección con larvas de *T. canis*. Correlacionando los cambios con el número de larvas presentes en las diferentes etapas del padecimiento. El trabajo sugiere, que la respuesta inmune que se monta en ratones, en contra de las larvas de *T. canis* es una respuesta que no tiene naturaleza protectora, debido a que no se encuentran indicios de larvas destruidas o dañadas. Se puede concluir que el ratón es un buen modelo de estudio para la migración de *T. canis* en hospederos paraténico, pues en el presente trabajo se encontraron fragmentos larvarios a diferentes periodos p.i.

5.0 INTRODUCCIÓN

La toxocariosis es una enfermedad causada por la presencia y acción de varias especies de nemátodos de los géneros *Toxocara* y *Toxascaris*, siendo *Toxocara canis* el más importante debido a que es el nemátodo intestinal más común en perros. Además de las repercusiones que implica la enfermedad en su hospedero definitivo (perros menores de 3 meses de edad) es un problema de salud pública (Beaver, 1969; Georgi y Georgi, 1990).

5.1 MORFOLOGÍA DE *Toxocara canis*

Toxocara canis es un nemátodo de color blanco lechoso, los machos miden, de 4 a 8 cm de largo por 2 a 2.5 mm de diámetro y las hembras hasta 18 cm de largo por 2.5 a 3 mm de diámetro (figura 1). En la parte anterior se observan tres labios bien desarrollados. Las especies del género *Toxocara*, presentan cerca de los labios a la altura del esófago un par de aletas cervicales, lo que le da la apariencia de punta de flecha (figura 2). En el extremo posterior el macho termina curvado hacia su parte ventral, en donde se encuentran dos pequeñas espículas iguales y un estrechamiento terminal en forma de apéndice, mientras que las hembras terminan en forma recta; su vulva se abre en la región media del cuerpo; estas son ovíparas y producen una gran cantidad de huevos (Faust y col., 1981; Quiroz, 1984; Soulsby, 1988).

5.0 INTRODUCCIÓN

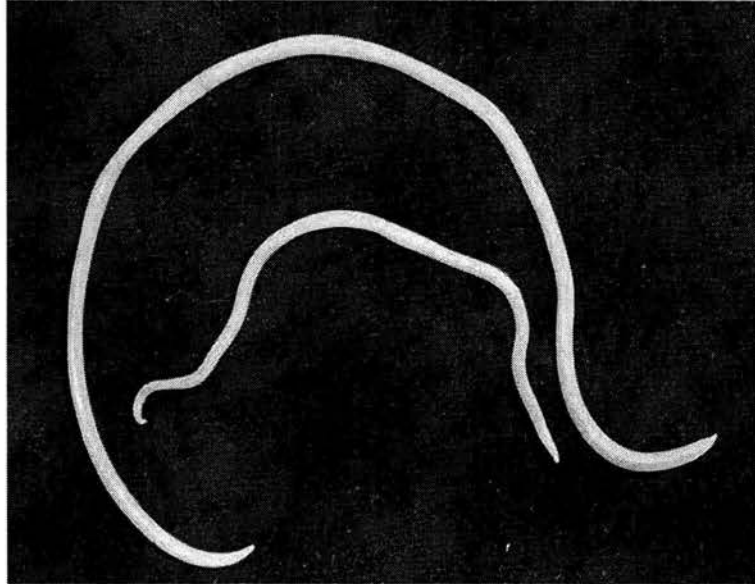


Figura 1.- Macho y hembra adultos de *Toxocara canis*.

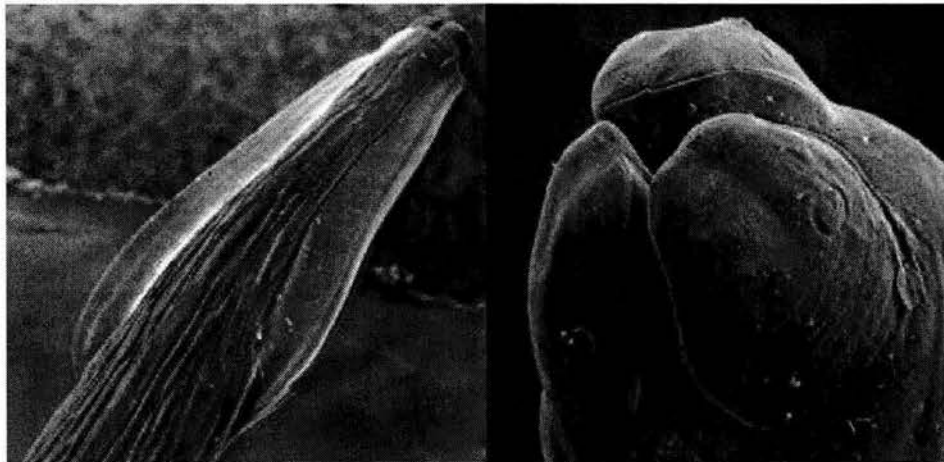
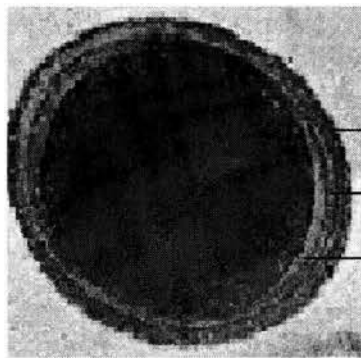
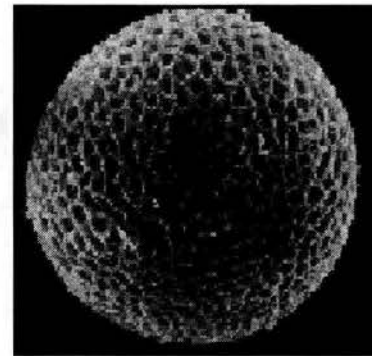


Figura 2.- Microscopia electrónica de *Toxocara canis*, vista dorsal de la anterior mostrando sus tres labios, los cuales algunas veces presentan protuberancias dentígeras, no hay interlabios y se observan las aletas cervicales (Faust y col.,1981; Quiroz, 1984; Soulsby, 1988).

Los huevos son subesféricos, la estructura de su cubierta consta de 3 capas (figura 3A), la interna llamada capa lipoide está constituida por lípidos, la media llamada capa quitinosa triple y la más externa llamada capa albuminosa la cual presenta depresiones sobre la superficie llamadas fosetas (figura 3B); los huevos miden 75 por 90 micrometros, son de color café oscuro o grisáceo y no están embrionados cuando se depositan (Faust y col.,1981; Quiroz, 1984; Soulsby, 1988).



A



B

Figura 3.- Huevos de *Toxocara canis*. A, se observa un huevo no embrionado en el cual se pueden apreciar las tres capas de que esta compuesta su cubierta: 1, capa albuminosa; 2, capa quitinosa triple; 3, capa lipoide. B, microscopía electrónica de un huevo de *T. canis* en donde se observa con detalle las fosetas características de la membrana externa de la cáscara (Faust y col.,1981; Quiroz, 1984).

5.2 CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico inicia con la eliminación de los huevos en la materia fecal de los perros parasitados, principalmente cachorros. Los huevos pueden sobrevivir varios meses en el ambiente, pudiendo afectar a un amplio rango de hospederos paraténicos, incluyendo a los humanos. En el ambiente se desarrolla en ellos la larva 2 pasiva (L₂) que es el estadio infectante para todos los hospederos. Se ha determinado que *T. canis* presenta un ciclo de vida complejo, el cual varía dependiendo del tipo de hospedero, de su estado fisiológico y de la edad en la que se adquiriera la infección, presentándose cuatro variedades (figura 4):

- a) En la que los huevos larvados en el suelo, son ingeridos directamente por el hospedero final, las larvas eclosionan en el intestino delgado y atraviesan la pared intestinal. Las larvas realizan entonces una migración desde el intestino hacia el hígado, de aquí hacia pulmón y tráquea donde finalmente son redeglutidos y pasan al intestino donde alcanzan la madurez. Esto solo ocurre en cachorros menores de tres meses de edad.
- b) Los huevos embrionados son ingeridos por perras adultas, en las que las larvas se enquistan en diferentes tejidos y cuando las perras quedan gestantes, hacia los días 40-42 de la gestación las larvas se reactivan, y pasan al feto directamente a través del útero para producir una infección prenatal, y por último.
- c) En la que los huevos larvados son ingeridos por hospederos paraténicos

5.3 PROBLEMAS DE SALUD PÚBLICA

Desde que se hizo la primera descripción de la enfermedad por Beaver en 1952, se han identificado dos síndromes en humanos: El síndrome de *Larva Migrans Visceral* (LMV) y el síndrome de *Larva Migrans Ocular* (LMO).

5.3.1 Síndrome de *Larva Migrans Visceral* .

El síndrome de LMV se presenta con mayor frecuencia en niños menores de 6 años de edad que juegan en áreas contaminadas como jardines y parques públicos, por el riesgo que representa la ingestión accidental de huevos de *T. canis*. La infección de los niños con grandes cantidades de huevos, generalmente es el resultado del hábito de ingerir tierra. La costumbre de proporcionar a los niños cachorros como mascotas, aumenta este riesgo, ya que son los cachorros quienes están preferentemente parasitados (Faust, 1981; Glickman y Shofer, 1987; Schantz y Sther-Green, 1988; Magnaval y col., 1992, Sane y Barber 1997).

El cuadro clínico en humanos varía desde el estado asintomático, con excepción de una eosinofilia persistente, hasta el que se presenta con algunos signos de inflamación pulmonar crónica, bronquiolitis, asma, y fiebre. La reacción pulmonar puede ser tan grave como para llegar a producir considerables dificultades respiratorias. También se llega a presentar hepatomegalia, nefrosis, disfunción cardíaca e incluso casos fatales de toxocariosis han sido el resultado de lesión extensa del miocardio. Las características clínicas incluyen una eosinofilia

constante y sostenida (Glickman y Shofer, 1987; Schantz y Sther-Green, 1988, Sane y Barber 1997).

5.3.2 Síndrome de *Larva Migrans Ocular*.

El síndrome de LMO, afecta principalmente a niños mayores de 6 años o jóvenes menores de 13 años, generalmente es un cuadro ocular unilateral, resultado de la invasión hematógica del ojo por una o varias larvas. Sin embargo, ocasionalmente llega a ocurrir bilateralmente e incluso llega a presentarse en adultos. En muchos pacientes con LMO, no se presenta una historia de LMV y los hallazgos de laboratorio se encuentran dentro de los límites normales. Los niños que presentan LMO tienen una historia semejante a la de aquellos con LMV en relación al contacto de cachorros de perro en la casa (Glickman y Shofer, 1987; Magnaval, 1992).

El involucramiento ocular puede asumir alguno de varios patrones clínicos, ninguno de los cuales son patognomónicos. Los signos clínicos más frecuentes de este síndrome son: disminución progresiva de la visión, estrabismo, leucocoria, fijación pupilar, u ojo rojo. Siendo algunos de ellos notados durante un examen rutinario de ojo (Alba y col., 2000).

La LMO en ocasiones puede representar una forma más severa de respuesta inflamatoria, es usual que en el *humor vítreo* ocurra una acumulación densa de células inflamatorias, que pueden dificultar la observación del fondo. A través de esta lesión puede verse una masa tisular en crecimiento, que se

asemeja fuertemente a un retinoblastoma, el cual puede requerir una terapia de radiación o la enucleación del ojo, por lo que la diferenciación de este tumor con la LMO es crítica (Glickman y Shofer, 1987; Alba y col., 2000).

Resultados de estudios recientes, sugieren que la LMV frecuentemente asume las características de un síndrome que comprende debilidad crónica, dolor abdominal, varios signos de alergia y una ligera eosinofilia. Además la toxocariosis ha sido propuesta como posible etiología en varios síndromes neurológicos (Soulsby 1987; Magnaval, 1992).

5.4 RESPUESTA INMUNE FRENTE A INFESTACIONES CON *T. canis*

El hombre y otros animales tales como: ratones (Abo-Shehada y Herbert, 1984; Oshima, 1961), ratas (Olson y Rose, 1966), monos (Tomimura y col., 1976), conejos (Glickman y Shofer, 1987), pollos (Agnihotri y col., 1987), codornices (Nakamura y col., 1991), hámster (Agnihotri y col., 1987), cobayos (Buijs y col., 1995), cerdos (Stevenson y Jacobs, 1977) y jerbos (Alatorre Hernández 1993, Alba Hurtado, 2000), actúan como hospederos paraténicos para la larva de *T. canis*. La respuesta a la infección en los animales susceptibles es una leucocitosis con una elevada y persistente eosinofilia que oscila entre el 30 y el 50% de los leucocitos circulantes, alcanzando incluso hasta el 80% (Alba, 1999).

Se observa una hiperglobulinemia, encontrando valores de entre 4 y 7 mg/dl en pacientes con LMV, lo que causa una caída de la relación albúmina-globulina. Un incremento similar en los niveles de globulina con 3.9 a 4 mg/dl se observó en

monos infectados experimentalmente (Tomimura y col., 1976), de las cuales la mayoría fueron γ -globulina IgM e IgG, las cuales se manutuvieron hasta por 4 semanas después de la infección. También, la concentración de IgE puede estar aumentada de 10 a 15 veces el valor normal en pacientes con LMV. Un incremento en los niveles de isohemaglutininas principalmente anti-A y anti-B frecuentemente se observan en pacientes con LMV, presentando títulos de >1:1400 para aglutininas anti-A y >:1200 para aglutininas anti-B ya que se ha visto que los antígenos (Ags) de secreción y excreción de *T. canis*, tienen algunas similitudes con los Ags de los grupos sanguíneos A y B. Los niveles elevados de isohemaglutininas presentes en humanos infectados con *T. canis* pueden causar lisis mediada por el complemento, para el caso de que las isohemaglutininas sean del isótipo IgM y en el caso de que el isótipo sea IgG inducirán una destrucción celular a través de la opsonización seguida por la fagocitosis facilitada, debido a los receptores para la porción Fc y para el complemento que presentan (Soulsby, 1987; Meeusen,1999).

De manera general la respuesta inmune montada contra helmintos se realiza en dos fases: La primera de ellas caracterizada por realizarse de manera rápida e iniciada en su fase temprana por las células cebadas, las cuales liberan mediadores preformados almacenados en los gránulos citoplasmáticos, los cuales incluyen histamina, heparina, proteasas y factores quimiotácticos para neutrófilos y eosinófilos. Posteriormente hay una síntesis *de novo* y secreción de mediadores secundarios más potentes, los cuales incluyen el factor activador de plaquetas,

prostaglandinas y leucotrienos. Los efectos más dramáticos de estos mediadores son la contracción del músculo liso de intestino y bronquios, incremento en la permeabilidad vascular e incremento en la secreción de moco. El estímulo para la desgranulación de las células cebadas es ocasionado por la unión del antígeno en forma cruzada con la IgE antígeno-específica unida al receptor de alta afinidad (Fc ϵ RI) expresado en las células cebadas; lo que significa, que los helmintos son inductores de una respuesta de células tipo T_H2, es decir; estos parásitos inducirán una eosinofilia elevada en tejidos, una mastocitosis mucosal y sobre todo una producción de IgE (Pritchard y col., 1997; Meeusen, 1999).

La segunda fase es conocida como “fase tardía” la cual es caracterizada por el reclutamiento de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, linfocitos y basófilos en el sitio de la desgranulación de las células cebadas. La unión del complejo antígeno-anticuerpo a los receptores Fc y/o receptores del complemento en neutrófilos y eosinófilos resulta en la degranulación y liberación de mediadores químicos que agravan más la situación (Meeusen, 1999).

Existen algunas excepciones al papel que juegan las células T_H2 en el curso de infestaciones causadas por helmintos. Por ejemplo, los estadios iniciales infectantes de esquistosomas (cercarias) estimulan una respuesta celular tipo T_H1 en un modelo murino. Solo cuando la infección progresa y hay eliminación de huevos por los parásitos adultos en los vasos sanguíneos, la respuesta cambia a células tipo T_H2 (Eise y col., 1994).

5.5 SISTEMA INMUNE PULMONAR

El pulmón se encuentra continuamente expuesto al ambiente externo y a mezclas complejas de Ags a través del aire que se respira. Las barreras anatómicas, tales como la arquitectura de las vías respiratorias, el aparato de eliminación mucociliar y el reflejo tusígeno, además de los mecanismos de defensa tanto humorales como celulares juegan un papel importante en el mantenimiento de la viabilidad de un individuo.

La primera línea de defensa en el pulmón es inespecífica y esta formada por el aparato mucociliar y la actividad fagocítica de los macrófagos alveolares. La segunda línea de defensa es específica, cuando un antígeno rebasa la primera línea encuentra células presentadoras de antígeno y linfocitos T efectores; lo que conduce a una secuencia compleja de eventos que resultan en la migración y activación celular en el sitio de inflamación (Harberck, 1998).

El sistema inmune en las mucosas se puede encontrar en la forma de tejido linfoide organizado o en una colección difusa de elementos celulares. Cualquiera de las anteriores se puede encontrar en el epitelio encima de la membrana basal, en la lamina propia o en el intersticio. Donde el tejido linfoide es organizado, este se presenta como folículos de tejido linfoide aislado o en forma de agregados foliculares conformando grandes unidades (Acosta, 1992; Harbeck, 1998; Ogra, 1999; Crapo, 2000). De acuerdo a su estructura, los compartimientos donde se encuentran las células de la respuesta inmune en pulmón, son los siguientes:

5.5.1 Células del espacio alveolar

Los macrófagos presentes en el espacio alveolar son las primeras células de defensa inespecífica contra partículas inertes y agentes infecciosos inhalados, estratégicamente se encuentran localizados en la interfase aire-tejido del alvéolo y por lo tanto son los primeros fagocitos mononucleares que interactúan con los Ags inhalados que llegan hasta la región alveolar. El macrófago realiza sus funciones en íntima proximidad con un complejo macromolecular lipoproteico denominado “surfactante” que facilita la digestión del material antigénico (Acosta, 1992; Crapo, 2000).

Después de los macrófagos, los linfocitos son las células que con mayor frecuencia se encuentran en las vías aéreas distales representando el 5-20%. De estas células, el 60-80% son linfocitos T y el 5-10% linfocitos B. También se ha reportado una proporción de células que oscila entre el 5-20% que no muestran los marcadores de las células T o B y que parecen representar a las células NK por su morfología de células granulares gigantes y por expresar el antígeno de superficie HNK-1 (Acosta, 1992; Harberck 1998; Crapo, 2000).

5.5.2 Tejido linfoide asociado a bronquios y bronquiolos (BALT).

La existencia del BALT fue descrita como análoga a folículos linfoides encontrados en cualquier otra mucosa como tonsilas e intestino. En 1973 Livestock notó una similitud entre el BALT y las Placas de Peyer (PP). Subsecuentemente el BALT fue descrito en varias especies incluyendo ratas,

conejos, ratones, ovinos, aves y cobayos (Uyama y col., 1997; Ogra, 1999; Márquez, 2000).

El tejido linfoide bronquial esta unido a las barreras primarias de defensa en la mucosa contra microorganismos inhalados y por lo tanto es uno de los muchos mecanismos integrados que ayudan a mantener la esterilidad del intercambio de gases en el aparato respiratorio, además evita la sensibilización a Ags inhalados (Wu, 1997; Harberck, 1998, Sue-chu, 1998).

