

11661



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN

EVALUACIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE ALGUNAS POBLACIONES  
CELULARES PRESENTES EN BAZO, TIMO Y SANGRE DE RATONES DE LA  
CEPA Balb/C INFECTADOS CON L2 DE *Toxocara canis*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN MICROBIOLOGÍA

P R E S E N T A :

M. V. Z. LETICIA FLORES ALATORRE  
HERNÁNDEZ

DIRECTOR: DR. FERNANDO ALBA HURTADO

COORDIRECTOR: DR. JORGE REYES ESPARZA

m. 345251



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.

## INDICE

DEDICATORIAS.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
RESUMEN.....	V
ABSTRACT.....	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 TOXOCARIOSIS.....	1
1.1.1 DEFINICIÓN.....	1
1.1.2 ETIOLOGÍA.....	1
1.1.3 CICLO BIOLÓGICO.....	2
1.1.4 EPIDEMIOLOGÍA.....	4
1.1.5 SEMIOLOGÍA.....	5
1.1.6 IMPORTANCIA MÉDICA.....	5
1.1.7 LARVA MIGRANS VISCERAL.....	6
1.1.8 LARVA MIGRANS OCULAR.....	8
1.1.9 LESIONES NEURONALES.....	9
1.1.10 RESPUESTA INMUNE.....	9
1.2 CELULAS INMUNES.....	14
1.2.1 LOS LINFOCITOS.....	15
1.2.1.1 LINFOCITOS T.....	16
1.2.1.2 LINFOCITOS B.....	17
1.2.2 EOSINÓFILOS.....	18
1.3 CITOMETRÍA DE FLUJO.....	19
1.3.1 HISTORIA.....	19
1.3.2 FUNDAMENTO.....	19
1.3.3 SORTING O CLASIFICADOR.....	20
1.3.4 RAYO LASER Y FLUOROCROMOS.....	23
1.3.5 ANALISIS MULTICOLOR.....	23
1.3.6 MARCAJE CON FLUOROCROMOS.....	23
1.3.7 INTERPRETACIÓN Y ANALISIS DE DATOS.....	24
1.3.8 APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO.....	24
2. HIPOTESIS.....	25
3. JUSTIFICACIÓN.....	26
4. OBJETIVO.....	27
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
5.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	28
5.2 OBTENCIÓN Y CULTIVO DE HUEVOS.....	28
5.3 INFECCIÓN EXPERIMENTAL.....	28
5.4 OBTENCIÓN Y TINCIÓN DE CÉLULAS.....	29
5.5 CONJUGADOS PARA TINCIÓN.....	30
5.6 LECTURA EN EL CITÓMETRO DE FLUJO.....	30
5.7 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	30
5.8 ANALISIS ESTADÍSTICO.....	31
6. RESULTADOS.....	32
6.1 SANGRE.....	32
6.2 TIMO.....	33
6.3 BAZO.....	34
7. DISCUSIÓN.....	57

<b>8. CONCLUSIONES.</b> .....	62
ANEXOS. ....	63
ABREVIATURAS. ....	64
LISTA DE FIGURAS. ....	65
LISTA DE CUADROS. ....	66
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.</b> .....	67

DEDICATORIAS:

A MIS HIJOS ILSE Y YAIR.

LOS AMO.

"SOLO LE PIDO A DIOS  
QUE EL DOLOR NO ME SEA INDIFERENTE,  
QUE LA RESECA MUERTE NO ME ENCUENTRE  
VACÍA Y SOLA SIN HABER HECHO LO SUFICIENTE"

## AGRADECIMIENTOS

AGRADEZCO INFINITAMENTE A QUIENES CON SU APOYO INCONDICIONAL PARTICIPARON PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.

- UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
  - DR. FERNANDO ALBA HURTADO
- LABORATORIO DE INMUNOMODULADORES DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
  - DR JORGE REYES ESPARZA
- CONACyT POR LA BECA OTORGADA.
- BIOTERIO, UNIDAD DE MEDICINA EXPERIMENTAL, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
  - MVZ. DANIEL SÁNCHEZ ALMARAZ
  - DR. RUY PEREZ TAMAYO
- BIOTERIO, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
  - DR. ATONATIHU GÓMEZ
- JURADO DESIGNADO
  - DR. HECTOR QUIROZ ROMERO
  - DR GARY GARCÍA ESPINOZA
  - DR ANDRÉS ROMERO ROJAS
  - DR JORGE TORTORA PÉREZ
  - DR FERNANDO ALBA HURTADO
- CENTRO NACIONAL DE DIAGNÓSTICO EN SALUD ANIMAL CENASA
  - MVZ JOAQUÍN DELGADILLO ALVAREZ
- UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE TECÁMAC
  - A MI FAMILIA LABORAL
- CENTRO DE CONTROL CANINO DE COACALCO
- CENTRO DE CONTROL CANINO DE TECÁMAC
- CENTRO DE CONTROL CANINO DE CUAUTITLÁN
- A MI ESPOSO, FAMILIA Y AMIGOS

## RESUMEN

Se evaluaron variaciones en poblaciones leucocitarias, inducidas por la infección con larvas de *Toxocara canis*, de sangre, timo y bazo en ratón cepa Balb/C. Se utilizaron 120 ratones machos de 7 a 9 semanas de edad, los animales se dividieron en 3 grupos; el grupo 1 (48 ratones) se inoculó con 500 huevos larvados de *T. canis* (hITc). El grupo 2 (48 ratones) se inoculó con 2500 hITc y el grupo 3 (24 ratones) solo recibió SSF (grupo testigo). Se sacrificaron 6 ratones de cada grupo experimental y 3 del grupo testigo a diferentes periodos (1, 3, 5, 7, 15, 30, 60 y 100 días) post-inoculación (pi). Se obtuvo sangre, timo y bazo, las células se disgregaron y se tiñeron con anticuerpos monoclonales marcados (anti-CD3+, CD4+, CD8+, CD19 y CD23+), se contaron en un citómetro de flujo 10,000 células de cada muestra y se obtuvo el porcentaje de células marcadas por los anticuerpos en cada órgano muestreado.

La inoculación de hITc indujo cambios en la proporción de leucocitos sanguíneos; se pudo observar una linfocitosis a los días 5 y 7 pi. El día 5 aumentó la proporción de linfocitos T totales y el día 7 aumentó la proporción de los linfocitos B. La proporción de linfocitos CD4+ aumentó los días 5 y 7 pi. El día 15 pi bajaron los niveles de CD4+ y aumentaron los niveles de CD8+. El día 60 pi bajaron los niveles de CD8+ y aumentaron los niveles de CD4+. El día 100 aumentaron las proporciones de CD8+ y bajaron las de CD4+. En la fase aguda (5 a 7 días) aumentaron los CD4+ y los eosinófilos (CD23).

En bazo, la proporción de linfocitos CD8+ aumentó el día 15 pi en los animales inoculados, y paulatinamente bajó al día 60 pi. La inoculación de hITc produjo un aumento en el porcentaje de eosinófilos. Se detectó un aumento de los diferentes tipos de linfocitos en estudio entre los días 5 y 7 pi.

Los linfocitos T en timo disminuyeron los días 5 y 7, se mostró un aumento de linfocitos B entre los días 5 a 7 y dos picos de aumento de eosinófilos los días 7 y 30 pi. Así, los resultados del presente estudio demuestran que *T. canis* induce modificaciones de las subpoblaciones leucocitarias.

**PALABRAS CLAVE:** *Toxocara canis*, Citometría de Flujo, Inmunidad

## ABSTRACT

Variations in leukocitary populations were evaluated, induced by the infection with larva of *Toxocara canis*, from blood, thymus and spleen in mouse. One hundred and twenty male mice of about 7 to 9 weeks were used, the mice were divided into three groups; group 1 (48) was inoculated with 500 larva eggs of *T. canis* (hITc). Group 2 (48) were inoculated with 2500 hITc and group 3 (24) received only SSF (witness group). Six mice from every experimental group were sacrificed and 3 from the witness group in different periods (1,3,5,7,15,30,60 and 100 days) post-inoculation (pi). Samples of blood, thymus and bladder were taken, desegregated cells were obtained and dyed with monoclonal antibodies marked (anti-CD3+, CD4+, CD8+, CD19 and CD23+); 10,000 cells from each sample were counted with a cytometer and the percentage of cells marked by the antibodies was obtained for each sampled organ.

Inoculation of hITc induced changes in blood leukocyte rate; a lymphocytosis was observed on days 5 and 7 pi. On the 5<sup>th</sup> day T lymphocytes rate increased and so did B lymphocytes on the 7<sup>th</sup> day. CD4+ lymphocytes rate increased on days 5 and 7 pi. On the 15<sup>th</sup> day pi CD4+ levels lowed and CD8+ levels increased. On day 60 pi CD8+ levels lowed and CD4+ levels increased. On day 100 CD8+ rate increased and CD4+ lowed. In the acute phase (5-7 days) CD4+ levels increased, and eosinophyle (CD23).

About spleen, CD8+ lymphocyte increased on day 15 pi on inoculated animals, and gradually lowed on day 60 pi. Inoculation by hITc produced an increase in the percentage of eosinophyle. An increase of the different type of lymphocyte in study was detected between days 5 and 7 pi.

Lymphocyte T in thymus diminished on days 5 and 7, An increase on Lymphocyte B was shown between days 5 and 7 and two increase picks of eosinophyle on days 7 and 30 pi.

Thus, the results of this study show than *T. canis* induces modifications on leukocitary populations.

KEY WORDS: *Toxocara canis*, Flow citometry, Immunity



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 TOXOCARIOSIS

### 1.1.1 DEFINICIÓN

La toxocariosis es una enfermedad producida por la presencia y acción de nematodos del género *Toxocara*, principalmente *Toxocara canis* (Alba, 1994; Beaver, 1986; Blood, 1986, Quiroz, 2000).

### 1.1.2 ETIOLOGÍA.

En perros y gatos se presentan tres especies de nematodos, *Toxocara canis*, *Toxocara cati* y *Toxascaris leonina*, la más importante de las tres es *T. canis*, no solamente porque los adultos pueden causar infecciones fatales en cachorros, sino porque sus larvas pueden infectar al hombre. Estas especies de nematodos se encuentran también en carnívoros salvajes, llegan a ellos por ingestión de otros animales infectados con larvas presentes en sus tejidos. Estudios moleculares recientes muestran similitudes filogenéticas entre la superfamilia Ascaridoidea con la superfamilia Spiruridoidea, a la que pertenecen las filarias. El tamaño del genoma de *T. canis* no se conoce aún, pero se presume que es similar al de *Ascaris*, con el que tiene una relación taxonómica muy cercana, este último tiene un genoma de alrededor de  $3 \times 10^9$  pares de bases (Maizels *et al.*, 2000).

Los gusanos adultos son nematodos de color blanco, los machos miden de 4 a 10 cm de longitud y las hembras hasta 18 cm. En la parte anterior como otros ascaroideos presenta tres labios bien desarrollados, uno dorsal y dos subventrales provistos de dos papilas. En la parte externa a la altura del esófago presenta dos aletas cervicales que le dan el aspecto de punta de flecha. El extremo posterior del macho termina curvado hacia la parte ventral, presenta dos pequeñas espículas iguales y un estrechamiento terminal en forma de apéndice. En las hembras la vulva se abre en la región media del cuerpo. Las hembras son

ovíparas y producen una gran cantidad de huevos no embrionados en el momento de la puesta (Alba, 2004).