El BALT se define como un agregado linfoide, estructuralmente separado de la mucosa bronquial por un linfoepitelio especializado. El linfoepitelio es escamoso e irregular y forma una sola capa que carece de cilios, sus células son delgadas, de superficie corrugada y con gran cantidad de vesículas. La disponibilidad de esta estructura relativamente organizada ha permitido analizar su estructura y función; enfocándose en particular en el desarrollo de una respuesta inmune local a Ags inhalados (Acosta, 1992; Uyama y col., 1997; Sue-chu, 1998; Ogra, 1999).

El BALT es estructuralmente similar a las PP, pero la división en estructuras y áreas funcionales distintas es menos aparente. Los agregados del BALT en la capa de epitelio son menos especializados y presentan infiltrados por linfocitos, pero contienen una capa de epitelio especializado para el transporte macromolecular, las células M son similares a las descritas en PP y en Bolsa de Fabricio, ya que tienen un origen endodérmico común y llevan a cabo el transporte selectivo de moléculas antigénicas en forma soluble o particulada hasta el BALT.

Los grupos de células del BALT se encuentran dentro de una estructura de reticulina en una especie de domo por debajo del epitelio. En mamíferos, los centros germinales del BALT son encontrados solo después de una estimulación antigénica. Estudios histológicos e inmunohistoquímicos han permitido dividir el BALT en cuatro regiones anatómicas con las siguientes características:

- ⌚ Área folicular. Región central, compuesta principalmente por linfocitos B así como por células dendríticas o macrófagos.
- ⌚ Área parafolicular. Región periférica que rodea el área parafolicular y que contiene linfocitos T cooperadores (CD4), citotóxicos (CD8) y células NK.
- ⌚ Área de domo. Región dorsal del agregado linfoide, cercana a la región subepitelial.
- ⌚ Linfoepitelio. Región subepitelial asociada a la presencia de macrófagos y dendríticas.

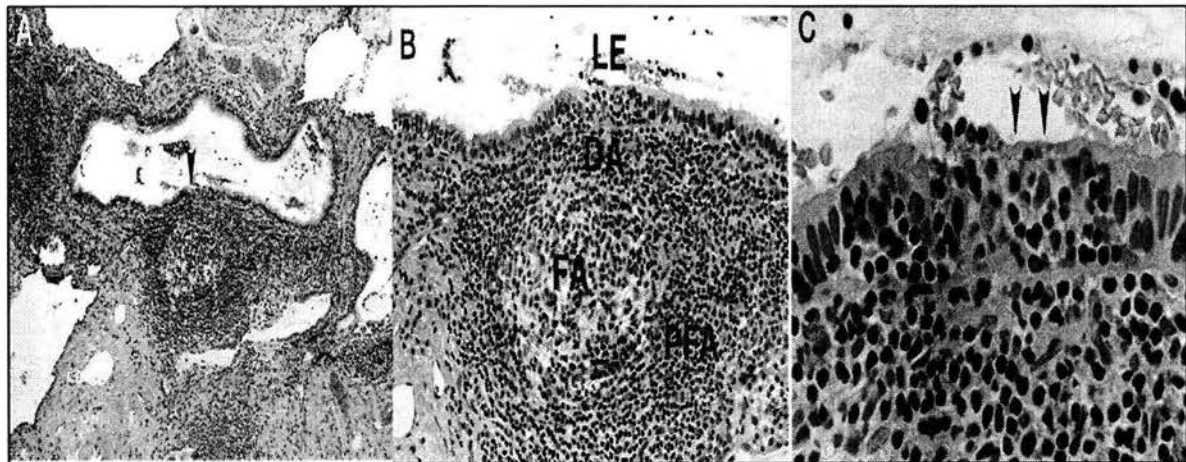


Figura 5.- Características histológicas del BALT. A, BALT localizado en una pared bronquial (punta de flecha). B, regiones anatómicas del BALT: linfoepitelio (LE), área de domo (DA), área folicular (FA), y área parafolicular (PFA). C, aumento de la microfotografía del linfoepitelio constituido por células cuboidales no ciliadas y linfocitos intraepiteliales (Takafumi, 1999).

En 1955 Macklin, observó en las vías aéreas más distales (bronquiolos respiratorios) de ratas, agregados linfoides cubiertos por células epiteliales a las que denominó "colectores pulmonares". Actualmente se considera que estos agregados linfáticos forman parte del BALT pero son menos organizados, ya que no contienen verdaderos centros germinales; aunque parecen comunicarse con los agregados linfoides de las vías aéreas más proximales, como el BALT y/o las células plasmáticas localizadas por debajo de la lámina propia. Las células linfoepiteliales que cubren estos agregados, también son capaces de transportar Ags (Acosta, 1992; Takafumi, 1999).

5.5.3 Células inmunitarias asociadas al espacio intersticial.

El número de células intersticiales es limitado e incluye pericitos, linfocitos, macrófagos intersticiales, células plasmáticas, citotóxicas, células cebadas y fibroblastos. Actualmente empieza a ser valorada la contribución de este espacio en la respuesta inmunitaria del pulmón, ya que se han reportado diferencias entre la población celular del tracto respiratorio inferior recuperada por lavado bronquial de individuos enfermos y la que se obtiene en biopsias pulmonares del mismo paciente.

Los primeros reportes acerca de los macrófagos intersticiales, sugieren que estos presentan un estado intermedio de desarrollo entre el monocito y el macrófago alveolar, por lo que se considera que el intersticio pulmonar proporciona un medio adecuado para el precondicionamiento y maduración final

de los monocitos (Acosta, 1992; Harberck 1998; Crapo, 2000).

Por lo que respecta a los linfocitos, Holt y col. en 1986 han considerado que su número en el espacio intersticial varía de $15-48 \times 10^6$ células/gr de pulmón y de $4-10 \times 10^{10}$ células en el parénquima total. También estudios realizados en animales y humanos muestran que las células inmunitarias del parénquima están constituidas por: 40% de linfocitos T, 10% de linfocitos B, 30% de macrófagos, 20% de células NK, además de algunos PMN y células cebadas.

La presencia de mecanismos adicionales para el manejo de Ags dentro de la mucosa bronquial involucra a células dendríticas, células epiteliales y la presencia de células B y T efectoras y linfocitos reguladores dentro de la mucosa bronquial, sin embargo, se requiere una disección de varios componentes de la inmunidad mucosal para determinar el grado en el que el BALT acompaña a todas estas funciones en una unidad eficiente. El BALT es un mecanismo efectivo para la generación tanto de linfocitos B como T para la inmunidad en respuesta a Ags luminales tanto localmente como en distintos sitios de la de la mucosa. El papel de los linfonodos mesentéricos es importante para la expansión de la inmunidad asociada a mucosas. La cantidad de linfocitos intersticiales varía en función de los linfocitos circulantes en sangre y es tan grande como la de los linfocitos circulantes. La mezcla de células broncoalveolares contiene de 5-10% de linfocitos, quienes funcionan probablemente en actividades de inmunorregulación (Acosta, 1992; Fojtasek, 1993).

5.6 EFECTO DE INFECCIONES EN EL SISTEMA INMUNE PULMONAR

Las infecciones virales de las vías respiratorias bajas pueden incrementar la reactividad del sistema inmune pulmonar en individuos normales y pueden exacerbar la respuesta inmune en pacientes asmáticos (Busse, 1994). Varios tipos de virus, incluyendo reovirus, coronavirus, adenovirus, influenza B, virus respiratorio sincitial y parainfluenza, pueden evocar síntomas asmáticos (Gem y Buse, 1995), o inducir una hiperreactividad en las vías respiratorias. El rinovirus puede promover también el que se presente una reacción alérgica tardía a un antígeno. El tejido linfoide bronquial está unido primariamente a la defensa mucosal contra microorganismos inhalados y por lo tanto es uno de los muchos mecanismos integrados que ayudan a mantener la esterilidad del intercambio de gases en el aparato respiratorio mientras que se evita la sensibilización a Ags inhalados (Wu, 1997; Harberck, 1998, Sue-Chu, 1998).

Los mecanismos efectores de las células B y T producidos a partir del tejido linfoide bronquial y liberados en la luz bronquial juegan un papel muy importante en la respuesta inmune. un ejemplo es la inmunoglobulina A secretora (SIgA) antígeno-específica importante en el control de la colonización microbiana (Wu, 1997). La susceptibilidad de la respuesta de la SIgA en una zona de elevada tolerancia, la pobre memoria inmunológica asociada con este isotipo y el buen estado de salud de la mayoría de los individuos con deficiencia de IgA, sugieren que otros mecanismos son importantes en la defensa de mucosas (Wu, 1997;

Ogra, 1999; Crapo, 2000); por ejemplo, se ha reportado que la capa de moco que recubre al tracto respiratorio contiene principalmente células broncoalveolares de las cuales el 90% son macrófagos derivados de médula ósea y el resto son linfocitos (Harbeck, 1998).

Otro ejemplo es la comunicación entre el tejido linfoide bronquial y una mucosa lejana a través de una vía intermucosal llamada *Sistema Inmune Mucosal Común*, que involucra predominantemente un flujo de células de PP del intestino a los bronquios. Dependiendo de la dosis del antígeno y de una experiencia inmunológica previa, células T y células B de las PP pueden poblar la mucosa bronquial para modular la inmunidad (Ogra, 1999). Este es un principio que se ha empleado en forma satisfactoria para desarrollar vacunas orales contra bronquitis aguda (Crapo, 2000). La fuerte respuesta de células T frente a Ags inhalados y la capacidad de las células CD4⁺ para transferir inmunidad entre animales apoyan el control de infecciones, o en circunstancias donde la dosis del antígeno inhalado es muy alta. Estudios hechos con modelos animales indican que las células T activadas contribuyen a la defensa mucosal indicando que el reclutamiento de neutrófilos dependiente de células T es importante. Otro mecanismo adicional es la secreción de lisozima por macrófagos activados por células T (Ogra, 1999; Crapo, 2000).

Los compartimientos linfocíticos bronquiales tienen, por lo tanto, una compleja relación con varios tipos de linfocitos que son importantes en la activación y regulación de inmunidad bronquial, incluyendo linfocitos antígeno-

reactivos, efectores y reguladores (Ogra, 1999). Los virus que causan daño en el epitelio de las vías respiratorias (reovirus, coronavirus, adenovirus, influenza B, virus respiratorio sincitial, parainfluenza, etc.), y que evocan la liberación de citocinas y mediadores que pueden estimular a las células cebadas, incrementar la permeabilidad vascular, atraer células inflamatorias e iniciar una respuesta inmune que puede traer consecuencias duraderas. La liberación de mediadores y los cambios celulares pueden conducir a una hiperreactividad de vías respiratorias, edema, respuestas alérgicas y obstrucción de las vías respiratorias (Buse, 1994; Gem y Buse, 1995; Ogra, 1999).

Algunas bacterias como *Mycoplasma pulmonis* pueden producir una respuesta inflamatoria pulmonar aguda en la cual existe un predominio de neutrófilos, en los casos de evolución a una etapa de cronicidad la respuesta inflamatoria es caracterizada por la acumulación de tejido linfoide mucosal, folículos linfoides peribronquiales y un aumento de tamaño de los nódulos linfoides mediastínicos y cervicales. (Umemoto y col., 1997). El tejido linfoide, el cual es raro en la mucosa traqueal de ratas y ratones libres de patógenos, puede ocupar el 75% de la mucosa después de la infección con *M. pulmonis*. Otros cambios patológicos incluyen hiperplasia de células epiteliales ciliadas y células caliciformes, hiperplasia de glándulas productoras de moco, angiogénesis y fibrosis (Iwata y Sato, 1991; Ogra y col., 1999).

5.7 ANTECEDENTES

Los desórdenes de las vías respiratorias, característicos de la invasión parasitaria de tejidos son la eosinofilia y niveles elevados de IgE. Estas alteraciones son similares a los observados en enfermedades alérgicas mediadas por IgE (Takamoto y col., 1993, Sane y col., 1997).

Los síntomas pulmonares son comunes en la toxocariosis y las exposiciones repetidas a infecciones con *Toxocara canis* pueden activar manifestaciones alérgicas, incluyendo broncoespasmos, en respuesta a la migración de las larvas o a sus productos de secreción y excreción (Takamoto y col., 1993, Sane y col., 1997).

Woodruff en 1970 encontró anticuerpos (Abs) contra *T. canis* entre pacientes atendidos de asma clínica más que en controles no asmáticos. Desowitz en 1984 encontró que 29% de un grupo de niños asmáticos en Hawai tenían anticuerpos IgE contra *T. canis* en comparación con 6.4% de niños no asmáticos indicando que existe una relación entre niños expuestos a una infección con *T. canis* y asma bronquial. La proporción de niños asmáticos que tienen niveles significantes de Abs anti-*toxocara* en Malasia (57.8%), es mucho más alta que la de los niños de Hawai (10%) reportados por Desowitz en 1981 y que los niños holandeses (19.8%) reportados por Buijs en 1994 (Lokman y col., 1997).

En ratones, la inflamación a nivel pulmonar inducida por *T. canis* dura varias semanas. Los mediadores liberados por las células inflamatorias como los

eosinófilos pueden interferir con la permeabilidad de la microvasculatura pulmonar lo cual se expresa por un edema intersticial y un exudado constituido por eosinófilos, basófilos y macrófagos en la luz de las vías aéreas pulmonares (Fujimoto y col., 1990). Se ha demostrado que *T. canis* induce una respuesta inflamatoria a nivel pulmonar, similar a la respuesta que se produce en pacientes asmáticos, en donde se afecta la permeabilidad de los vasos capilares; fenómenos que también son observados en asma por alergia en el humano. Fujimoto y col. en 1990 establecieron que la permeabilidad del endotelio vascular en pulmones de rata, se incrementa *in vitro* mediante incubaciones con eosinófilos pulmonares activados provenientes de ratas infectadas con *T. canis*; estos pueden liberar mediadores que modifican la permeabilidad vascular. Uno de ellos es el factor activador de plaquetas (PAF), un fosfolípido derivado de la membrana obtenido por mecanismos dependientes de IgE (Snijder, 1985 y Page, 1988) el cual ha mostrado que puede inducir la formación de edema. Los eosinófilos además del PAF liberan leucotrieno C-4 el cual también interfiere con la permeabilidad microvascular (Evans y col., 1987). Así, es factible asumir que los mediadores de los eosinófilos juegan un papel muy importante en la presentación del edema intersticial y la salida del plasma en las vías aéreas de ratones infectados con *Toxocara canis*. El incremento de la salida de albúmina al intersticio puede explicarse por la observación de que la inflamación induce edema de las vías aéreas; además de que puede causar daño a nivel del epitelio de dichas vías (Takamoto y col., 1995).

Lam y col. en 1987 y Metzger y col. en 1987 trabajando por separado, observaron que la exudación del plasma en pulmones de pacientes asmáticos, incluye un incremento en la concentración de albúmina, en el número de eosinófilos y linfocitos T CD4⁺, después de que el paciente fue desafiado con un alérgeno, así mismo se observa una respuesta excesiva de IgE es una característica de las enfermedades alérgicas. Buijs y col. en 1994 encontraron que en un grupo de niños con elevados niveles de IgE presentaron una alta relación entre la seroprevalencia a *Toxocara canis* y la ocurrencia de las manifestaciones alérgicas (asma/bronquitis recurrente e IgE específica de alérgeno), las cuales estuvieron ausentes en un grupo de niños con un promedio normal en las concentraciones de IgE.

También se ha observado una población constituida por células Thy 1.2⁺, L₃T₄, T cooperadores en lavados bronquioalveolares de ratones infectados con *Toxocara canis*. Estas se dividen en dos subtipos T_H1 y T_H2, dependiendo del patrón de citocinas producidas. Las T_H2 producen IL-4, responsable de la activación de los genes de la cadena pesada de los *loci* de μ , ϵ , y α de las Igs, IL-5 responsable de la proliferación y maduración de los eosinófilos. La activación de T_H2 en infecciones helmínticas fue demostrada en ratones BALB/c infectados por *Nippostrongylus brasiliensis* (Scott y col., 1989) y en el hombre por *Toxocara canis* (Del Prete y col., 1988; Romagnani 1990). La presencia de IL-5, que estimula la proliferación y diferenciación de los eosinófilos y que activa eosinófilos maduros, y los niveles elevados de IL-4, necesaria para la producción de la IgE, sugieren que

los linfocitos Thy 1.2^+ , L_3T_4^+ en los lavados bronquioalveolares fueron células $\text{T}_{\text{H}2}$ (Buijs y col., 1994).

Una marcada eosinofilia se presenta tanto en ratones desnudos infectados con *Toxocara canis*, como en ratones eutímicos. Previamente Sugane y col. en 1982, establecieron que la eosinofilia en la sangre periférica en ratones BALB/c^+ infectados con *Toxocara canis*, presenta dos picos, sobre el día 10 y 28 de infección considerando que solo el primer pico se presenta en ratones BALB/c-nu/nu ; se sugiere que la eosinofilia en ratones infectados con *Toxocara canis* puede clasificarse en: T-independiente y T-dependiente, y que la eosinofilia en los ratones desnudos pertenece a la primera. Sin embargo, se ha reportado recientemente que la IL-5 está ampliamente asociada con la eosinofilia debida a la infección de helmintos. Coffman y col. en 1988 demostró el papel de la IL-5 en la eosinofilia al inducir la completa supresión de la eosinofilia periférica y tisular por administración de AbM anti-IL-5 y sugirió un papel principal de la IL-5 en la eosinofilopoyesis (Kusama y col., 1995). Yamaguchi y col. en 1990 demostró la expresión del RNAm para la IL-5 en células de bazo a partir de ratones BALB/c infectados con *Toxocara canis*.

En el trabajo realizado por Kusama y col. en 1995, se estudió la eosinofilia en ratones BALB/c^+ (nu^+) y en BALB/c-nu/nu (nu/nu) infectados con 1000 huevos embrionados de *Toxocara canis*, observando dos picos sobre el día 11 y 21 de la infección en los ratones nu^+ y un pico el día 11 en ratones nu/nu . El RNAm de IL-5 se detectó en el día 5 de infección en las células de bazo y pulmón de los ratones

$nu/^{+}$ y en el pulmón de los ratones nu/nu , pero no en el bazo de ellos. Un infiltrado abundante de eosinófilos y linfocitos se observó en el pulmón desde la primera semana en ambos tipos de ratones; así mismo el número de larvas en pulmón aumentó el día 5 (33 +/- 9 larvas para los ratones $nu/^{+}$ y 39 +/- 11 para los ratones nu/nu). El tratamiento con AbM anti-IL-5 inhibió completamente la eosinofilia en ambos tipos de ratones pero no mostró cambios en la distribución de las larvas. La administración de AbM anti-CD4 o anti-CD3 redujo marcadamente un segundo pico de eosinofilia presentado el día 26 de la infección en ratones $nu/^{+}$ y redujo ligeramente el primer pico de eosinofilia sobre el día 11 en ambos ratones. Los AbM anti-CD8 no tuvieron efecto sobre la eosinofilia, lo que sugirió que era inducida por la IL-5, producida por células $CD4^{+}$ en adición a otras células (Kusama y col., 1995).

Takamoto y col. 1993, demostró que la producción de IL-5 era realizada por células doble negativas pulmonares en ratones $nu/^{+}$ y nu/nu infectados con 1000 huevos larvados de *Toxocara canis*. Sin embargo, Desreumaux y col. en 1992 reportaron que los eosinófilos por si mismos expresan RNAm de IL-5 (Takamoto *et al.*, 1993).