### 1.1.3 CICLO BIOLÓGICO.

La hembra de *T. canis* produce huevos que son eliminados con las heces del animal infectado, bajo condiciones adecuadas de temperatura y humedad se desarrolla dentro del huevo la larva 1, luego muda a larva 2, esta última es la fase infectante para hospederos finales o paraténicos. A temperatura de 12 a 18°C, los huevos presentan larvas a los 54 días, pero en un rango de 25 a 30 °C, el tiempo se acorta hasta los 14 días. Los huevos infestantes sobreviven bajo condiciones óptimas hasta 1 año, si estos se mantienen a temperatura ambiente, la infectividad decrece significativamente a las 10 semanas, por lo que los huevos embrionados de más de 3 meses ya no deben ser utilizados para la investigación. Un experimento realizado en Taiwán demostró que los huevos embrionados que se han mantenido a 4°C en solución de formalina al 2% durante 14 meses son capaces de causar graves lesiones en diferentes tejidos de ratón (Kwung & Yun-Ho, 2003).

Para continuar el ciclo, los huevos con larva 2 deben ser ingeridos por perros o zorros, que son el hospedero definitivo; los huevos ingeridos se abren por efecto del jugo gástrico y la larva emerge, pasa al intestino delgado, donde atraviesa la pared y pasa a los vasos sanguíneos del sistema porta. El destino de las larvas depende de la edad y el sexo del animal infectado. En animales adultos, la larva tiende a viajar a través de los tejidos del hospedero por largos periodos hasta que se enquista en diferentes órganos. Si el huésped es una hembra gestante, los cambios en el balance hormonal posiblemente disminuyan la respuesta inmune resultando en la reactivación de las larvas enquistadas, que pasan a través de la placenta y llegan a la circulación fetal, eventualmente llegan a los pulmones del feto, donde completan su ciclo de desarrollo; de esta forma, los cachorros recién nacidos pueden presentar infección por *T. canis* desde el nacimiento y eliminar huevos a partir de la tercera semana de edad. Los

cachorros también se pueden infectar por la leche a la hora del amamantamiento (Olsen, 1974; Soulsby, 1982).

En cachorros menores a tres meses de edad, las larvas abandonan los capilares pulmonares, penetran en los alvéolos y migran por las vías respiratorias hasta la faringe (migración traqueal), en donde son deglutidas. Las larvas viven en el estómago hasta el décimo día post-infección, posteriormente pasan al duodeno, donde se convierten en adultos entre los días 19 y 27 post-infección. En este tiempo los parásitos son sexualmente maduros, estos se aparean y se inicia la producción de huevos fértiles entre las 4 y 5 semanas (Olsen, 1974; Soulsby, 1982).

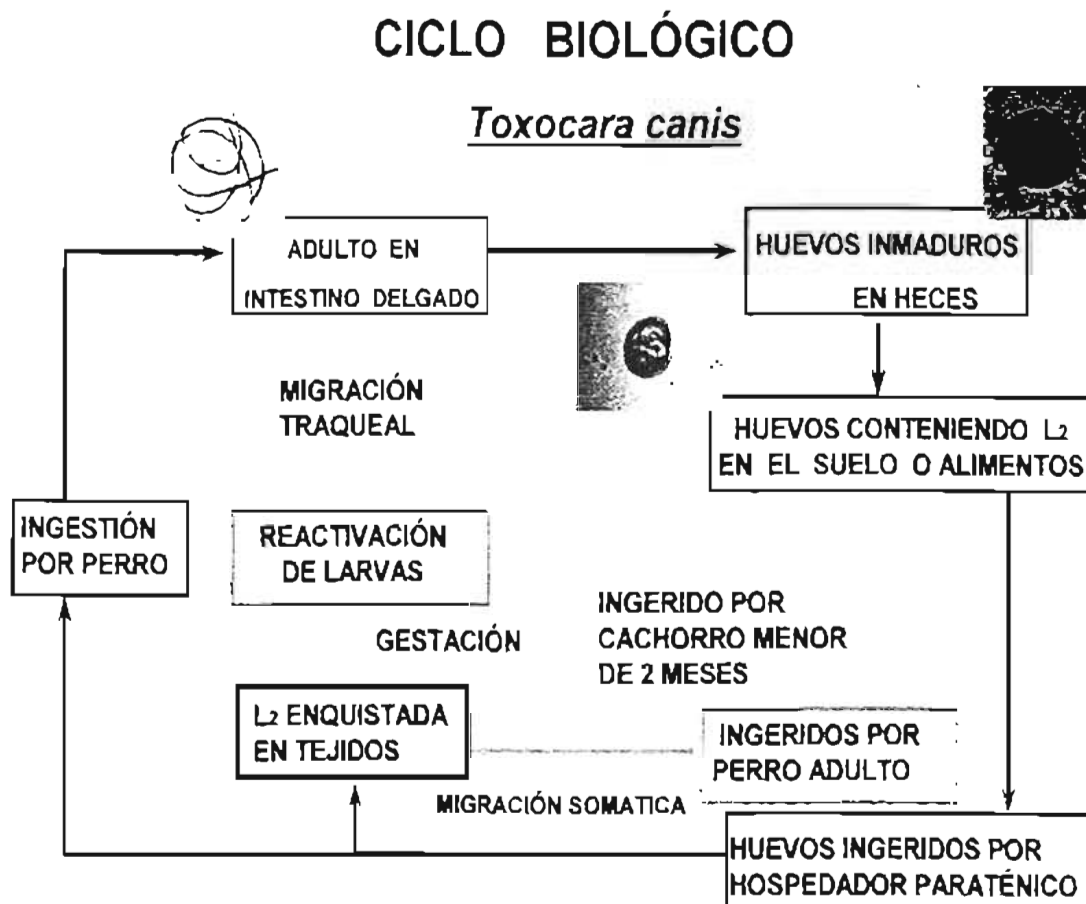


Figura 1.1.3.1 Ciclo Biológico de *Toxocara canis*, modificado de Alba, 1999.