Así mismo Inuo y col. en 1995 lograron inducir una respuesta proliferativa de células mononucleares $CD4^{+}$ en sangre periférica de humanos sanos en respuesta a Ags de gusanos adultos de *Toxocara canis*.

6.0 JUSTIFICACIÓN

El nemátodo parásito *Toxocara canis* es el principal agente causal de los síndromes de *Larva Migrans Visceral* y de *Larva Migrans Ocular*, al tener un ciclo de vida complejo y al presentar migraciones erráticas tanto en el hospedero definitivo como en los hospederos paraténicos afecta a una gran cantidad de órganos y tejidos del organismo, de entre los que se encuentran hígado, riñones, pulmón, músculo, corazón, cerebro y ojos; siendo uno de los principalmente afectados el pulmón.

La presencia de las larvas de *T. canis* se asocia en los diferentes tejidos afectados con su destrucción, ya sea en forma directa o indirecta durante su migración. En forma directa al secretar enzimas proteolíticas capaces de degradar la matriz extracelular para facilitar la migración larvaria, además estas enzimas parecen estar involucradas en funciones de alimentación ejerciendo una acción exfoliatriz histófaga. En forma indirecta estas larvas pueden inducir respuestas inmunes exacerbadas, como consecuencia de la participación de los mecanismos de inmunoevasión que han desarrollado, lo que favorece la supervivencia del parásito por amplios periodos en los tejidos de su hospedero. Esto en conjunto juega un papel muy importante dentro de la patogenia de la enfermedad. Característico de la invasión parasitaria, es la presencia de infiltrados eosinofílicos, eosinofilia periférica y de niveles elevados de IgE, alteraciones similares a las observadas en enfermedades alérgicas mediadas por IgE (Takamoto y col., 1993; Sane y col., 1997).

La presencia de larvas de *T. canis* en pulmón provoca clínicamente fiebre, tos seca, que puede volverse productiva, dificultad respiratoria o insuficiencia respiratoria. Las exposiciones repetidas a infecciones con *Toxocara* pueden activar manifestaciones alérgicas, incluyendo bronco espasmos, en respuesta a la migración de las larvas o a sus productos de secreción y excreción.

Debido a esto se han realizado trabajos en los cuales se han analizado las poblaciones celulares presentes en lavados bronquiales así como en sangre periférica de individuos infectados con *Toxocara*. Sin embargo, no se han realizado estudios en los cuales se haya analizado las poblaciones celulares en el órgano *in situ* de individuos infectados, para determinar cuales son los tipos celulares predominantes, por lo tanto tampoco se ha establecido la distribución anatómica de los diferentes tipos celulares presentes en los individuos inoculados.

Por otro lado estudios realizados por Alba y col. en el 2000, utilizando jerbos mongólicos han establecido los diferentes periodos de tiempo en los cuales la toxocariosis se presenta en una etapa aguda (alrededor de los 8-12 días), una etapa crónica (alrededor de los 30-35 días) y una etapa de recuperación (alrededor de 70-75 días). Lo que resulta de interés para determinar la cinética de presentación de las poblaciones celulares implicadas en el padecimiento.

7.0 HIPÓTESIS

La infección de ratones con huevos larvados de *Toxocara canis* induce en el pulmón una respuesta inflamatoria que altera la cantidad y localización de las poblaciones celulares.

8.0 OBJETIVO GENERAL.

Valorar los cambios producidos en las diferentes poblaciones celulares que ocurren en el parénquima pulmonar de ratones infectados con larvas de *Toxocara canis*, realizando un seguimiento durante las diferentes etapas del padecimiento.

9.0 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Cuantificar mediante pruebas inmunohistoquímicas y con tinciones especiales el número de diferentes subpoblaciones linfocitarias (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ e IgA⁺), eosinófilos y células cebadas.
- Determinar la distribución anatómica de los diferentes tipos celulares que se presentan en el pulmón de ratones infectados experimentalmente con larvas de *Toxocara canis*.
- Comparar el número y la distribución de las células estudiadas en tres etapas diferentes de la infección (aguda, crónica y de reparación).

10.0 MATERIAL Y METODOS

10.1 ANIMALES.

Se utilizaron 60 ratones machos de la cepa BALB/c de 60 a 70 días de edad, alimentados con alimento comercial balanceado para roedores (Nutricubos purina) y agua purificada *ad libitum*, procurando una temperatura ambiente de 30°C y una relación de luz-obscuridad de 50:50.

10.2 OBTENCIÓN DE INOCULO.

La obtención y cultivo de huevos se realizó modificando el método descrito por Oshima en 1961. Se recolectaron parásitos adultos de *T. canis* a partir del intestino delgado de cachorros de entre uno y tres meses de edad con infección natural. Las hembras de *T. canis* fueron separadas de los machos y colocadas en cajas de Petri con solución amortiguadora de fosfato (PBS), se extrajo el útero por una incisión en la parte media del cuerpo. Los úteros obtenidos se colocaron en solución salina fisiológica y se obtuvieron los huevos; se utilizó un colador fino para eliminar los restos y membranas del parásito. Los huevos se sometieron a varios lavados con PBS mediante centrifugación a una velocidad de 600 g durante 5 minutos, para eliminar el exceso de contaminantes mediante decantación, el botón de huevos sedimentados fue resuspendido en formol al 2% en PBS. Los huevos obtenidos fueron suspendidos en formol al 2%, se colocaron en cajas de Petri y se incubaron en una estufa bacteriológica, a una temperatura de 37° C

durante 28 días (de Savigny, 1975; Bowman y col. 1987). Al término del proceso se verificó la viabilidad de los cultivos mediante la observación al microscopio del movimiento larvario dentro de los huevos.

La estimación de huevos en el inóculo se realizó mediante el conteo por quintuplicado de los huevos larvados presentes en 20 μ l de cada cultivo, se obtuvo el promedio y se multiplicó por 50, dando como resultado el número de huevos larvados por ml. de suspensión.

En el momento de la inoculación, la suspensión se lavó para dejarla libre de PBS formolado y se resuspendió en Solución Salina Fisiológica (SSF). El inóculo se concentró a 7500 huevos por ml., para alcanzar una concentración de 1500 hltc en 0.2 ml. de la suspensión.

10.3 DISEÑO EXPERIMENTAL.

Los ratones fueron divididos en 6 grupos con 10 ratones cada uno, de estos grupos, tres fueron designados como grupos experimentales y los tres restantes como grupos testigo. Los animales de los grupos experimentales fueron inoculados intragástricamente con 1500 huevos larvados hltc en 0.2 ml. de SSF. Los animales de los grupos testigo recibieron únicamente 0.2 ml. de SSF.

Un grupo testigo y un experimental fueron sacrificados a los días 5, 30 y 60 posinoculación. Una vez sacrificados los animales se les extrajeron los pulmones, los pulmones izquierdos se fijaron en formol al 10% en PBS, se deshidrataron e incluyeron en parafina, una vez incluidos se cortaron y se tiñeron cuando menos

dos cortes histológicos con cada una de las diferentes tinciones (Hematoxilina-Eosina, azul de toluidina y cromotrope 2R).

Los pulmones derechos se infiltraron e incluyeron con medio de criopreservación (Jung tissue freezing médium, Leica instrument) y se congelaron. Estos pulmones se utilizaron para realizar cortes con el criotomo, para hacer tinciones inmunohistoquímicas, que determinaron las subpoblaciones de linfocitos IgA⁺, CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺.

10.4 PROCESAMIENTO DE CORTES HISTOLÓGICOS

Se extrajeron los pulmones de todos los animales sacrificados. El pulmón izquierdo se fijo con formol al 10% en PBS. Cada muestra se deshidrató con alcoholes de menor a mayor concentración, se aclaró con xilol y se infiltró en parafina. Más tarde, cada una de las muestras previamente identificadas fueron incluidas en cubos de parafina. Los pulmones incluidos en parafina se cortaron en un micrótopo, a un grosor de 5 µm., se obtuvieron dos cortes seriados de cada muestra por laminilla y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina para observar cortes histopatológicos normales, con azul de toluidina para evidenciar células cebadas y con Cromotrope 2R para evidenciar la presencia de eosinófilos (Lendrum, 1944; Luna, 1968).

10.5 PROCESAMIENTO DE CORTES HISTOLÓGICOS CONGELADOS

El pulmón derecho de cada ratón se infiltró con medio de crio-preservación una mezcla de alcohol polivinil, polietilenglicol y dimetil benzil amonio (OCT) y se depositó en viales que contenían la solución crioprotectora, se sumergieron paulatinamente en nitrógeno líquido. Una vez congelados los pulmones, fueron almacenados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la realización de los cortes criohistológicos que se utilizaron para la realización de pruebas inmunohistoquímicas.

Los pulmones congelados se cortaron a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un criótomo, se obtuvieron ocho cortes por muestra con un grosor de $5\text{ }\mu\text{m}$, procurando obtenerlos de forma seriada. Estos cortes se depositaron en laminillas multipozos precubiertas (Multispot microscope slides PTEF and specialised coatings, Hendley-Essex). Las muestras se fijaron en acetona a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 10 min, se secaron al aire y se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta ser utilizadas.

10.6 ANTICUERPOS MONOCLONALES

Para la técnica de inmunoperoxidasa (Avidina-Biotina) se utilizó un panel de anticuerpos monoclonales (AbM) anti-CD3, CD4, CD8 (panel de T) y anti-IgA. La descripción de cada uno de los AbM utilizados, se incluye en la siguiente tabla.

CUADRO 1					
PANEL DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA LINFOCITOS T					
ESPECIFICIDAD	CLONA	ISOTIPO	FUENTE	CARACTERISTICAS	MARCA
CD3	MSA-4	IgG _{2b}	RATA		BIOSOURCE
CD4	KT3	IgG _{2b}	RATA		BIOSOURCE
CD8	KT174	IgG _{2c}	RATA		BIODESIGN
IgA	AMI2109	IgM κ	RATA	MARCADO CON BIOTINA	BIOSOURCE

Se utilizo como anticuerpo secundario, un cabra anti-IgG de rata marcado con biotina, producido por Amersham (No. Catalogo RPN 1002).

10.7 TINCIÓN CON LA TÉCNICA DE INMUNOPEROXIDASA (AVIDINA-BIOTINA).

La inmunotinción de las muestras congeladas, se realizó modificando el método descrito por García-Reina en 1997.

Protocolo de tinción para muestras congeladas :

- Preservación de la morfología. Las muestras se colocaron durante 10 min. en cloroformo para preservar la morfología celular.
- Hidratación de las muestras. Las muestras se colocaron durante 5 min. en PBS para la eliminación de la solución crioprotectora e hidratación de las muestras.
- Bloqueo de peroxidasa endógena. Para eliminar la actividad de la peroxidasa

endógena, las secciones del tejido fueron tratadas con PBS con 0.3 % de H₂O₂ al 30 % durante 60 min. a temperatura ambiente (TA) con cambios cada 20 minutos. Al finalizar las laminillas se lavaron 3 veces por 5 min. c/u en PBS.

- Bloqueo de la actividad de biotina endógena. Se cubrieron las secciones con clara de huevo 20% en PBS-BSA 0.1% NaN₃ 1%, y se incubaron durante 20 min. a temperatura ambiente. Al final se lavaron las muestras con PBS 3 veces durante 5 min. c/u.
- Aplicación del suero de bloqueo. Se cubrieron las preparaciones completamente con suero normal de cabra y se incubaron por 1 hr. a TA dentro de una cámara húmeda.
- Aplicación del anticuerpo primario. Se decantó el suero de bloqueo sin lavar y se limpió perfectamente el exceso de suero de los bordes del tejido. Las preparaciones se cubrieron con el respectivo anticuerpo primario y se incubaron durante 2 hrs a TA, dentro de una cámara húmeda. Al finalizar este paso se lavaron con PBS 3 veces durante 5 min. c/u.
- Aplicación del anticuerpo biotinilado. Se secó completamente el PBS de los bordes del tejido y la preparación se cubrió con el anticuerpo (de cabra anti-IgG de ratón) biotinilado para incubar a TA por 1 hr. en cámara húmeda, posterior a esto se lavó con PBS 3 veces durante 5 min. c/u. En el caso de la técnica para detectar IgA no fue necesario aplicar este anticuerpo, por tratarse de una técnica directa.
- Aplicación de la estreptavidina-peroxidasa. Se limpiaron los bordes del tejido y

la muestra se cubrió con la estreptavidina-peroxidasa y se incubaron durante 1 hr. en cámara húmeda a TA. Al final se lavaron con PBS 3 veces durante 5 min. c/u.

- Aplicación de la diaminobenzidina (DAB). Se secaron perfectamente los bordes de la muestra del PBS de lavado y se aplicó la DAB. Se esperaron unos segundos a que se observara la reacción al microscopio óptico y se lavaron las muestras en TBS 3 veces por 5 min. c/u.
- Contrateñido. El contraste al tejido se realizó con solución de Hematoxilina, durante 4 seg. La laminilla se lavó con agua corriente y se pasó por unos segundos por alcohol ácido y se lavó con agua corriente. Se realizó la deshidratación de la muestra con alcoholes (70, 90 Y 100%), durante 5 min. c/u y posteriormente el aclaramiento de tejido con xilol durante 5 min..
- Montaje. Las muestras fueron montadas utilizando, medio de montaje para microscopia.

NOTA: En el caso de la técnica utilizando el AbM AMI2109 dirigido contra IgA se realizó la misma metodología que para las células T, adicionando una variante después de la preservación morfológica con cloroformo, siendo esta un lavado durante 12 horas con PBS, pasado este tiempo la técnica de tinción siguió los pasos previamente descritos.

10.8 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS

Las células se contaron utilizando un sistema semi-automático de análisis de imágenes por computadora de alta resolución (Image Pro Plus, Media Cybernetics), el cual permite observar la imagen de las muestras vistas a través de un microscopio sobre un monitor a color.

Con este sistema fue posible contar las células positivas y medir con exactitud el área de tejido en donde aparecieron. Los resultados se expresaron como número de células por mm² de tejido.

Para la cuantificación se establecieron tres áreas pulmonares diferentes: células tisulares, células asociadas a vasos sanguíneos y células asociadas a bronquios. Se descartaron las células contenidas dentro de la luz de los vasos sanguíneos y bronquiólos, contando por lo menos 5 campos de cada área seleccionada en cada muestra de tejido.

10.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con el objetivo de comparar los resultados obtenidos de las cuentas de las diferentes poblaciones celulares presentes en la respuesta que montan los ratones en contra de las larvas de *Toxocara canis*. Se compararon los datos obtenidos mediante una prueba de T, para establecer si existían diferencias entre los grupos experimentales y su correspondiente testigo.

El análisis de varianza nos permitió establecer si existían diferencias entre los diferentes compartimientos de los animales experimentales y la prueba de Tukey nos permitió establecer entre que órganos se presentaban las diferencias (Wayne, 1982). Estos análisis fueron realizados en el programa de Microsoft® Excel 2000.

11.0 RESULTADOS

El estudio morfométrico permitió observar la distribución que siguen algunas de las diferentes poblaciones celulares que intervienen en la respuesta inmune montada contra las L₂ de *Toxocara canis* en un modelo experimental a nivel pulmonar. Por lo anterior se estableció que las poblaciones celulares se ubicaron en tres diferentes compartimientos pulmonares, denominándolos de la siguiente manera :

- Área intersticial.
- Área perivascular.
- Área peribronquial.

El número de células CD3⁺ presentes en el pulmón de animales del grupo experimental en general fue mayor que en los del grupo testigo, esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en los tres compartimientos a los 30 días p.i. y a los 5 días únicamente en el espacio intersticial (cuadro 2, figura 6).

La densidad de células CD3⁺ a los 5 días p.i. fue mayor ($p < 0.05$) en el espacio perivascular que en los otros compartimientos (figuras 12B y C), no se observaron diferencias entre los compartimientos tisular y peribronquial a ese tiempo p.i.. A los 30 días p.i. todos los compartimientos pulmonares mostraron tener diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$). Los animales sacrificados a los 60 días p.i. mostraron no tener diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) en el número de células CD3⁺ en ningún compartimiento (cuadro 2 y figura 6).

CUADRO 2.- Número de linfocitos T CD3⁺/mm² en pulmones de ratones inoculados con 1500 huevos larvados de *Toxocara canis* y sacrificados a diferentes periodos. Este número representa los resultados promedio \pm su desviación estándar, obtenidos del conteo de 5 campos microscópicos seleccionados aleatoriamente.

Linfocitos T CD3⁺			
Días postinoculación	Compartimientos pulmonares		
	AT Cel's/mm²	APv Cel's/mm²	APb Cel's/mm²
5 Tgo	216.8\pm114.4*	745.2\pm423.3**	498.4\pm182.6**
5 Hltc	309.8\pm101.8*\diamond	1248.1\pm813.9**\diamond	560.2\pm272.5**\diamond
30 Tgo	229.3\pm74.9*	781.9\pm202.9*	546.4\pm126.3*
30 Hltc	320.3\pm125.7*\diamond	1364.9\pm435.3*\diamond	1286.3\pm655.7*\diamond
60 Tgo	234.8\pm63.3**	840.3\pm227.1**	788.9\pm141.8**
60 Hltc	230.5\pm33.1**\diamond	641.2\pm315.5**\diamond	651.7\pm162.6**\diamond

AT = Área tisular

APv = Área perivascular

APb = Área peribronquial

Hltc = Inoculado con huevos larvados de *T. canis*

Tgo = Grupo testigo

Prueba T (entre grupos) * $P < 0.05$ ** No significativo ANOVA (entre áreas) * $P < 0.05$ ** No significativo

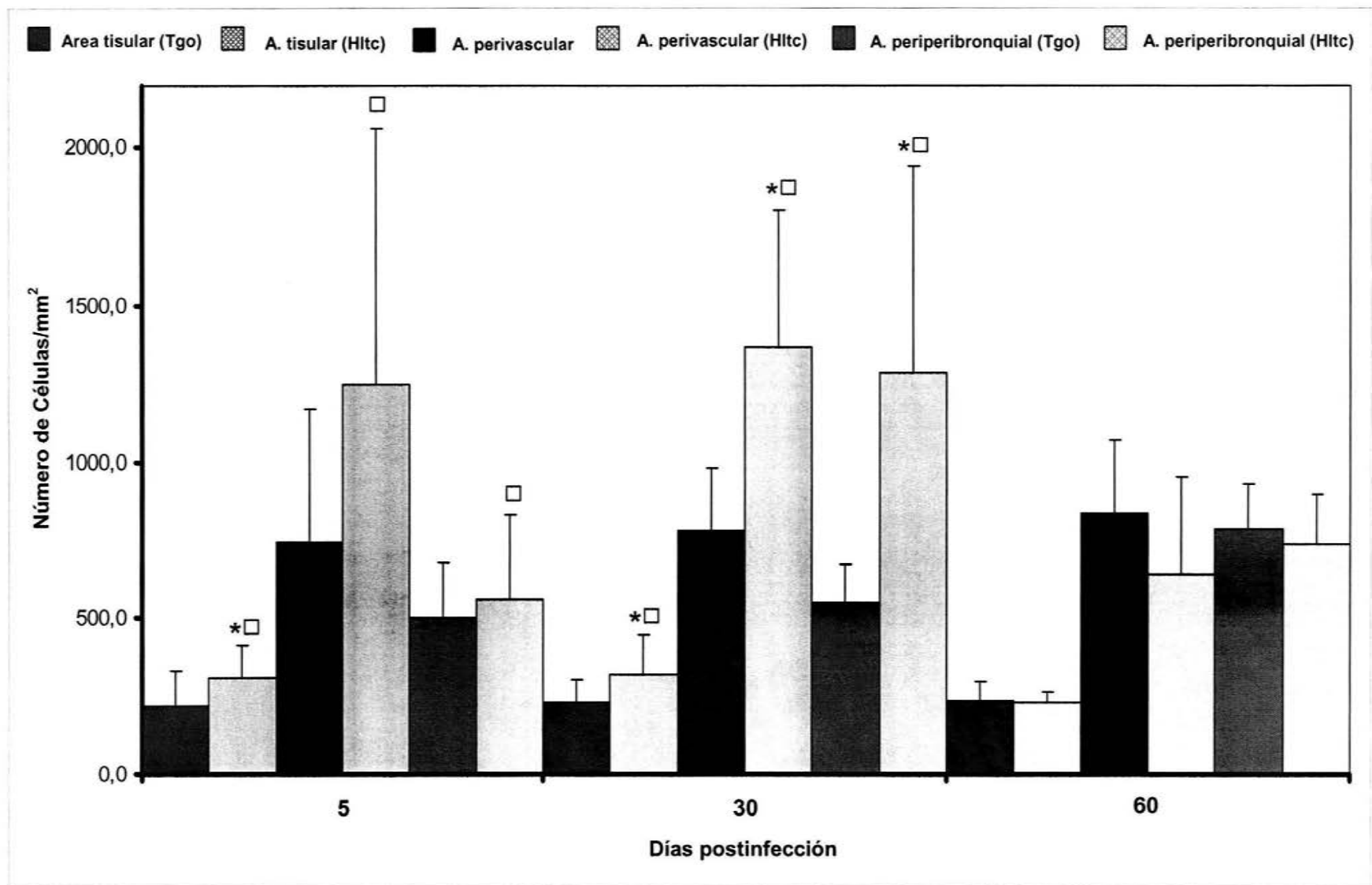


Figura 6.- Número de células CD3⁺ en pulmones de ratones inoculados con 1500 hltc y sacrificados a diferentes periodos de tiempo (5, 30, 60 días postinoculación). Cada barra corresponde al promedio de las medias de 10 animales ± su desviación estandar tomadas de 5 campos microscópicos. Prueba T *P<0.05 y ANOVA □P<0.05.