Los cachorros infectados no sólo tienen riesgos de salud causada por la presencia de los gusanos en el intestino, sino que también son fuente de contaminación del medio, y los huevos pasan de las heces del cachorro a la hembra adulta cuando esta los limpia, desde las 3 semanas de edad del cachorro, iniciando nuevamente el ciclo. (Quiroz, 2000)

Existe una amplia gama de hospedadores accidentales, no definitivos o paraténicos que pueden ser infectados por larvas de *T. canis*, algunos de manera natural y otros de manera experimental, entre ellos se encuentran: ratas, ratones, gatos, pollos, codornices, gerbos mongolicos, borregos, cerdos y monos. El humano es considerado un hospedador paraténico en el que se almacenan larvas de segundo estadio en diferentes tejidos. (Alba, 1999; Ahmed & Aldawek, 2002; Sá-Nunes & Corrado, 2003; Hiratochia *et al.*, 2000).

#### 1.1.4 EPIDEMIOLOGÍA

La toxocariosis causada por *T. canis* es una de las principales enfermedades de los perros. Su distribución geográfica es mundial, por su gran incidencia y patogenicidad al humano es un problema de salud pública (Schantz & Glickman, 1978; Soulsby, 1982).

Una causa de la alta incidencia de esta parasitosis es el alto poder biótico que presentan estos parásitos, ya que las hembras depositan hasta 200 mil huevos diarios (Warren & Mahmoud, 1977). Los huevos son altamente resistentes a las condiciones medio ambientales y son una fuente de infección para perros, humanos y otros hospedadores paraténicos (Soulsby, 1982).

La infección por *T. canis* se presenta en casi todas las crías de perros y gatos, quienes cuando conviven con el humano, expulsan a diario y durante muchos meses, cantidades enormes de huevos en las heces, que se acumulan en el ambiente. Los niños pequeños son los más expuestos ya que suelen jugar en el suelo y con frecuencia se llevan tierra y distintos objetos contaminados a la boca, puerta de entrada del parásito. En el adulto, la falta de higiene de las manos permite el ingreso de los huevos de *T. canis* (Soulsby, 1982).

Se ha demostrado una alta frecuencia de anticuerpos anti-Toxocara en personas de muchos lugares del mundo, indicando un alto grado de infección por el parásito, sin embargo, la mayoría no presenta manifestaciones clínicas y sólo aparecen cuando se ingieren grandes cantidades de huevos o las larvas se localizan en lugares críticos como cerebro y ojos (Alba, 1999).

#### 1.1.5 SEMIOLOGÍA

Los signos se presentan principalmente en cachorros y dependen de la carga parasitaria. Infecciones leves no producen manifestaciones clínicas, pero al aumentar la carga parasitaria, hay retraso en el crecimiento, abdomen abultado (principalmente cuando terminan de comer), dolor a la palpación epigástrica, pelo hirsuto, piel áspera, vómito (algunas veces con presencia de gusanos adultos) y diarrea con moco. En algunos casos se pueden presentar signos nerviosos consistentes en convulsiones de duración limitada provocada por la presencia de larvas en sistema nervioso central (Soulsby, 1982; Payne, 2000).

En pruebas de laboratorio se observa una marcada eosinofilia, aumento de globulinas, bajos niveles de albúmina y aumento de las transaminasas séricas (Tonimura *et al.*, 1976), se puede presentar anemia en forma transitoria.

En infecciones prenatales ocasionalmente se pueden presentar neumonías mortales debidas a la migración de larvas a través de los pulmones en animales recién nacidos; en cachorros mayores se pueden presentar muertes por neumonías debidas a la aspiración de vómito o por obstrucción intestinal aguda (Soulby, 1982).

#### 1.1.6 IMPORTANCIA MÉDICA

En humanos se han reportado dos cuadros clínicos de toxocariosis: el síndrome de *larva migrans visceral* y el síndrome de *larva migrans ocular*. El primero es producido cuando las larvas migran a través de los tejidos y el segundo cuando las larvas quedan enquistadas en los ojos (Alba, 1999).

### 1.1.7 LARVA MIGRANS VISCERAL (LMV)

*Larva migrans visceral* es un síndrome clínico causado por la presencia y migración de larvas de diferentes nematodos por los tejidos del humano. Estas larvas son de especies de parásitos no bien adaptadas al humano y por lo tanto no alcanzan el desarrollo completo en este hospedero paraténico.

Clínicamente, la gravedad de la enfermedad varía mucho según el número de huevos larvados ingeridos, la duración de la infección, la presencia de larvas en lugares críticos y otros factores aun no entendidos (Beaver *et al.*, 1986). La mayoría de las infecciones humanas por *T. canis* cursan asintómicamente o con síntomas muy leves (Bass *et al.*, 1987). El signo más notorio es la eosinofilia crónica, en algunos casos se han descrito cuentas de leucocitos de 30,000 a 100,000 por mm<sup>3</sup> y con 80 a 90% de eosinófilos (Beaver *et al.*, 1952; Huntley *et al.*, 1965; Limate *et al.*, 1990). No obstante, la *larva migrans visceral* es solo una de las varias causas conocidas de eosinofilia en los humanos (Chisid *et al.*, 1975). En los casos más graves se reportan pica, fiebre, hepatomegalia, hiperglobulinemia y dolor abdominal. La mayoría de los pacientes se recuperan y solo algunos llegan a morir (Dunn, 1983; Beaver *et al.*, 1986).

La infiltración pulmonar con eosinófilos se produce por migración de estas células dentro del tejido pulmonar y de las vías aéreas. Este síndrome puede presentarse como procesos de traqueobronquitis, bronquitis, alveolitis o bronconeumonías graves (Markell *et al.*, 1986). Los signos clínicos más frecuentes son la presencia de tos no productiva, en algunos casos se ha encontrado que niños con asma presentan frecuentemente anticuerpos anti-Toxocara que niños controles sin manifestaciones clínicas (Muñoz, 2002).