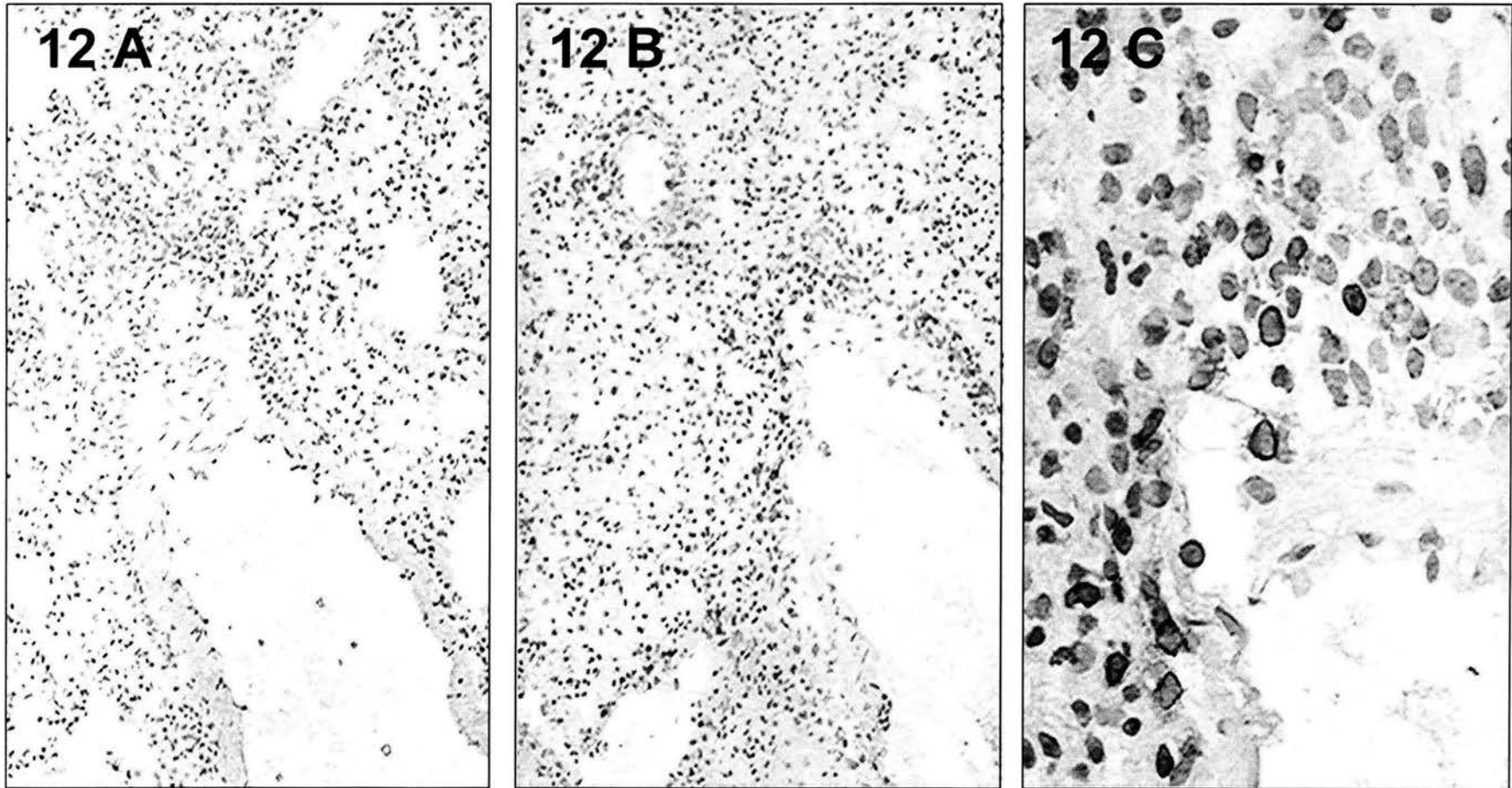


Figura 12. Tinción inmunohistoquímica (Avidina-Biotina) con el AbM anti CD3 en cortes congelados de pulmón de ratones sacrificados a los 5 días p.i. con 1500 hlrc (100X). A) Control de la tinción con PBS. Se observa un área de infiltrado perivascular sin marca B) Área de infiltrado perivascular, las células positivas se disponen principalmente perivascularmente (100X). C) Acercamiento de la microfotografía anterior, evidenciando la presencia de células CD3⁺ intercaladas con escasas células polimorfonucleares (400X).

El número de células CD4⁺ presentes en el pulmón de los animales del grupo experimental de manera general fue mayor que en los del grupo testigo, esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en los tres compartimientos únicamente a los 60 días p.i. (cuadro 3 y figura 7).

La densidad de células CD4⁺ a los 5 y 30 días p.i. no presentaron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) en los diferentes compartimientos pulmonares. Los animales sacrificados a los 60 días p.i. mostraron tener diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en el número de células CD4⁺ en todos compartimientos (cuadro 3, figura 7 y figuras 13B y C).

CUADRO 3.- Número de linfocitos T CD4⁺/mm² en pulmones de ratones inoculados con 1500 huevos larvados de *Toxocara canis* y sacrificados a diferentes periodos. Este número representa los resultados promedio \pm su desviación estándar, resultados obtenidos del conteo de 5 campos microscópicos seleccionados aleatoriamente.

Linfocitos T CD4 ⁺			
Días postinoculación	Compartimientos pulmonares		
	AT Cel's/mm ²	APv Cel's/mm ²	APb Cel's/mm ²
5 Tgo	31.04 \pm 9.04 ^{**♦♦}	123.2 \pm 91.8 ^{**♦♦}	78.7 \pm 37.7 ^{**♦♦}
5 Hltc	41.6 \pm 56.2 ^{**♦♦}	257.1 \pm 353.8 ^{**♦♦}	77.3 \pm 127.9 ^{**♦♦}
30 Tgo	15.4 \pm 12.3 ^{**♦♦}	64.1 \pm 48.6 ^{**♦♦}	35.9 \pm 34.03 ^{**♦♦}
30 Hltc	21.9 \pm 16.6 ^{**♦♦}	100.2 \pm 63.1 ^{**♦♦}	65.9 \pm 57.2 ^{**♦♦}
60 Tgo	19.6 \pm 11.2 [*]	66.9 \pm 30.9 [*]	55.4 \pm 37.2 [*]
60 Hltc	45.4 \pm 22.2 [♦]	146.1 \pm 63.8 [♦]	100.7 \pm 58.3 [♦]

AT = Área tisular

APv = Área perivascular

APb = Área peribronquial

Hltc = Inoculado con huevos larvados de *T. canis*

Tgo = Grupo testigo

Prueba T (entre grupos) * $P < 0.05$ ** No significativo ANOVA (entre áreas) ♦ $P < 0.05$ ♦♦ No significativo

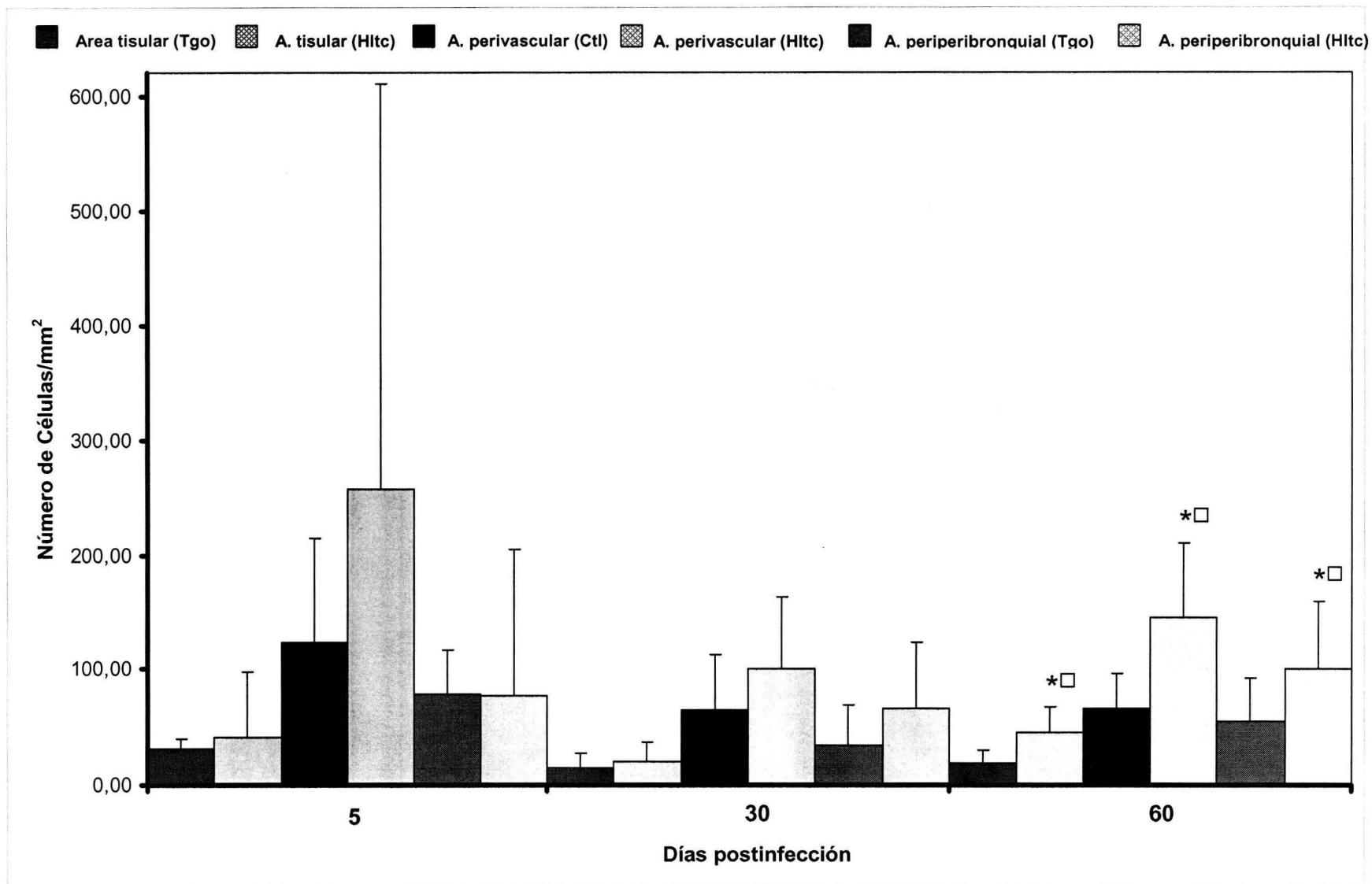


Figura 7.- Promedio de linfocitos T CD4⁺ en pulmones de ratones inoculados con 1500 hltc y sacrificados a diferentes periodos de tiempo (5, 30, 60 días postinoculación). Cada barra corresponde al promedio de las medias de 10 animales \pm su desviación estandar tomadas de 5 campos microscópicos. Prueba T * $P < 0.05$ y ANOVA $\square P < 0.05$.

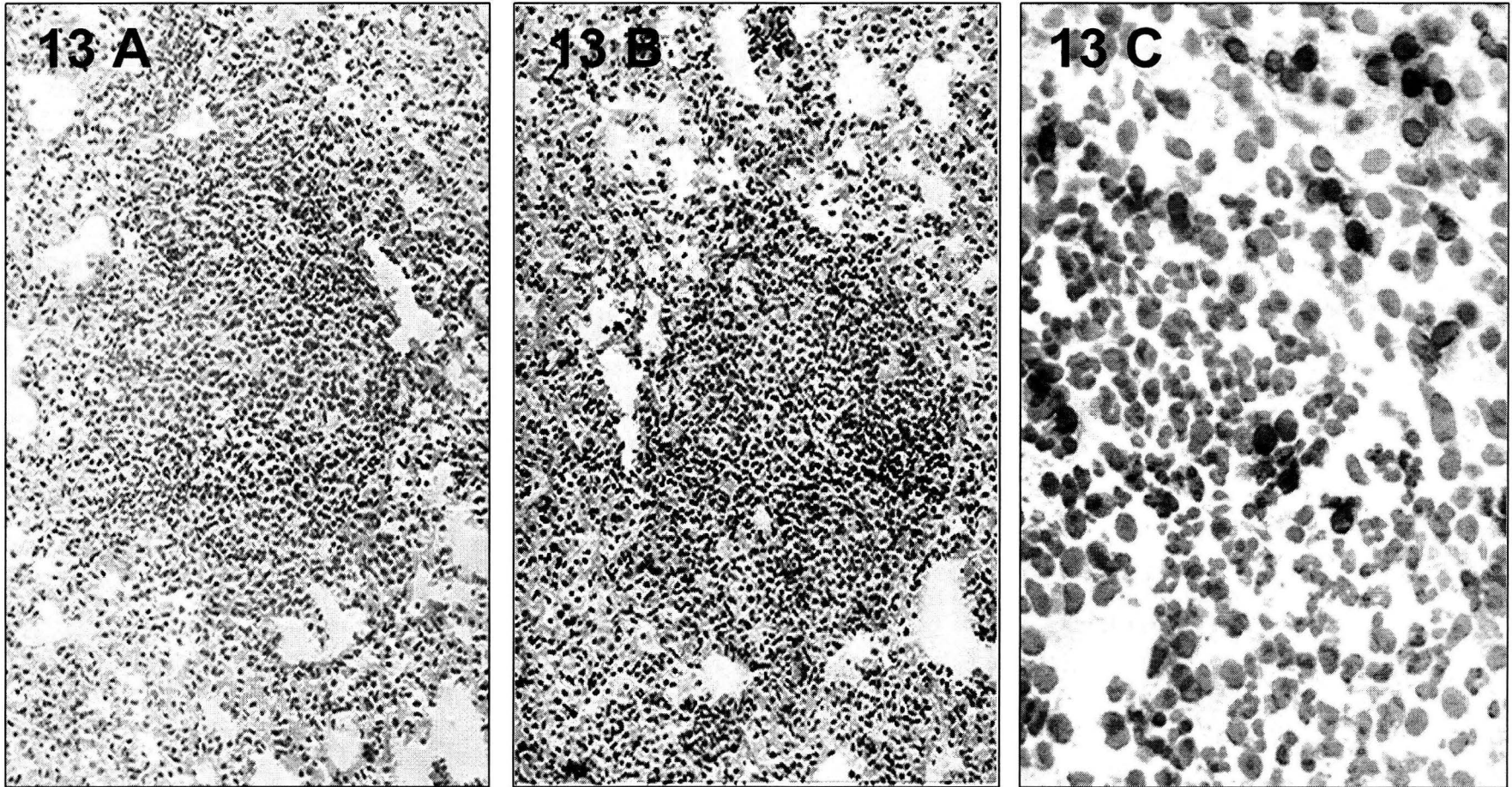


Figura 13. Tinción inmunohistoquímica (Avidina-Biotina) con el AbM anti CD4 en cortes congelados de pulmón de ratones inoculados con 1500 hltc (100X). A) Control de la tinción con PBS. Se observa un granuloma sin marca a los 30 días p.i.. B) Células CD4⁺ ubicadas en el área tisular dentro de un granuloma (100X). C) Acercamiento de la microfotografía anterior, evidenciando la presencia de células CD4⁺ intercaladas con abundantes células polimorfonucleares (400X).

El número de células CD8⁺ presentes en el pulmón de animales del grupo experimental en general fue mayor que en los del grupo testigo, esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en los tres compartimientos a los 5 y a los 30 días p.i. únicamente en el espacio peribronquial (cuadro 4 y figura 8).

La densidad de células CD8⁺ a los 5 días p.i. fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$) en los tres compartimientos pulmonares. A los 30 días p.i. la concentración de células CD8⁺ fue mayor ($p < 0.05$) en el compartimiento peribronquial que en los otros dos compartimientos (figuras 14B y C). Los animales sacrificados a los 60 días p.i. mostraron tener diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en el número de células CD8⁺ en todos compartimiento (cuadro 4 y figura 8).

CUADRO 4.- Número de linfocitos T CD8⁺/mm² en pulmones de ratones inoculados con 1500 huevos larvados de *Toxocara canis* y sacrificados a diferentes periodos. Este número representa los resultados promedio \pm su desviación estándar, resultados obtenidos del conteo de 5 campos microscópicos seleccionados aleatoriamente.