La urticaria y el prurigo son trastornos cutáneos ligados íntimamente a la infección por *T. canis*, según una investigación reciente realizada por Humbert y colaboradores, donde se estudió en más de 650 pacientes que presentaban diferentes trastornos cutáneos; 134 pacientes con urticaria y 22 con prurigo presentaron prueba de ELISA positiva para dicho agente, cifras estadísticamente significativas en comparación con el grupo testigo. El riesgo de tener toxocariosis

en los pacientes con urticaria o prurigo fue considerable, hecho que no fue observado con otros trastornos cutáneos también frecuentes como la dermatitis atópica, el prurito o el eccema no atópico. Los autores del estudio consideran que en todo paciente con urticaria recurrente o con prurigo debe considerarse la realización de pruebas diagnósticas con el objetivo de descartar una infección por *T. canis* (Humbert, 2000).

En un estudio realizado para determinar la frecuencia de lesiones a nivel abdominal por medio de ultrasonografía en niños positivos a *T. canis* por pruebas serológicas, el 83.3% presentaron granulomas hepáticos, el 77.7% presentaron aumento de tamaño en los linfonodos hepatobiliares, hepatomegalia en el 72.7% y esplenomegalia en el 50%, lo cual demuestra la gravedad de la infección por la larva migrante de *T. canis*. Debe considerarse esta enfermedad dentro del diagnóstico diferencial en todos los niños que presenten signología de problemas abdominales por ultrasonografía, especialmente aquellos con diagnóstico de eosinofilia (Baldisserotto, 1999).

Mucha de la signología presente en hospederos paraténicos incluyendo al hombre está dada por la hiperreactividad del sistema inmune a la presencia del parásitos en los diferentes tejidos, un estudio realizado en intestino de cuyo demostró que este órgano responde de forma histamínica a la infección artificial y se presupone que este tipo de reacción es el mismo que sucede en los diferentes órganos en los cuales suelen alojarse las larvas migrantes (Sá-Nunes, 2003).

Varios autores han discutido el daño producido por larvas de *T. canis* en el sistema nervioso central de humanos, mientras algunos han reportado diferentes problemas como: encefalitis, encefalopatías, ataxia y disturbios neurológicos (Hill, 1985; Sommer *et al.*, 1994; Lowichik & Ruff, 1995), otros no han encontrado ningún tipo de relación entre infección y patología nerviosa (Magnaval *et al.*, 1997). En un estudio realizado por Huntley *et al.*, en 1965, se encontró que en el 28% de los pacientes con LMV tenían antecedentes de convulsiones. Otros reportes parecen indicar que la infección por *T. canis* no se asocia frecuentemente a epilepsia (Glickman *et al.*, 1979; Woodruff *et al.*, 1966).

Además, se ha asociado la seropositividad a *T. canis* con bajo desarrollo de la inteligencia en niños (Nelson *et al.*, 1996).

#### 1.1.8 LARVA MIGRANS OCULAR (LMO)

La forma ocular de la infección por *T. canis* en huéspedes paraténicos produce granulomas retinales que pueden afectar gran parte del área del fondo ocular, pero es más frecuente en el polo posterior ya que en este lugar existe gran cantidad de vasos sanguíneos, el parásito entra al ojo a través de las arterias ciliares posteriores o por la circulación retinal. Debido a que el organismo migra por la coroides y la retina, se da una respuesta inflamatoria que da origen al granuloma, causando vitritis, iritis, retinocoroiditis y daño retinal fibroso. La reacción inflamatoria se incrementa en el momento de la muerte del parásito, dando lugar a una lesión granulomatosa de color blanco, con bandas fibrosas que emanan de la retina hacia el humor vítreo. Cuando esta lesión se localiza en el polo posterior de niños pequeños puede confundirse con otras enfermedades que cursan con leucocoria como son el retinoblastoma. El resultado de este proceso infeccioso inflamatorio es frecuentemente la reducción de la visión y estrabismo secundario, especialmente cuando el daño se localiza en la región de la mácula o del nervio óptico (Torbit, 2000).

La presencia de parásitos en el humor vítreo o la retina da lugar generalmente a una imagen característica. Se forma en el seno de los tejidos oculares un granuloma parasitario constituido por una necrosis eosinofílica (absceso eosinofílico) alrededor del parásito. A su vez, este se rodea de una capa de células inflamatorias entre las que predominan los eosinófilos y las células plasmáticas. En ocasiones y como consecuencia del pequeño tamaño de la larva de *T. canis* (20 x 400 micrómetros), esta no puede ser localizada dentro de los abscesos eosinofílicos. Tampoco estas son tan abundantes como para encontrarlos en un corte de rutina de un globo ocular. En muchas ocasiones, la larva del nematodo migra a través de los vasos retinianos dando lugar a una capa granulomatosa parasitaria en la faz anterior de la retina. Esto da lugar a una



vitreitis esclerosante causante de un desprendimiento en forma de paraguas en la retina. Este cuadro da lugar a una leucocoria que en algunas ocasiones es confundido con un retinoblastoma (Baldisserotto, 1999).

También se ha asociado a otras alteraciones como granuloma en la retina periférica, *pars planitis*, endoftalmitis y uveítis. Otras menos comunes incluyen hipopión, absceso vítreo, neuritis óptica y queratitis (Rodríguez, 2002).

#### 1.1.9 LESIONES NEURONALES

No se ha encontrado aún un modelo animal para el estudio de la fisiopatología neuronal causada por *T. canis*, pero se ha observado que los gerbos (*Meriones unguiculatus*) desarrollan un daño irreversible luego de una infección crónica por *T. canis* y *T. cati*, resultando en ataxia progresiva, por lo que se proponen ahora como modelos para el estudio de la Toxocariosis neuronal humana. (Alba, 1999).

A nivel histológico se localizan cambios degenerativos en el cerebelo de gerbos infectados de forma artificial. Estos cambios incluyen pérdida de células de Purkinje, y fibras nerviosas. La necrosis de las células de Purkinje se observa frecuentemente en algunas áreas en preparaciones histológicas de lóbulos cerebelares y en ocasiones se extiende a otras regiones del cerebelo. No se observa daño o atrofia molecular, pero sí una disminución en el número de células granulares a nivel de la corteza del cerebelo (Akao, 20003).