Linfocitos T CD8 ⁺			
Días postinoculación	Compartimientos pulmonares		
	AT Cel's/mm ²	APv Cel's/mm ²	APb Cel's/mm ²
5 Tgo	208.9 \pm 104.1*	670.7 \pm 451.5*	590.03 \pm 312.6*
5 Hltc	311.9 \pm 78.7* \diamond	1262.5 \pm 634.7* \diamond	1150 \pm 656.6* \diamond
30 Tgo	27.04 \pm 12.7**	605 \pm 583	523.9 \pm 178.8*
30 Hltc	238.4 \pm 84.3** \diamond	737.1 \pm 296.2** \diamond	863.3 \pm 292.7* \diamond
60 Tgo	148.7 \pm 32.4**	504.1 \pm 216.2**	568.9 \pm 254.8**
60 Hltc	125.2 \pm 35.7** \diamond	437.9 \pm 135.9** \diamond	559.9 \pm 214.6** \diamond

AT = Área tisular

APv = Área perivascular

APb = Área peribronquial

Hltc = Inoculado con huevos larvados de *T. canis*

Tgo = Grupo testigo

Prueba T (entre grupos) * $P < 0.05$ ** No significativo ANOVA (entre áreas) * $P < 0.05$ \diamond No significativo

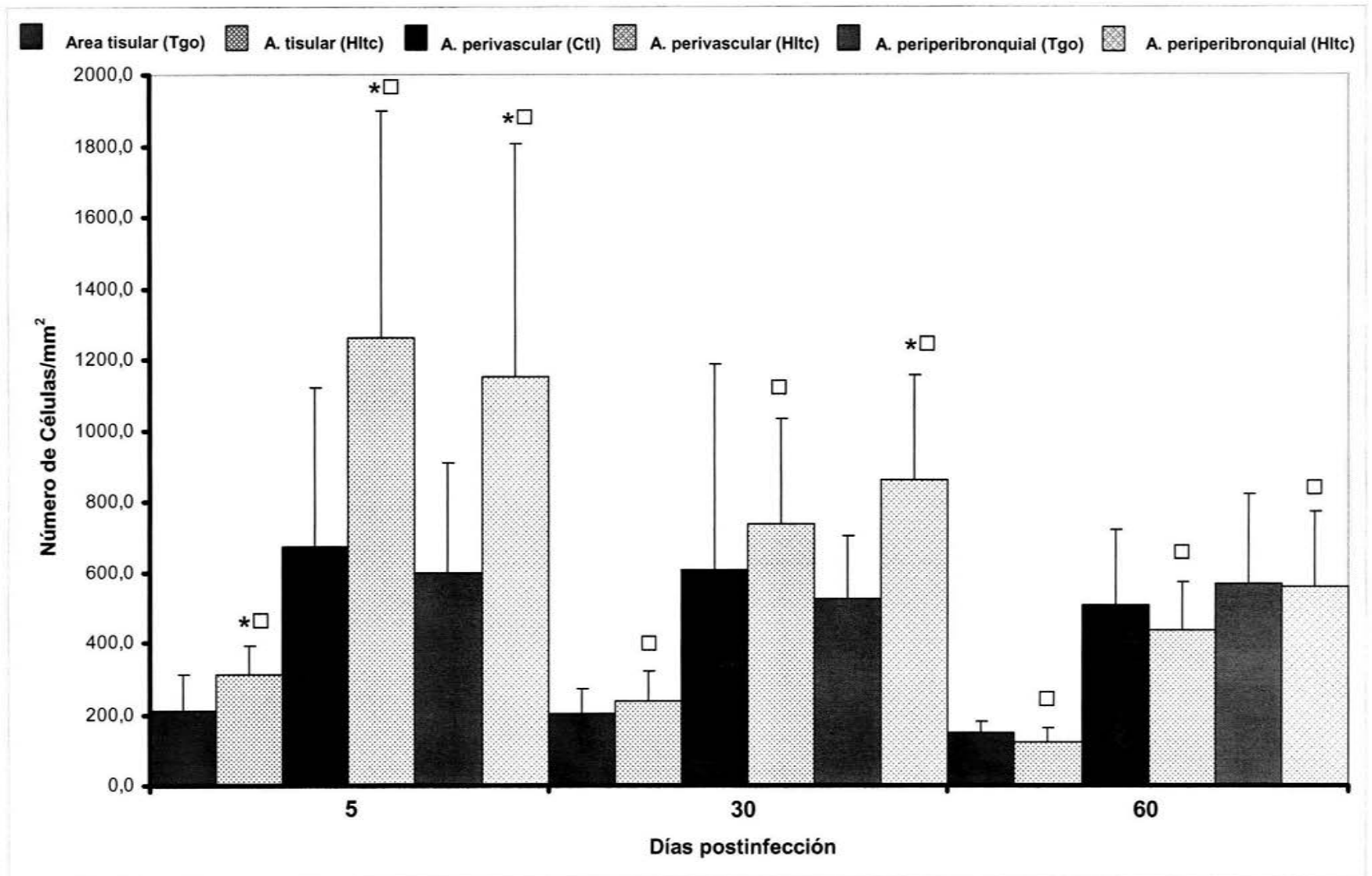


Figura 8.- Promedio de linfocitos T CD8⁺ en pulmones de ratones inoculados con 1500 hltc y sacrificados a diferentes periodos de tiempo (5, 30, 60 días postinoculación). Cada barra corresponde al promedio de las medias de 10 animales \pm su desviación estandar tomadas de 5 campos microscópicos. Prueba T * $P < 0.05$ y ANOVA $\square P < 0.05$.

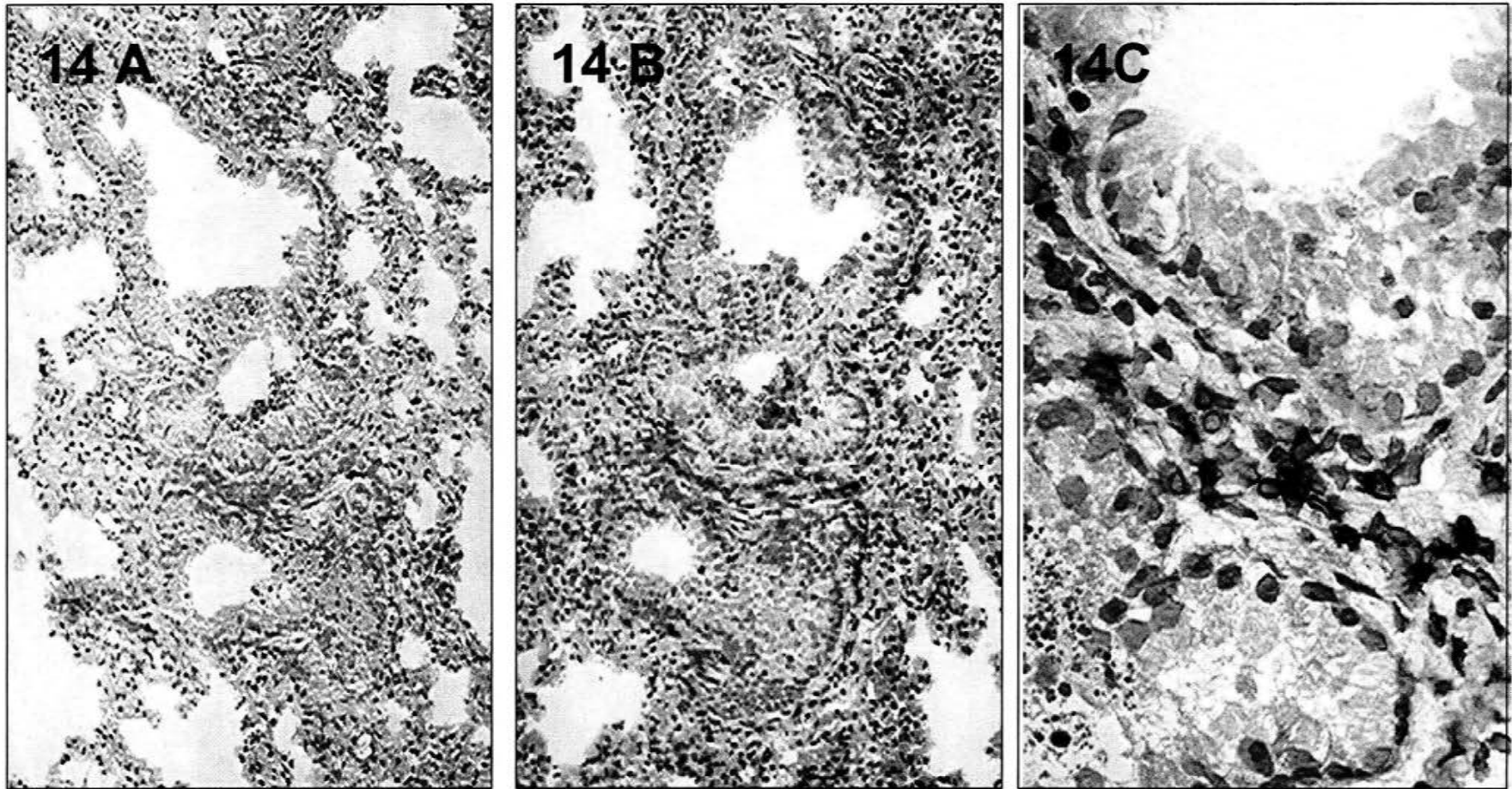


Figura 14. Tinción inmunohistoquímica (Avidina-Biotina) con el AbM anti CD8 en cortes congelados de pulmón de ratones inoculados con 1500 hltc. A) Control de la tinción con PBS. Se observa un área de infiltrado inflamatorio peribronquial sin marca a los 30 días p.i. (100X). B) Área de infiltrado peribronquial, las células positivas están localizadas principalmente en la pared bronquial (100X). C) Acercamiento de la microfotografía anterior, evidenciando la presencia de células CD8⁺ ubicadas entre dos bronquiólos (400X).

El número de células IgA⁺ presentes en el pulmón de animales del grupo experimental en general fue mayor que en los del grupo testigo, esta diferencia fue estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en el compartimiento perivascular a los 5 días p.i. (figura 15 B y C) Esta diferencia también fue observada a los 30 y 60 días p.i. en el espacio peribronquial (cuadro 5 y figura 9).

El número de células IgA⁺ a los 5 días p.i. fue mayor ($p < 0.05$) en el espacio perivascular que en los otros compartimientos, no se observaron diferencias entre los compartimientos tisular y peribronquial. A los 30 y 60 días p.i. el compartimiento peribronquial presento mayor cantidad de células IgA⁺ ($p < 0.05$) que el resto de los compartimientos (cuadro 5 y figura 9).

CUADRO 5.- Número Células IgA⁺/mm² en pulmones de ratones inoculados con 1500 huevos larvados de *Toxocara canis* y sacrificados a diferentes periodos. Este número representa los resultados promedio \pm su desviación estándar, resultados obtenidos del conteo de 5 campos microscópicos seleccionados aleatoriamente.

Células IgA ⁺			
Días postinoculación	Compartimientos pulmonares		
	AT Cel's/mm ²	APv Cel's/mm ²	APb Cel's/mm ²
5 Tgo	30.03 \pm 9.4**	148.9 \pm 133.4*	140.8 \pm 102.4**
5 Hltc	39.9 \pm 15.9*** [†]	264.2 \pm 86.6* [†]	145.6 \pm 73.3*** [†]
30 Tgo	25.4 \pm 19.8**	135.8 \pm 122.6**	75.2 \pm 64.9*
30 Hltc	26 \pm 15.5*** [†]	222.2 \pm 139.8*** [†]	219 \pm 81.3* [†]
60 Tgo	26.1 \pm 11.3**	150.1 \pm 50.9**	72.03 \pm 63.1*
60 Hltc	36.5 \pm 27.1*** [†]	166.4 \pm 91.9*** [†]	250.6 \pm 112.1* [†]

AT = Área tisular

APv = Área perivascular

APb = Área peribronquial

Hltc = Inoculado con huevos larvados de *T. canis*

Tgo = Grupo testigo

Prueba T (entre grupos) * $P < 0.05$ ** No significativo ANOVA (entre áreas) * $P < 0.05$ ** No significativo

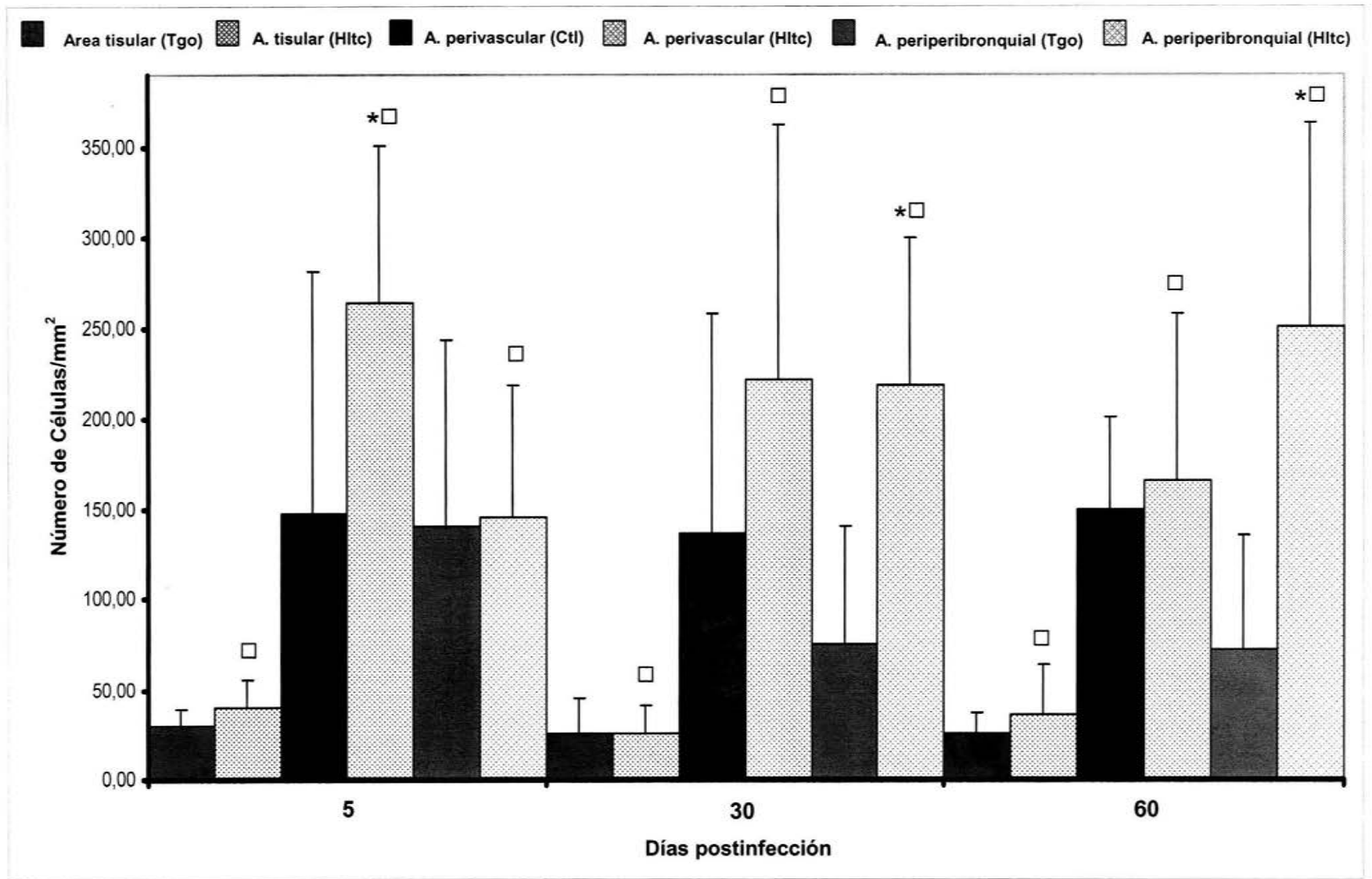


Figura 9.- Promedio de células IgA⁺ en pulmones de ratones inoculados con 1500 hltc y sacrificados a diferentes periodos de tiempo (5, 30, 60 días postinoculación). Cada barra corresponde al promedio de las medias de 10 animales \pm su desviación estandar tomadas de 5 campos microscópicos. Prueba T * $P < 0.05$ y ANOVA $\square P < 0.05$.

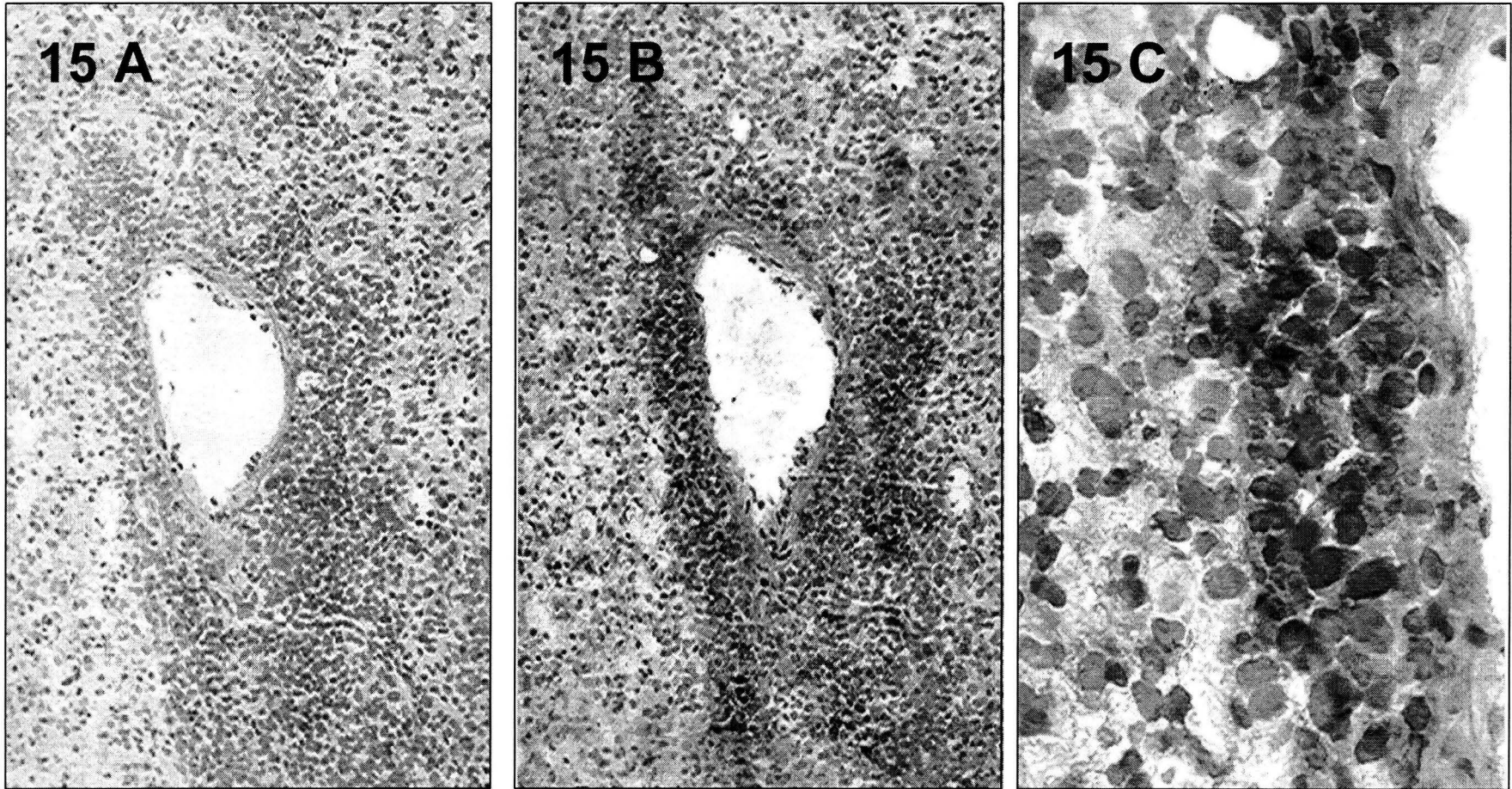


Figura 15. Tinción inmunohistoquímica (Avidina-Biotina) con el AbM anti IgA en cortes congelados de pulmón de ratones inoculados con 1500 hltc. A) Control de la tinción con PBS. Se observa una zona de infiltrado inflamatorio perivascular sin marca (100X). B) Área perivascular, las células positivas están localizadas principalmente en el área perivascular a los 5 días p.i. (100X). C) Acercamiento de la microfotografía anterior, evidenciando la presencia de células positivas en la pared perivascular (400X).