Al parecer, las manifestaciones clínicas de la presencia de larvas migrantes en cerebro se deben a los efectos indirectos de la acumulación de macrófagos en la zona cerebelar afectada (Akao, 2003).

#### 1.1.10 RESPUESTA INMUNE

La capacidad de estos parásitos para sobrevivir en los tejidos del hospedero pese a las reacciones generadas por el mismo, es un factor importante en el proceso de adaptación de los parásitos. En este sentido, las larvas son capaces de producir una serie de macromoléculas de naturaleza

glucoproteica que son reconocidas antigénicamente y que son conocidas como antígenos de secreción y excreción (TES), estos antígenos aparentemente varían de acuerdo a las diversas condiciones fisiológicas del nematodo y forman parte de la envoltura externa del mismo (Alba, 1999).

La cutícula está cubierta por un glicocalix rico en carbohidratos que forma una envoltura aniónica vellosa de aproximadamente 10 nm de espesor y está delimitada a una distancia similar por la epicutícula. La superficie de la cutícula parece tener un papel importante como mecanismo de evasión, ya que se desprende cuando interactúa con granulocitos o anticuerpos. El sitio de producción de los TES son las glándulas esofágicas que se abren en la luz del esófago y vierten su contenido por la boca, emitiendo además ramificaciones caudales que se abren en el poro excretor y que producen una auténtica barrera protectora sobre el cuerpo del gusano que los aísla del hospedero. Los TES se desprenden y recambian, cada larva produce hasta 200 pg de proteína por día. (Maizels *et al.*, 1984; Maizels *et al.*, 1987; Munira, 1986, 1987; Gems y Maizels, 1996).

Los TES han sido estudiados bajo varios sistemas para determinar sus propiedades químicas y biológicas, entre ellos está el análisis bioquímico, inmunológico y se ha llegado al genético. Además, se ha identificado la producción de una gran variedad de sustancias las cuales cumplen diversas funciones en la interacción parásito-hospedero y químicamente corresponden a: mucinas, lectinas, proteasas, inhibidores enzimáticos y otros. (Glickman *et al.*, 1979; Munira, 1986; Magnaval *et al.*, 1991; Magnaval *et al.*, 1992; Fenoy *et al.*, 1992; Gems y Maizels, 1996; Asao *et al.*, 1997; Yamasaki *et al.*, 1998; Maizels, 2000; Rincón, 2001; Cuéllar *et al.*, 2001; Kramer *et al.*, 2002).

Los TES fueron aislados primariamente por De Savygni en 1975, quien desarrolló el proceso para el aislamiento y cultivo de larvas de *T. canis* en medio mínimo esencial. Los TES los aisló del sobrenadante y los empleó para el diagnóstico inmunológico. Badley *et al.*, en 1987, detectaron 15 bandas proteicas en los TES. Gradualmente se han desarrollado y aplicado técnicas cada vez más

sofisticadas para estudiarlos permitiendo su caracterización y secuenciación; en la actualidad usando geles bidimensionales se han descrito hasta 50 macromoléculas diferentes en los sobrenadantes de los cultivos. Existen discrepancias en el número y tipo de moléculas que se encuentran en los TES, probablemente las moléculas detectadas, están más relacionadas con las técnicas empleadas para su obtención que por diferencias biológicas (De Savigni, 1975; Glickman, 1979; Maizels *et al.*, 1984; Medhji y Maizels, 1986; Aguila de la Puente *et al.*, 1988; Wade y Georgi, 1987; Magnaval *et al.*, 1991; Bardon *et al.*, 1995; Gems y Maizels, 1996; Yamazaki *et al.*, 1998; Epe *et al.*, 1999).

Se ha determinado que los TES tienen una serie de propiedades biológicas relacionadas con la capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero hacia las larvas. Lo anterior se desprende de los siguientes hechos: Los TES depositados temporalmente en la superficie cuticular y que constituyen la epicutícula del gusano, presentan una unión con la misma que es muy fácil de romper, reaccionan con los anticuerpos y granulocitos del hospedero, pero al ocurrir la interacción con estos últimos se desprenden, constituyéndose este recambio en un excelente mecanismo de evasión de la respuesta inmune del parásito (Page *et al.*, 1992). También se ha encontrado que estos productos son capaces de neutralizar algunos de los componentes del complemento y a los anticuerpos IgG que podrían ser importantes en la destrucción de las larvas (Jane *et al.*, 1987).

La aparición de los antígenos ocurre gradualmente en cantidad y en diversidad, el antígeno más frecuentemente detectado es de 120 kDa, existiendo variaciones en cuanto a la capacidad de reconocimiento por la respuesta inmune en las diferentes especies, por ejemplo los sueros de conejo no reconocen los mismos antígenos que los sueros de humano (Page *et al.*, 1992).

Los TES activan inespecíficamente a los linfocitos B, induciendo producción policlonal de IgG e IgE. También inducen la activación de macrófagos para producir interleucina 1 (IL-1) que a su vez estimula a linfocitos B y a los eosinófilos. Se ha planteado que los TES funcionan como potentes mitógenos de

los linfocitos B y que esta activación no específica produce grandes cantidades de anticuerpos inespecíficos y por lo tanto distraen la respuesta inmune (Mehhji y Maizels, 1986; Parson *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1995; Finkelman, 1995).

Se ha encontrado también que los eosinófilos, células que tienen una potente actividad tóxica contra los helmintos en el ratón, carecen de los receptores de IgE lo cual los incapacita para matar a los estadios larvarios, a diferencia de lo que ocurre con los eosinófilos de humano y de rata que si los presentan (Jones *et al.*, 1994; Hiratochia *et al.*, 2000). Los antígenos son capaces de afectar la adherencia de los eosinófilos a la superficie del gusano, ya que al momento de que ocurre la interacción célula-cutícula, ésta último se desprende del parásito evitando la unión (Badley *et al.*, 1987; Page *et al.*, 1992).