El número de células cebadas presentes en el pulmón de animales del grupo experimental en general fue mayor que en los del grupo testigo, esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el espacio intersticial a los 60 días p.i. y a los 5 días únicamente en el espacio peribronquial (cuadro 6 y figura 10 y figuras 16A y B).

La densidad de células cebadas a los 5 días p.i. fue mayor ($p < 0.05$) en el espacio peribronquial que en el resto de los compartimientos, no se observaron diferencias entre los compartimientos tisular y peribronquial. A los 30 días, p.i. ninguno de los compartimientos pulmonares mostraron tener diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) con los otros compartimientos. Los animales sacrificados a los 60 días p.i. mostraron en el compartimiento perivascular tener mayor número de células cebadas que en los otros compartimientos (cuadro 6, figura 10, figuras 16C y D).

CUADRO 6.- Número Células Cebadas/mm² en pulmones de ratones inoculados con 1500 huevos larvados de *Toxocara canis* y sacrificados a diferentes periodos. Este número representa los resultados promedio \pm su desviación estándar, resultados obtenidos del conteo de 5 campos microscópicos seleccionados aleatoriamente.

Células Cebadas			
Días postinoculación	Compartimientos pulmonares		
	AT Cel's/mm ²	APv Cel's/mm ²	APb Cel's/mm ²
5 Tgo	15.4 \pm 10.9**	28.6 \pm 23.9**	34.6 \pm 26.5*
5 Hltc	36.9 \pm 39.5*** \diamond	32.1 \pm 24.4*** \diamond	62.7 \pm 39.6** \diamond
30 Tgo	10.6 \pm 6.9**	37.4 \pm 44.7**	36.5 \pm 41.9**
30 Hltc	18.6 \pm 13.8*** \diamond	33.9 \pm 23.7*** \diamond	30.5 \pm 26.7*** \diamond
60 Tgo	12.7 \pm 8.5*	26.9 \pm 33.9**	39.9 \pm 38.7**
60 Hltc	31.2 \pm 28.6** \diamond	50.4 \pm 44.3*** \diamond	41.8 \pm 21.9** \diamond

AT = Área tisular

APv = Área perivascular

APb = Área peribronquial

Hltc = Inoculado con huevos larvados de *T. canis*

Tgo = Grupo testigo

Prueba T (entre grupos) * $P < 0.05$ ** No significativo ANOVA (entre áreas) $\diamond P < 0.05$ $\diamond\diamond$ No significativo

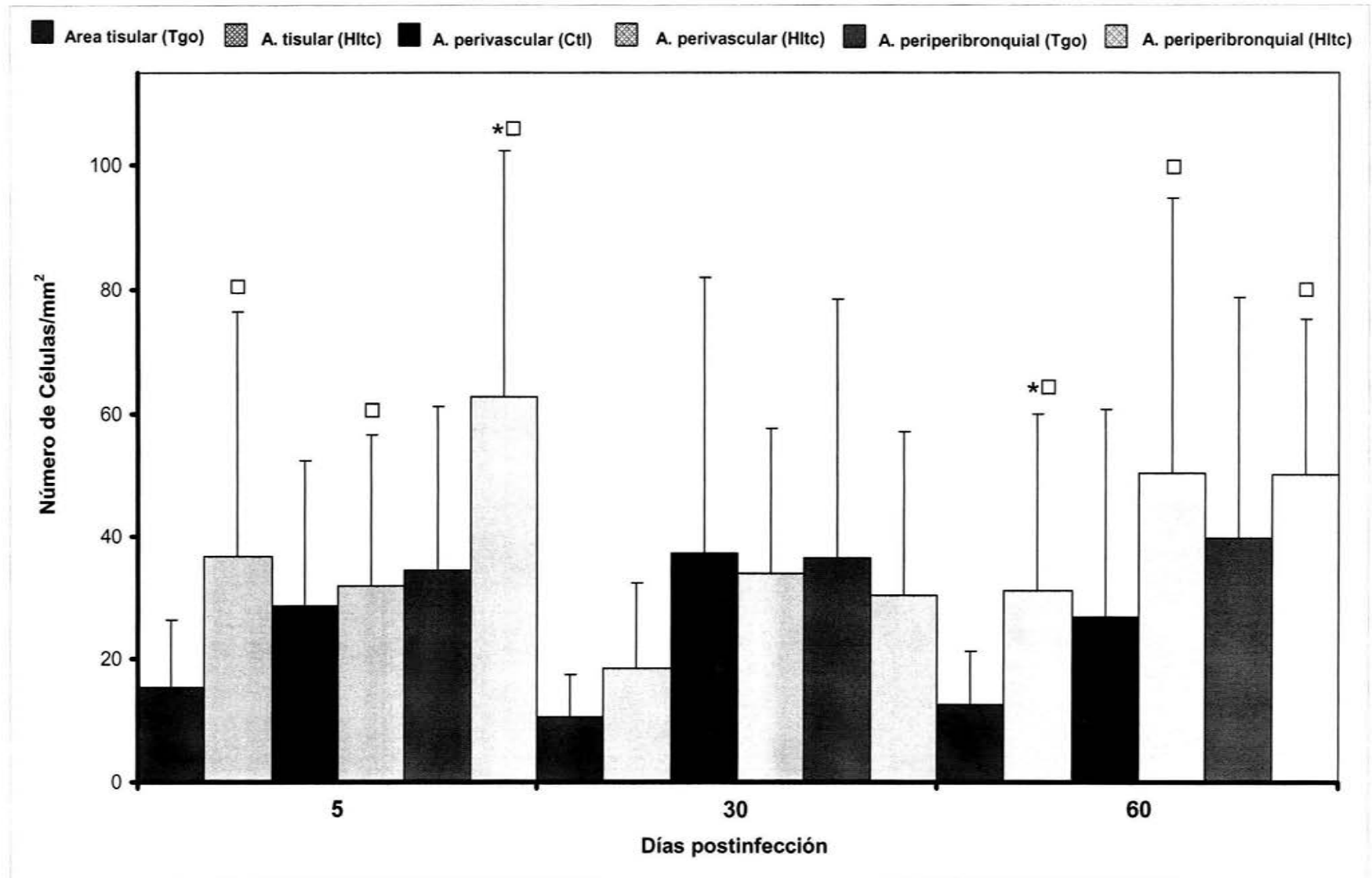
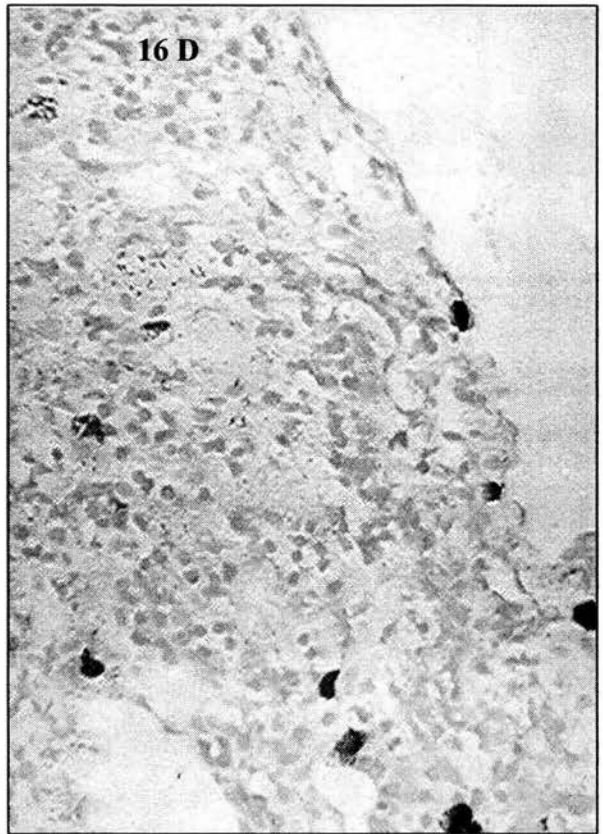
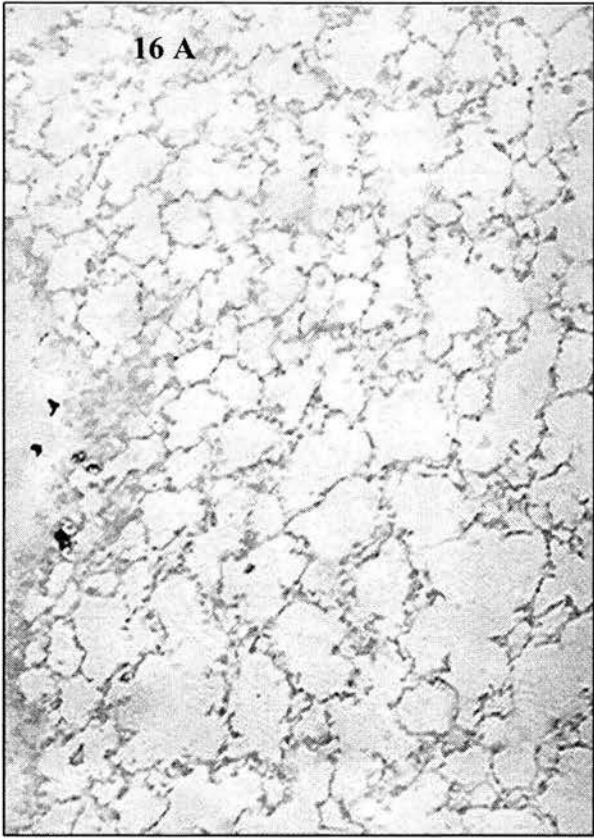


Figura 10.- Promedio de Células Cebadas en pulmones de ratones inoculados con 1500 hlct y sacrificados a diferentes periodos de tiempo (5, 30, 60 días postinoculación). Cada barra corresponde al promedio de las medias de 10 animales \diamond su desviación estandar tomadas de 5 campos microscópicos. Prueba T $*P < 0.05$ y ANOVA $\square P < 0.05$.

Figura 16. Cortes histológicos teñidos con Azul de Toluidina de pulmón de ratones inoculados con 1500 hltc. A) Sección de pulmón teñida a los 5 días p.i. Se observa una zona con células cebadas evidentes sin ningún tipo de reacción inflamatoria asociada (100X). B) Aumento de la microfotografía anterior observando con detalle las células cebadas (400X). C) Área de infiltrado perivascular en un ratón sacrificado a los 30 días p.i. conteniendo células cebadas (100X). D) Acercamiento de la microfotografía anterior, se observa la zona de infiltrado con células cebadas evidentes (400X).



Finalmente, el número de eosinófilos presentes en el pulmón de animales del grupo experimental de manera general fue mayor que en los del grupo testigo, esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el espacio intersticial a los 5, 30 y 60 días p.i. En los espacios perivascular y peribronquial las diferencias solo fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$) a los 60 días p.i. (cuadro 7 y figura 11).

La concentración de eosinófilos a los 5 días p.i. fue mayor ($p < 0.05$) en el espacio tisular que en los otros compartimientos, no se observaron diferencias entre los compartimientos perivascular y peribronquial. A los 30 días p.i. el área tisular, es el único compartimiento que tiene diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Los animales sacrificados a los 60 días p.i. mostraron tener diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en el número de eosinófilos en todos los compartimientos (cuadro 7, figura 11 y figuras 17A y C).

CUADRO 7.- Número Eosinófilos/mm² en pulmones de ratones inoculados con 1500 huevos larvados de *Toxocara canis* y sacrificados a diferentes periodos. Este número representa los resultados promedio \pm su desviación estándar, resultados obtenidos del conteo de 5 campos microscópicos seleccionados aleatoriamente.

Eosinófilos			
Días postinoculación	Compartimientos pulmonares		
	AT Cel's/mm ²	APv Cel's/mm ²	APb Cel's/mm ²
5 Tgo	153.4 \pm 110.4*	210.34 \pm 175.7**	157.8 \pm 103.3**
5 Hltc	309.9 \pm 207.6* \diamond	504.06 \pm 216.9** \diamond	658.3 \pm 195.5** \diamond
30 Tgo	165.9 \pm 112.9*	225.1 \pm 93.9**	218.4 \pm 93.9**
30 Hltc	510.4 \pm 399.6* $\diamond\diamond$	699.5 \pm 376.8** $\diamond\diamond$	639.2 \pm 434.4** $\diamond\diamond$
60 Tgo	153.9 \pm 57.8*	162.1 \pm 77.5*	207.7 \pm 83*
60 Hltc	245.6 \pm 90.3* $\diamond\diamond$	365.9 \pm 195.4* $\diamond\diamond$	363.04 \pm 135.06* $\diamond\diamond$

AT = Área tisular

APv = Área perivascular

APb = Área peribronquial

Hltc = Inoculado con huevos larvados de *T. canis*

Tgo = Grupo testigo

Prueba T (entre grupos) * $P < 0.05$ ** No significativo ANOVA (entre áreas) * $P < 0.05$ ** No significativo

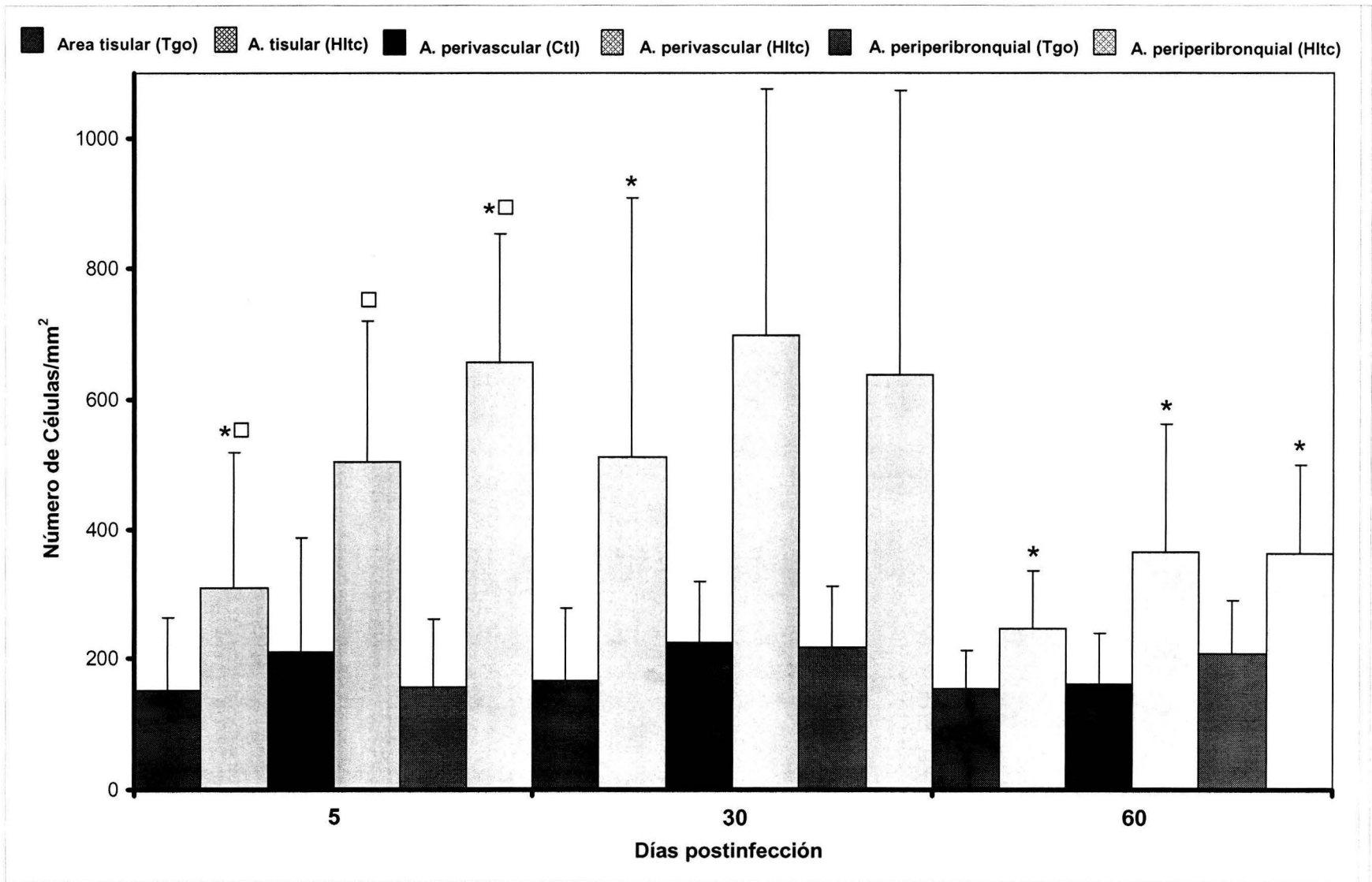
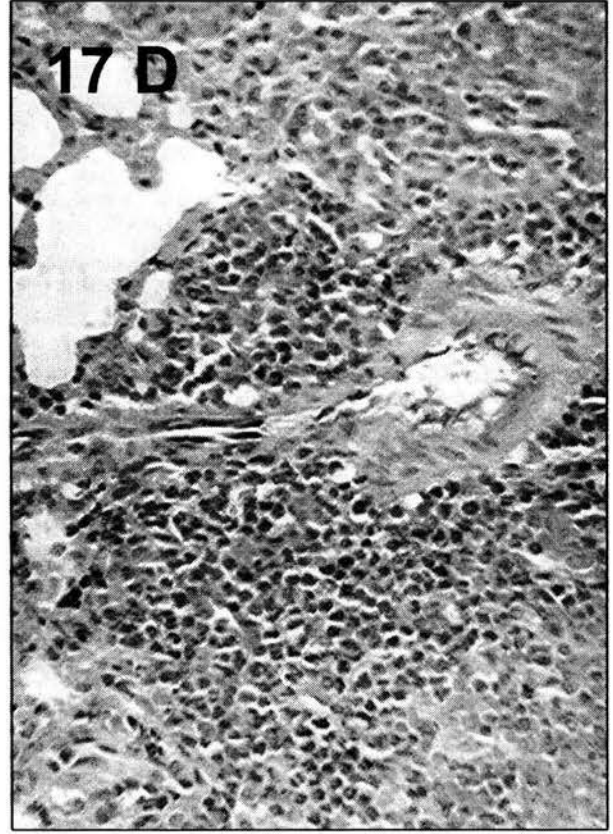
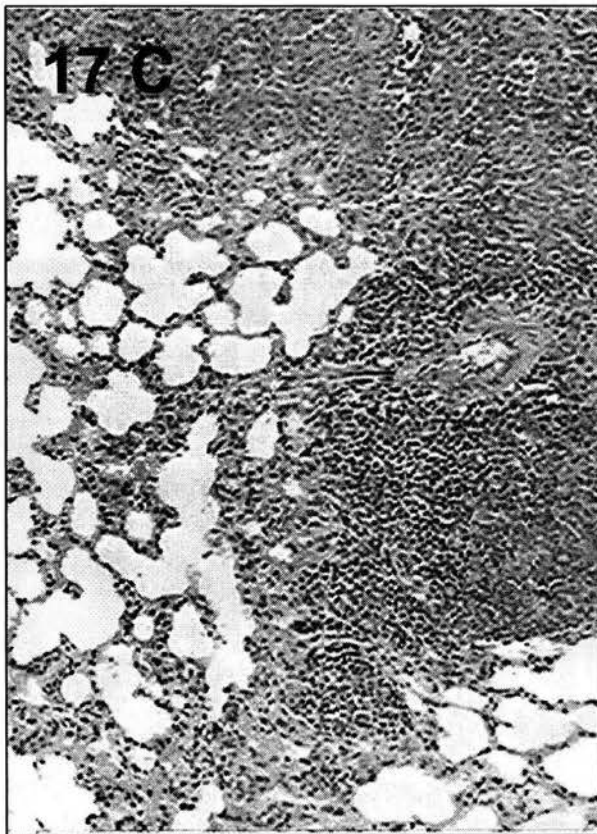
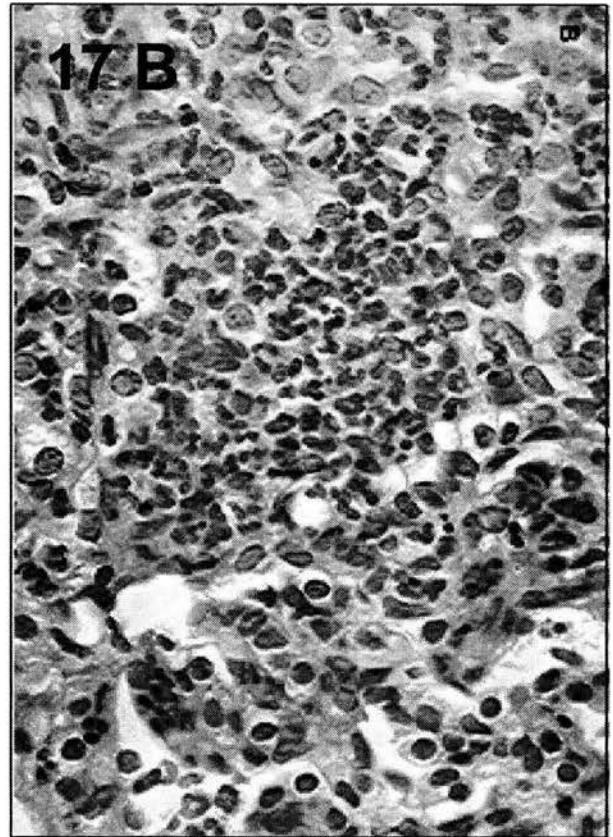
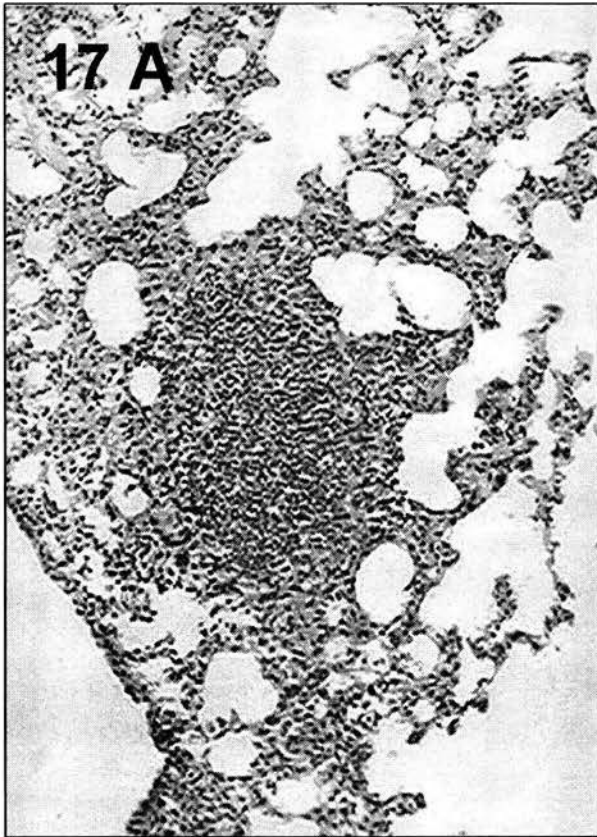