Las bandas de 120 kDa y 400 kDa de los TES tienen la capacidad de reaccionar de forma diferente con los antígenos A y B de grupos sanguíneos en virtud de que esas porciones presentan los mismos azúcares (N-acetilgalactosamina y galactosa) en las unidades terminales, estos también presentan un recambio constante y también han sido demostrados en nematodos como: *Ascaris lumbricoides*, *Trichinella spiralis*, *Necator americanus* y platelmintos como: *Fasciola hepatica* y *Taenia saginata* (Meghji y Maizels, 1986).

Otros helmintos producen antígenos de secreción y excreción de la misma naturaleza y con el potencial de cruzar antigénicamente con los generados por *T. canis* particularmente con aquellos de alto peso molecular, entre ellos se puede citar a: *Strongyloides* spp., *Ascaris suum*, *Toxascaris leonina*, *Anisakis simplex*, *Capillaria* sp. *Schistosoma* spp., *Onchocerca* spp., *Trichuris muris*, *Trichinella spiralis* e *Hysterothylacium aduncum*, entre otros que también pueden causar el síndrome de *larva migrans visceral* (Magnaval *et al.*, 1991; Cuellar *et al.*, 1993; Iglesias *et al.*, 1996; Stevenson y Jacobs, 1977; Nicholas *et al.*, 1984; Fenoy *et al.*, 1989; Lynch *et al.*, 1993, Cuellar *et al.*, 1995).

A nivel celular se ha demostrado que las larvas migrantes desencadenan una respuesta característica de las células Th2 en un hospedador paraténico como el ser humano, en un estudio realizado en Japón se encontró que la

producción de Interleucinas, principalmente la IL-4 y la IL-5 son las citocinas que median el tipo de respuesta Th2, detectándose principalmente a nivel de pulmón y bazo (Hiratochia, 2000; Kwung, 2003).

En experimentos realizados en borregos como modelos de migración larvaria de *T. canis* se han demostrado asociaciones entre las células CD4+ y CD8+ con la formación de granulomas ricos en eosinófilos y la activación de macrófagos en el hígado. La reacción granulomatosa se conoce como T-dependiente. La respuesta de los anticuerpos anti-Toxocara se considera también como CD4+T-dependiente. Trabajos realizados en 1983 por Sugane y Oshima sugieren que el tipo esencial de células involucradas en lesiones hepáticas de ratones, son principalmente CD4+ y no CD8+ (Ahmed, 2002).

La producción de un factor quimiotáctico para linfocitos T CD8+ se ha encontrado en ratones infectados con larvas de *T. canis*, cuando las células del bazo de estos ratones se cultivan en medio RPMI libre de suero, la producción de este factor quimiotáctico se ha detectado, sobre todo al día 9 pi y luego va decreciendo. El factor quimiotáctico secretado es importante durante la reacción en contra del parásito y ha demostrado que no sólo es importante para atraer a los linfocitos, sino también colabora en la activación de eosinófilos vírgenes (Owhashi, 1997).

En ratones infectados con huevos larvados de *T. canis* se ha observado una reducción de la respuesta inmune celular principalmente de la actividad metabólica de los macrófagos peritoneales. La administración parenteral de muramildipéptido en ratones en dos dosis antes y después de la infestación reactivó y estimuló de manera significativa la fagocitosis, la actividad metabólica de los macrófagos, la respuesta proliferativa de los linfocitos T y elevó la producción de anticuerpos anti-*T. canis* circulantes. Se comprobó así que este inmunomodulador reduce significativamente el conteo de larvas migrantes de *T. canis* en el organismo del huésped hasta en un 30.6% y decrece en un 50% el porcentaje de larvas en el cerebro (Dvoroznakova, 1999).

## 1.2 CÉLULAS INMUNES

Las células que conforman al sistema inmune son de distinta estructura y función, aunque todas ellas procedan de un solo tipo celular llamada célula madre pluripotencial, quien se encuentra en la médula ósea, a partir de la cual se van diferenciando.

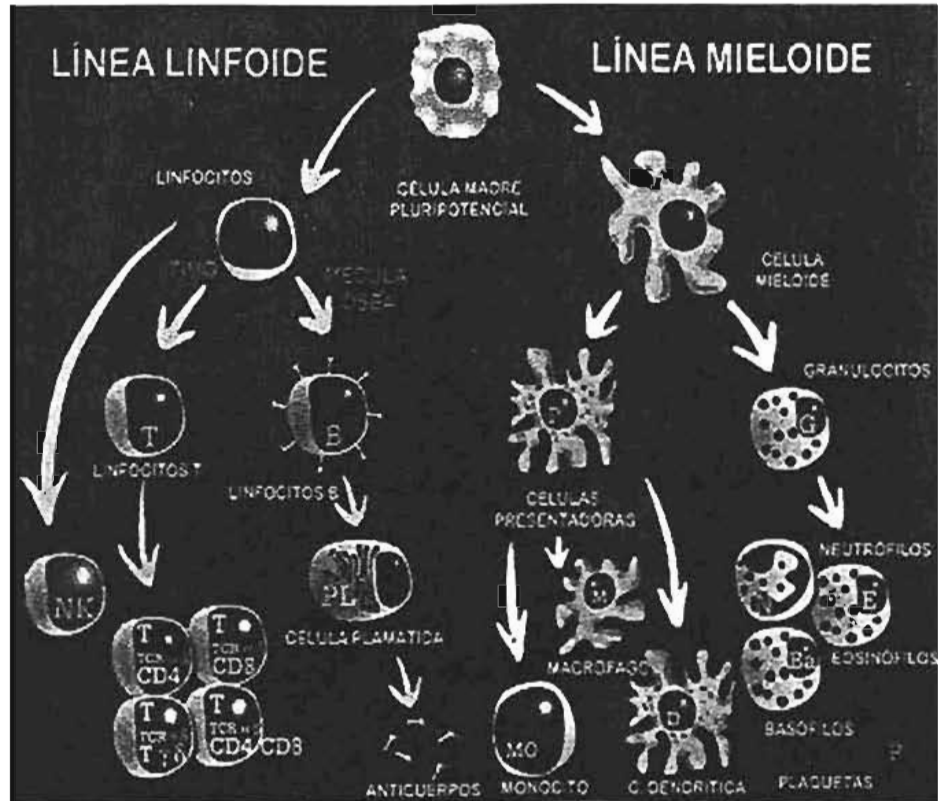


Figura 1.2.1 Origen de las células leucocitarias. Modificado de Sánchez, 2002.