Figura 11.- Promedio de Eosinófilos en pulmones de ratones inoculados con 1500 hltc y sacrificados a diferentes periodos de tiempo (5, 30, 60 días postinoculación). Cada barra corresponde al promedio de las medias de 10 animales \oplus su desviación estandar tomadas de 5 campos microscópicos. Prueba T * $P < 0.05$ y ANOVA $\square P < 0.05$.

Figura 17. Cortes histológicos teñidos con Cromotrope 2R de pulmón de ratones inoculados con 1500 hltc. A) Acercamiento de una área de infiltrado celular constituido principalmente por eosinófilos y macrófagos a nivel intersticial en un animal sacrificado a los 5 días p.i. (100X). B) Se observa un foco de reacción inflamatoria en el área intersticial con eosinófilos evidentes en un animal sacrificado a los 5 días p.i. (400X) C) Sección de pulmón de un animal sacrificado a los 30 días p.i. Se observa una gran zona de infiltrado inflamatorio a base de eosinófilos, que abarca un vaso sanguíneo (100X). D) Se observa una área de infiltrado perivascular constituido por eosinófilos (200X).



12.0 DISCUSIÓN

Las larvas de *Toxocara canis* pueden afectar a un gran número de hospederos paraténicos, entre los que se encuentran los humanos. En estos hospedadores las larvas migran a diferentes órganos, uno de los órganos más afectados es el pulmón.

Se han reportado diferentes alteraciones en pulmón de animales infectados experimentalmente. Entre éstas se encuentran de manera general una inflamación intersticial difusa con presencia de un infiltrado eosinofílico y mononuclear, que ocasiona un engrosamiento de las paredes alveolares; también se ha reportado de manera constante en los cortes histológicos la presencia de múltiples focos granulomatosos con eosinófilos e histiocitos (Zingier y Brockbank, 1974). Más allá de esta zona de células epitelioides hay un infiltrado de leucocitos mejor preservados. Ocasionalmente los nódulos contienen cierto tipo de células gigantes atípicas y están rodeados por una capa concéntrica de fibras de colágeno. En los granulomas iniciales puede encontrarse una larva del segundo estadio, que se puede liberar de la pared que la rodea, esta capacidad que tiene la larva de escapar de la formación de un granuloma y migrar a otra parte e iniciar la formación de otro granuloma ocasiona la formación de grandes parches con infiltrado a base de macrófagos, eosinófilos, neutrófilos y linfocitos (Faust y col., 1981; Glickman y Shofer, 1987; Kayes y col., 1998 Alba, 2000). Además, estas larvas se han asociado a la presencia de asma en humanos (Dosowitz y col., 1994; Buijs y col., 1994; Muñoz-Guzman, 2002).

En un estudio piloto previo al presente trabajo, se reprodujo la enfermedad y se estableció la dosis óptima de inóculo. Dosis de 500 y 1000 hltc por ratón resultaron con alteraciones muy leves en el pulmón, dosis superiores a 2500 hltc produjeron lesiones tan graves que no permitían la observación clara de las estructuras histológicas pulmonares y de las células presentes en lesiones. La dosis de 1500 hltc produce lesiones microscópicas manifiestas en pulmón, pero estas no son tan graves para impedir la adecuada visualización de la anatomía histológica del mismo. Por lo anterior, se decidió utilizar un inóculo de 1500 hltc por ratón.

Los estudios inmunológicos de la toxocariosis, se han limitado al efecto de la infestación sobre las poblaciones celulares circulantes, a la respuesta inmune humoral y a las poblaciones celulares presentes en lavados bronquiales (Maizels y col., 1984; Magnaval y col., 1992; Buijs, y col., 1994). Algunas de las alteraciones más importantes a nivel pulmonar involucran un fuerte componente inmunológico, sin embargo, se conoce muy poco de esta respuesta local.

Para realizar estudios morfométricos se necesita tener áreas bien definidas en los tejidos (compartimientos). Estudios de este tipo en intestino han permitido separar áreas bien definidas dentro del tejido (Vega-López, 1993). En pulmón, los pocos trabajos para determinar las subpoblaciones de células presentes, han sido descriptivos en general y no se han cuantificado áreas específicas (Aldawek y col., 2002). Por lo anterior, de acuerdo a la distribución celular observada, se realizó una división del tejido pulmonar en tres áreas o compartimientos. El primero un área que rodea los vasos sanguíneos, a la que se llamo compartimiento

perivascular, después un área que rodea los bronquios y que se denominó compartimiento peribronquial y por último el tejido presente en las paredes alveolares o espacio alveolar cuando este está infiltrado por células, al que se le denominó compartimiento tisular.

Para este estudio se eligió la evaluación de eosinófilos, células cebadas o mastocitos, células T con un fenotipo CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺, así como células IgA⁺. Lo anterior, debido a que en la actualidad se cuenta con tinciones especiales específicas para evidenciar su presencia y sobre todo por las evidencias que soportan el haber detectado linfocitos T con los fenotipos CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺, en lavados bronquiales y en sangre periférica (Takamoto y col., 1993; Inuo y col., 1995).

El marcador CD3 se encuentra en todos los linfocitos T. El número de células CD3⁺ por mm² de tejido fue mayor en los animales inoculados que en los testigos a los 5 y 30 días p.i., pero fueron menores en los inoculados que en los testigos a los 60 días p.i.. Probablemente el aumento al principio de la infección se deba a la liberación de Ags de secreciones y excreciones por parte de las larvas, puesto que se ha demostrado que tienen actividad mitogénica sobre linfocitos (Wang, 1995). La baja al día 60 probablemente está asociada, como se demostró en otros trabajos a la desaparición de larvas en pulmón durante este periodo (Abo-Shehadeh y Hebert, 1984; Alba, 2000) y por lo tanto la cantidad de Ags secretados es nula.

El marcador CD8 se encuentra en los linfocitos citotóxicos. El número de células CD8⁺ por mm² fue mayor en los animales inoculados que en los testigos a

los 5 días p.i. y bajo paulatinamente a los 30 y 60 días p.i.. Probablemente los linfocitos citotóxicos ocasionan producción de interferón gama, lo que activa la expansión de una respuesta tipo T_H1 y antagoniza el desarrollo de una respuesta T_H2 . Las células con respuesta T_H1 reclutan y activan macrófagos, inducen la producción de citocinas fibrogénicas como el TGF- β , inducen la destrucción del tejido debido a los productos de los macrófagos, ocasionan la formación de granulomas y la proliferación de fibroblastos y depósitos de colágena (Meeusen, 1999). Todos estos efectos se pudieron detectar en los cortes histológicos teñidos con H-E (figuras 18A y B).



Figura 18. Cortes histológicos de pulmón teñidos con Hematoxilina-Eosina de un ratón inoculado con 1500 hltc. y sacrificado a los 30 días p.i. A) En la parte central se observa una lesión granulomatosa, caracterizada por la presencia de fibroblastos, fibras de colágeno, macrófagos y algunos eosinófilos, hacia la parte superior se observa una mayor cantidad de infiltrado eosinofílico; y en la periferia de la lesión se observan fragmentos larvarios cortados transversalmente rodeados por capas de fibrina (100X). B) Acercamiento de la microfotografía anterior, se observa con más detalle, el infiltrado eosinofílico y los fragmentos larvarios rodeados por capas de fibrina (400X).

El marcador CD4 se encuentra en los linfocitos T cooperadores. El número de células CD4⁺ por mm² de tejido pulmonar fue mayor a los 60 días p.i.. Probablemente son responsables de una respuesta T_H2 y producen un panel de citocinas que incluyen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y IL-12 (Mosmann y Coffman, 1989). Lo anterior correlaciona con el aumento de los eosinófilos en pulmón, lo que, como se ha demostrado, es debido a la producción de IL-5 que en su mayoría es producida por linfocitos CD4⁺ de tipo T_H2 (Takamoto y col., 1995; Buijs y col., 1994).

Se observó mayor cantidad de eosinófilos en los pulmones de los animales infectados en comparación con los testigos, pero esta diferencia fue estadísticamente significativa solo al día 60 p.i. El papel que juegan estos eosinófilos en la defensa de las infecciones por helmintos ha generado gran controversia ya que algunos resultados *in vitro* indican que estas células pueden tener un efecto tóxico sobre algunos parásitos, este mismo efecto no se ha podido observar *in vivo* (Mahmoud, 1989; Abbas y col., 1993). En el caso de *T. canis* se ha reportado que la incubación *in vitro* de larvas con poblaciones celulares enriquecidas de eosinófilos y suero hiperinmune provoca la fijación a la cutícula de la larva y la desgranulación de los eosinófilos, pero no afecta ni la movilidad ni la viabilidad de la larva (Fattah y col., 1986), resulta interesante señalar que no se ha podido demostrar que esta desgranulación sea dependiente de IgE (Jones y col., 1994). Por otro lado, se ha demostrado *in vitro* que el mismo efecto se produce cuando se incuban larvas de *T. canis* con neutrófilos (Lombardi y col., 1990).

La presencia de gran cantidad de infiltrados eosinofílicos, más que ser un mecanismo de protección probablemente sea un mecanismo de daño pues los eosinófilos son capaces de producir y secretar mediadores secundarios tales como el factor activador de plaquetas, prostaglandinas y leucotrienos, los cuales pueden ocasionar contracción del músculo liso de bronquios, incremento en la permeabilidad vascular e incremento en la secreción de moco (Snijder en 1985; Evans y col., 1987; Page en 1988; Takamoto y col., 1993; Sane y col., 1997; Meeusen, 1999;). En este contexto, es interesante recordar que se ha asociado la infección por *T. canis* con problemas asmáticos en niños (Muñoz-Guzmán, 2002).

Se observó mayor cantidad de células cebadas en los pulmones de los animales infectados en comparación con los testigos, pero estas diferencias fueron irregulares en los diferentes períodos de sacrificio, lo que probablemente se debe a que muchas células pueden haberse desgranulado en el proceso de migración de las larvas de *T. canis*, ya que se observaron durante el análisis de estas células gránulos positivos a la tinción de Azul de Toluidina, dispersos en el intersticio, sin encontrarse asociados formando pequeños acúmulos, como es común observarlos con esta tinción (figuras 19A y B).

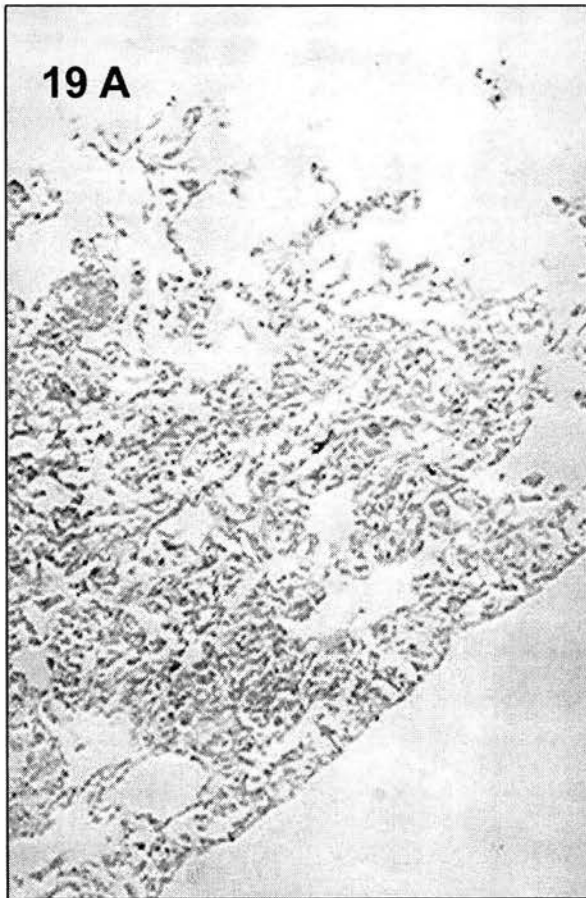


Figura 19. Cortes histológicos teñidos con Azul de Toluidina de pulmón de ratón inoculado con 1500 hltc, sacrificado a los 5 días p.i. A) Se observa una zona de infiltrado celular en el área intersticial y una sola célula cebada (100X). B) Aumento de la microfotografía anterior observando con detalle los gránulos de la célula cebada dispersos formando pequeños grupos no cohesivos, dando la impresión de estar desgranulados (400X).

La concentración de células IgA⁺ fue mayor a los 30 y 60 días p.i. en el tejido peribronquial. Estas células liberarán anticuerpos de la clase IgA a la luz bronquial, por lo que estar cerca seguramente facilita esta labor. Se ha demostrado que la SIgA, antígeno-específica juega un papel muy importante en el control de la colonización microbiana, así mismo se ha demostrado su eficiencia para neutralizar toxinas y facilitar el transporte mucociliar de partículas extrañas que alcanzan las vías respiratorias bajas (Acosta, 1992; Wu, 1997). El papel que juegan en infecciones parasitarias no es claro, pero en parte podría neutralizar los Ags de secreciones y excreciones de *T. canis*.

Estos resultados sugieren que las infecciones ocasionadas por *T. canis* en hospederos paraténicos producen probablemente una respuesta inmune mediada por células T cooperadoras mixta con predominio de las células de tipo T_H1, ya que en la fase aguda de la infección se observó destrucción tisular probablemente debido a los productos liberados por los macrófagos, los cuales ocasionan formación de granulomas, proliferación de fibroblastos y depósitos de colágena, sin embargo, se observa un abundante infiltrado eosinófilico y mayor cantidad de mastocitos en los animales experimentales que en los testigo; y en la fase crónica y de reparación (30 y 60 días p.i.) se monta una respuesta con predominio de las células de tipo T_H2, debido a que se sigue manteniendo el predominio del infiltrado eosinofílico y de células cebadas con una disminución en la cantidad del infiltrado granulomatoso. Lo anterior, solo se puede comprobar si se mide la producción de citocinas presentes en las diferentes etapas de la infección. Para evaluar una

respuesta tipo T_H1 se tendrían que medir: $INF\gamma$, $TNF\alpha$ e IL-12 y para evaluar una respuesta tipo T_H2 se tendrían que medir IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10.

Los resultados en este trabajo demostraron que los tipos celulares varían en relación al tiempo después de la infección con larvas de *T. canis*. Los cambios celulares observados en el tejido pulmonar se relacionan directamente con el número de larvas encontradas en el órgano al momento del muestreo. Alba en el 2000 encontró que el pico de las larvas presentes en pulmones de jerbos infectados experimentalmente era mayor a los tres días p.i. disminuyendo a partir de este día hasta el día 60 p.i., esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo; pues el número de células que intervienen en la respuesta inmune en contra de *T. canis* fue mayor al día 5 p.i, posteriormente hacia el día 30 p.i. el número de células encontradas en los animales inoculados siguió una tendencia a la baja en comparación con el grupo testigo hasta llegar a ser muy parecido en ambos grupos al día p.i.. Esto puede ser explicado por el hecho de que las larvas a partir del día 5 p.i. presentan una mayor tasa de dispersión a diferentes órganos, como si las larvas estuvieran buscando un lugar adecuado para sobrevivir, aunado a esto, a partir de los días 10 al 60 ocurre una redistribución de las larvas en el organismo, mostrando una tendencia de migración hacia cerebro y carcaza en los jerbos inoculados.

Se puede concluir que el ratón es un buen modelo de estudio para la migración de *T. canis* en hospederos paraténico, pues en el presente trabajo se encontraron fragmentos larvarios a diferentes periodos p.i, por otro lado algunos

investigadores como Oshima en 1961 y Abo-Shelada y col., en 19984 han utilizado este modelo para estudiar las técnicas de infección con hltc y valorar los patrones de migración larvaria de *T. canis* , encontrando resultados similares a los encontrados accidentalmente en humanos.

Los resultados del trabajo sugieren, que la respuesta inmune que se monta en ratones, en contra de las larvas de *T. canis* es una respuesta que no tiene naturaleza protectora, debido a que no se encuentran indicios de larvas destruidas por esta respuesta, aunado a esto el hecho de que las larvas presenten una tendencia a la redistribución dentro del organismo y que cuenten con mecanismos de inmunoevasión altamente eficientes como lo son los antígenos de secreción, nos hace pensar que la respuesta inmune, más que proteger, genera alteraciones de la respuesta inmune que modifica la forma en la que reacciona a otros antígenos, lo cual podría producir fenómenos de hiperreactividad dentro del pulmón contra antígenos que estuvieran presentes en el momento de dicha modificación

14.0. CONCLUSIONES

- ❖ El efecto de la infección por larvas de *Toxocara canis* en las células que intervienen en la respuesta inmune en pulmones de ratones infectados experimentalmente, ocasiona que las células se establezcan en los siguientes compartimientos:
 - a) Compartimiento perivascular.
 - b) Compartimiento peribronquial.
 - c) Compartimiento intersticial.

- ❖ De los compartimientos pulmonares analizados, los que mostraron tener mayor número de células asociadas, fueron el compartimiento perivascular y peribronquial en relación al compartimiento intersticial, mostrando ser diferentes estadísticamente.

- ❖ Las células CD3⁺ aumentan su número en la fase aguda (5 días p.i.) del padecimiento y disminuyen paulatinamente hacia la fase crónica y de reparación (30 y 60 días respectivamente).

- ❖ Las células CD8⁺, aumentan en la fase inicial de la enfermedad y posteriormente disminuye su número conforme evoluciona el padecimiento hacia la fase crónica y posteriormente de reparación.

- ❖ Las células CD4⁺, se encontraron disminuidas en las primeras dos fases del padecimiento (etapa aguda y crónica) y se encontraron aumentadas hacia la fase final del experimento en la etapa de reparación, mostrando diferencias significativas solo en este periodo.

- ❖ Los eosinófilos presentaron una mayor densidad celular durante los dos primeros periodos del experimento, el número de células presente en la etapa de reparación mostraron tener diferencias estadísticamente significativas, lo que correlacionó con las diferencias observadas con las células CD4⁺.
- ❖ Las células cebadas presentaron diferencias irregulares durante las diferentes etapas del padecimiento, sin embargo, el número de células observadas en los animales de los grupos experimentales fue mayor que en los animales de los grupos control.
- ❖ Las células IgA⁺ aumentaron en los dos últimos periodos de sacrificio (etapa de conicidad y reparación) solamente a nivel bronquial, muy probablemente para poder realizar la secreción de IgA en la luz bronquial.

15.0 BIBLIOGRAFIA.

- Abbas, A. K., Litchman, A. H. y J. S.: Cellular and molecular immunology. Ed. W. B. Saunders Company. USA, 1995.
- Abo-Shelada, M.N. y Herbert, I.V.: The migration of larval *Toxocara canis* in mice II post-intestinal migration in primary infections. *Vet. Parasitol.* 1988;17: 75-83.
- Acosta Altamirano, Gustavo y Cruz López Miguel.: *Inmunología de las mucosas*, 1ª Ed., Distribuidora y Editora Mexicana, 1992.
- Agnihotri, R.K.; Bathia, B.B. y Kumar, D.: Visceral larva migrans. I. Migratory behaviour of *Toxocara canis* larvae in golden hamster and chicken. *Ind. J. Ann. Sc.* 1987;57 (8): 853-855
- Aldawek, Ahmed M., Levkut, M., Revajova, V., Kolodzieyski, L., Seveiková, Z. and Dubinský, P.: Larval toxocarosis in shepp: The immunohistochemical characterization of lesions in some affected organs. *Vet. Parasitol.* 2002;105: 207-214.
- Alba, H. F.: evaluación de un modelo de toxocariosis ocular y sistémica empleando jerbos (*Meriones unguiculatus*). Tesis de Doctorado. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM 1999.
- Alba, H. F.; Tórtora, P. J. L.; Tsutsumi, V. y Ortega Pierres, M. G.: Histopathological investigation of experimental ocular toxocarosis in gerbils. *Int. J. Parasitol.* 2000;30 (2): 143-147.

- Alatorre, H. F. L.: Estudio histopatológico de las lesiones causadas por larvas de *Toxocara canis* en ojos de jerbo (*Meriones unguiculatus*). Tesis de licenciatura. FES-Cuautitlan UNAM 1997.
- Asao, N., Takayanagi, T. H., Tsukidate, S. and Fujita, K.: Ocular larva migrans caused by *Toxocara cati* in Mongolian Gerbils and a comparison of ophthalmologic findings with those produced by *T. canis*. J. Parasitol. 2000;86(5): 1133-1135.
- Beaver, Paul C.: The nature of visceral larva migrans. J. Parasitol. 1969;55: 3-12.
- Buijs, I., Lokhort, W. H., Robinsosn, J and Nijkamp, F. P.: *Toxocara canis*-induced murine pulmonary inflammation: analysis of cells and proteins in lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid. Parasite Immunol. 1994;16:1-9.
- Crapo, James D., Harmsen, Allen D., Sherman, Michel P., and Musson, Robert A.: Pulmonary immunobiology and inflammation in pulmonary diseases. Am J Respir Crit Care Med ., 2000;Vol 162:1983-1986.
- Del Prete, G., Maggi E. and Parrochi, P.: IL-4 is an essential factor for the IgE síntesis *in vitro* by human T cells clones and supernatants. J. Immunol. 1988;140:4193-4198.
- Else, K. J., Finkelman, F. D., Maliszewski, C. R. and Grencis, R. K.: Cytokine-mediated regulation of cronical intestinal helminth infection. J. Exp. Med. 1994; Vol. 179: 243-245.
- Faust, E. C., Russell, P. F. y Jung, R. C.: Parasitología Clínica. 1ª Edición, SALVAT EDITORES; México (1981).

- Fojtasek, Marvin F.; Sherman, Marcie R.; Garringer, Todd; Wheat, L. Joseph and Schnizlein-Bick: Local immunity in lung-associated lymph nodes in a murine model of pulmonary histoplasmosis.: *Infect Immun.* 1993;Vol 61 No.11:4607-4614,
- García Reina, P. B.: Efecto de la infección experimental con *Trichinella spiralis* sobre las poblaciones celulares del sistema inmune intestinal porcino. Tesis de Maestria. FES-Cuautitlan UNAM 1997.
- Glickman, L. T. and Shofer, F. S.: Zoonotic visceral and ocular larva migrans. *Vet. Clinics of North Ame. small Anim. Pract.* 1987;17(1):39-53.
- Glueglio, B.; de Gentile, L; Nguyen, J. M.; Achard, J.; Chabasse, D. and Marjolet, M.: Epidemiologic approach to human toxocariosis in western France. *Parasitol Res.* 80 (6):531-536
- Georgi, J. R. y Georgi, M. E.: *Parasitology for Veterinarians.* W. B. SAUNDERS C COMPANY, 1990.
- Harbeck, Ronald J.; Immunophenotyping of bronchoalveolar lavage lymphocytes. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* Vol. 5 No. 3, pp 271-277.
- Holland, C. V., O'Lorcain, P., Taylor, M. R. H. and Kelly, A.: Sero-epidemiology of toxocariasis in school children. *Parasit. Immunol.*, 1995;110: 535-545
- Inuo, G., Akao, N., Kohsaka, H., Saito, I and Fujita, K.: *Toxocara canis* adult worm antigen induces proliferative response of helty human peripheral bloo mononuclear cells. *Parasite Immunol.* 1995;17:77-84.
- Iwata, M. and Sato, A. : Morphological and immunohistochemical studies of the lungs and bronchus-associated lymphoid tissue in a rat model of chronic

- pulmonary infection with *Pseudomona aeruginosa*. *Infect. Immun.* 1991; 59 (4): 1514–1520
- Kayes, S. G., Jones, R. E. y Paul, E. O.: Pulmonary granuloma formation in murine toxocariasis: Transfer granulomatous hypersensitivity using bronchoalveolar lavage cells. *J. Parasitol.* 1988;74 (6): 950-956.
- Kusama, Y., Takamoto, M., and Sugane, K.: Mechanisms of eosinophilia in BALB/c-nu/+ and congenitally athymic BALB/c-nu/nu mice infected with *Toxocara canis*. *Immunol.* 1995; 84: 461-468.
- Jones, R. E., Finkelman, F. R., Hester, R.B. y Kayes, S.G.: *Toxocara canis*: Failure to find IgE receptors (FcεR) on eosinophils from infected mice suggest that murine eosinophils do not kill helminth larvae by an IgE-dependent mechanism. *Exp. Parasitol.* 1994;78:64-75.
- Lokman, Hakin, S., Thadasavanth, M., Raden Shamilah, R. H. and Yogeswari, S.: Prevalence of *Toxocara canis* antibody among children with bronchial asthma in Klang hospital, Malaysia. *Transactions of the Royal society of tropical medicine and hygiene.* 1997;91: 528-531.
- Lombardi, S., Vegni-Talluri, M., Banchieri, L. y Esposito, F.: The in vitro adherence of eosinophils, neutrophils and non-induced and induced macrophages to infective larvae of *Toxocara canis*. 1990;20:603-613.
- Luna, G. L.: *Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology.* Tenth edition. Ed. McGraw-hill, Inc. USA. 1968.

- Lendrum, AC. The staining of eosinophil polymorphs and enterochromaffin cells in histological sections. *J Pathol. Bacteriol.* 56: 441-442, 1944.
- Mahmoud, A. A. F.: Parasitic Protozoa and helminthes: biological and immunological challenges. *Science*;246:1015-1022.
- Márquez, Maria G., Sosa, Gustavo A. and Roux , Maria E.: Development of study cells in the Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) from wistar rats. *Dev. Comp. Immunol.* 2000;24:683-689.
- Maruyama, S.; Yamamoto, K. y Katsube, Y.: Infectivity of *Toxocara canis* larvae from Japanese quail in mice. *J. Vet. Med. Sci.*, 1994;56 (2): 399-401.
- MagnaVal, J. F., Fabre, R., Charlet, J. P. y De Larrard, B.: Evaluation immunoenzymatic assay detecting specific Anti-*Toxocara* Inmunoglobulin E for diagnosis and posttreatment follow-up of human toxocariasis. *J. Clin. Microb.* 1992; 30 (9):2269-2274.
- MagnaVal, J. F.: Comparative Efficacy of diethylcarbamazine and mebendazole for treatment of human toxocariasis. *Parasitol.* 1995;110: 520-533,.
- Meeusen, E. N. T.: Immunology of helminth infections, with special reference to immunopatology. *Vet. Parasitol.* 1999; 84: 256-273.
- Mosmann, M. T. , y Coffman, R. L.: TH1 and TH2 cells:different patterns of lymphokine secretion lead to diferente functional properties. *Ann. Rev. Immunol.* 1989;7:145-173.
- Nakamura, S.; Sotoyama, T.; Hayasaka, S.; Kameyama, Y.; Maruyama, S. yKatsube, Y.: Parasitism of *Toxocara canis* larvae in Japanese quail by inoculation of the ascarid eggs. *J. Vet. Med. Sci.* 1991;53 (5): 865-872.

- Oshima, T.: Standarización of techniques for infecting mice with *Toxocara canis* and observations on normal migration routes of the larva. J. Parasitol. 1961;47:652-656.
- Olson, L.J. y Rose, J.E.: Effect of *Toxocara canis* infection on the ability of white rats to solve maze problems. Exp. Parasitol. 1966;19:77-88.
- Ogra, P. L.; Mestecky, J.; Lamm, M. E.; Bienestock, J. and McGhee, J. R.: Mucosal immunology. 2nd ed. Edit. Academic Press, USA 1999.
- Owhashi, M., Arita, H. and Niwa, A.: Production of eosinophilic chemotactic factor by CD8⁺ T-cells in *Toxocara canis*-infected mice. Parasitol. Res. 1998;84:136-138.
- Paul, William E.: fundamental immunology 4th ed. Edit. Lippincott Williams y Wilkins, 1998.
- Pearce, E. J. and MacDonald, A. S.: The immunobiology of schistosomiasis. Nature Rev. Immunol. 2002;2:495-511.
- Pritchard, D. I.; Hewitt, C. and Moqbel, R.: The relationship between immunological responsiveness controlled by T-helpers 2 lymphocytes and infections with parasitic helminths. Parasitol. 1997;115,S33-S44.
- Quiroz, R. H.: Parasitología y enfermedades de los animales domésticos. 1^a Edición. Edit. LIMUSA, México 1984.
- Romagnani, S.: Regulation and deregulation of human IgE synthesis. Immunol. Today 1990;11:316-321.

- Sane, Aneysa C. y Barber, Brent A.: Pulmonary nodules due to *Toxocara canis* infection in an Immunocompetent adult. Southern Medical Journal, 1997; 90(1):78-82
- Schantz, O. M., and Stehr-Green, J. K.: Toxocaral larva migrans. JAVMA 1988;192: 28:31
- Soulsby, E. J. L.: Immune responses in parasitic infections: Immunology, immunopathology and immunoprophylaxis. Vol. I. Nematodos. CRC Press. Inc. USA. (1987).
- Stevenson, P. y Jacobs, D.E.: *Toxocara* infection in pigs. The use of indirect fluorescent antibody test and an in vitro larval precipitate test for detecting specific antibodies. J. Parasitol. 1977;51(2):149-154.
- Sue-Chu, Malcom., Karjalainen, Eeva., Altraja, Alan., Larsson, Lars and Bjermer, Leif.: Lymphoid Aggregates in Endobronchial Biopsias from Young Elite Cross-country Skiers. Am J Resp Crit Care Med 1998;158:597-601.
- Takafumi, Suda; Kingo, Chida; Hayakawua, Hiroshi; Imokawua, Shiro; Iwata, Masatoshi; Nakamura, Hirotoshi and Sato, Atsuhiko.: Development of bronchus-associated lymphoid tissue in chronic hypersensitivity Pneumonitis. Chest. 1999 115:357-363 .
- Takamoto, M., and Sugane, K.: Mechanisms of eosinophilia in *Toxocara canis* infected mice: *In vitro* production of interleukin 5 bay lung cells of both normal and congenitally atymic nude mice. Parasite Immunol, 1993;15:493-500
- Takamoto, M., Kusama, Y., Katusa, K and Sugane, K.: Ocurrance of interleukin-5 production by CD4⁻ CD8⁻ (double negative) T cells in lungs of both normal an

- congenitally athymic nude mice infected with *Toxocara canis*. Immunol 1995;85:285-291.
- Tatsuaki, M., Ishikawua, J. and Yamada, T.: Antigens dose T helper 2 response in the lungs of C57BL/6 and BALB/c mice independently of splenic responses. Immunol. Let. 2000;72:119-126.
- Tomimura, T.; Yokota, M. y Takiguchi, M.: Experimental visceral larva migrans in monkey I. Clinical, hematological, biochemical and gross pathological observations on monkeys inoculated with embryonated eggs of the dog ascarid, *Toxocara canis*. Jpn. J. Vet. Sci. 1976; 38: 533-544.
- Vázquez, O., Campos, T., López, N., Martínez, I. y Romero, R.: Neumonía eosinofílica secundaria a *larva migrans visceral* en un niño. Rev. Mex. Patol. Clin. 2001;(3):56-160
- Uyama, T., Sakiyama S. Taquehisa, Y., Tamaki, M., Hino, H: Bronchus-associated lymphoid tissue is target and damage by recipient lymphocytes in long-term-surviving rat lung allograft. Tansplantation proceedings, 1997;29:2617-2618).
- Vega-Lopez, M. A., Telemo, E., Bayle, M., Stevens, K. and Stokes, C.R.: Immune cell distribution in the small intestine of the pig: Immunological evidence for an organized compartamentalisation in the lamina propria. Vet. Immunol. Immunopathol. 1993;37:49-60.
- Wang, M. Q., Jiang, H. J., Inohue, H., Myosaki, M. and Yamashita, U.: B cell mitogenic activity of *Toxocara canis* adult worm antigen. Parasit. Immunol. 1995;17:609-615

Wayne, W., Daniel.: Bioestadística. Bases para el análisis de ciencias de la salud.

1ª Edición. Edit. LIMUSA. México 1982.

Wu, H. Y., Russel M.W.: Nasal lymphoid tissue, immunization, and compartmentalization of the common mucosal immune system. *Immunol Res* 1997;16:187-201.

Zyngier, F. R. and Brockbank, A.: Electron microscopy of the lung in experimental *Toxocara canis* infection. *Annals of Trop. Med. And Parasitol.* 1974;68(2): 229-23

APENDICE I

SOLUCIONES PARA INMUNOHISTOQUIMICA

Sol. de Bloqueo de Peroxidasa Endógena PBS:Metanol (50:50) con 0.3 % de H₂O₂

Metanol absoluto	50 ml
PBS	50 ml
H ₂ O ₂	300µl

TRIS-HCl (0.05M pH 7.6)

Tris base	6.1g
HCl (IN)	37 ml
H ₂ O destilada c.b.p.	1000 ml

SOL. DIAMINOBENCIDINA

3,3' -Diarninobenzidine [3,3',4,4'Tetraaminobiphenyl]	5 mg
Tris-HCl (0.05M)	10 ml
Peróxido de Hidrógeno (H ₂ O ₂)	5µl

Agregar el H₂O₂ al momento de usarse y filtrar en membrana de 0.22 µm antes de su uso.

PBS (0.1M pH 7.2-7.4) 10X

Cloruro de sodio (NaCl)	80 g
Fosfato de sodio (Na ₂ HPO ₄)	11.5 g
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	2 g
H ₂ O destilada c.b.p.	1000 ml

APENDICE II

TINCIONES ESPECIALES

Carbol cromotropo para eosinófilos

Método

- Desparafinar en xilol (tres cambios durante 3 minutos cada uno)
- Hidratar la muestra mediante pases en alcoholes de diferente concentración
- (100°, 96°, 80°, y 70°) durante 3 minutos en cada uno.
- Lavar con agua.
- Teñir los núcleos con hematoxilina de Mayer's.
- Teñir con la solución de carbol cromotropo durante 30 minutos.
- Lavar con agua para eliminar el exceso de colorante.
- Deshidratar, aclarar y montar las muestras.

Resultados

- Gránulos de eosinófilos Rojo.
- Glóbulos rojos Rojo pálido.
- Núcleos Azul.

Solución de carbol cromotropo

- Fundir 1 g de fenol en un recipiente a baño María.
- Adicionar 0.5 g de carbol cromotropo 2R.
- Mezclar y disolver en 100 ml de agua destilada