En primera instancia, la célula madre pluripotencial se multiplica y estas células hijas toman dos caminos diferentes, uno es para dar origen a las células linfoides y otro es el que da origen a las células mieloides (Sánchez, 2002). De la línea linfóide derivan los linfocitos y es esta misma línea la responsable de llevar a cabo las principales funciones que caracterizan al sistema inmune y que le permiten reaccionar frente a moléculas extrañas de forma específica, así como

de responder a futuras agresiones por estos mismos invasores, es decir, la denominada memoria inmunológica.

De esta línea derivan:

- Los LINFOCITOS B, producidos en la médula ósea y responsables de la producción de los anticuerpos. Inmunidad humoral.
- Los distintos tipos de LINFOCITOS T, que derivan del timo y son los responsables de la colaboración para la producción de anticuerpos y de los mecanismos de la respuesta de inmunidad celular.

Sobre la línea Mieloide sabemos que es a partir de la cual derivan las células denominadas accesorias o presentadoras de antígenos que aunque no responden por mecanismos de especificidad, forman parte de la inmunidad natural o innata, y juegan un papel esencial para dar respuesta durante la inmunidad adquirida. Las células accesorias incluso pueden actuar como células efectoras en algunos mecanismos inmunitarios.

Este grupo de células presentadoras de antígeno está formado por:

- MONOCITOS y MACRÓFAGOS.
- GRANULOCITOS:
  - EOSINÓFILOS.
  - NEUTRÓFILOS.
  - BASÓFILOS.
- CÉLULAS DENDRÍTICAS.

Las principales funciones de las células presentadoras de antígenos son las siguientes:

- Fagocitosis
- Presentación de antígenos
- Producción de linfocinas

### 1.2.1 LOS LINFOCITOS

Desde un punto de vista morfológico, por microscopía ordinaria, no se encuentran diferencias entre los linfocitos T de los B. Ambos linfocitos son células de entre 7 a 9 micras de tamaño, presentan un núcleo voluminoso y escaso citoplasma. Por métodos de microscopía electrónica de barrido, existen algunas diferencias notables. Así, los linfocitos T presentan una superficie suave y plana, mientras que los linfocitos B presentan una superficie con múltiples proyecciones, que corresponden a las inmunoglobulinas de superficie.

A lo largo de las últimas décadas, se han diseñado diferentes marcadores de superficie para diferenciar las distintas poblaciones de linfocitos, aunque ha sido con el desarrollo de los anticuerpos monoclonales (AcM), producidos en contra de las diferentes células linfocitarias, y que han permitido diferenciar las poblaciones y agruparlas según sus antígenos de membrana y su función.

Los AcM han permitido también definir a una tercera población linfocitaria, denominada, hasta hace poco, como células nulas, por no presentar los marcadores tradicionales de los linfocitos T o B (formación de rosetas con los eritrocitos de carnero e inmunoglobulinas de superficie, respectivamente). Estas células nulas, son realmente una subpoblación de linfocitos T (Sánchez, 2002).

#### 1.2.1.1 LINFOCITOS T

Los linfocitos T en los mamíferos se producen en el timo y en menor proporción en las zonas T dependientes de los órganos linfoides secundarios. A diferencia de los linfocitos B, no presentan inmunoglobulinas en su superficie. Los linfocitos T juegan un papel fundamental en la respuesta inmune, por un lado, en los mecanismos de presentación de antígenos a los linfocitos B para la producción de anticuerpos y por otra parte, como responsables de la inmunidad celular (respuesta inmune mediada por células).

Existen dos poblaciones de células cooperadoras, las CD4+CD8- y las CD4+CD8+. Ambas poblaciones actúan en la cooperación celular en la respuesta primaria al menos *in vitro*, mientras que en la respuesta secundaria parecen



actuar solamente las CD4+CD8+. Por otra parte, se sabe que estas poblaciones celulares doble positivas, además de aumentar su número con la edad, se localizan en proporciones importantes en las tonsilas (50%) y en los linfonodos (30%) de animales adultos.

En cuanto a los linfocitos citotóxicos, se pueden diferenciar dos subpoblaciones de CD4-CD8+ en virtud a la expresión del CD6. Así, los linfocitos que expresan el antígeno CD6- están relacionados con la citotoxicidad espontánea mientras que los CD6+ CMH I, lo están con la citotoxicidad de células infectadas por virus.

#### 1.2.1.2 LINFOCITOS B

Los linfocitos B se producen en la médula ósea en una proporción aproximada de entre doscientos a cuatrocientos millones diarios, lo cual demuestra la enorme capacidad de respuesta del sistema inmune. Debemos recordar que un linfocito B produce un anticuerpo específico (1 célula = 1 tipo de anticuerpo). En sangre periférica, los linfocitos B suponen entre el 8 al 18% de los linfocitos totales. La membrana de los linfocitos B está formada por un gran número de moléculas, de entre ellas, es importante destacar, la conocida como complejo BcR (B cell Receptor) o receptor de células B.

El BcR está formado por varias cadenas de proteínas, unas forman parte del BcR, y son invariables, formadas por dos cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , y que son comunes a todos los linfocitos B y el otro tipo de cadena son anticuerpos en su superficie, fundamentalmente del tipo IgM e IgG, lo que les permite reaccionar con el antígeno en su forma nativa (los linfocitos T no pueden reaccionar con el antígeno en su forma nativa). La mayoría de los antígenos que reaccionan con los linfocitos B son de carácter proteico, aunque también pueden reaccionar con polisacáridos. La iniciación de la reacción con el antígeno siempre se realiza a través de las inmunoglobulinas de membrana (señal BcR), pero la producción de los anticuerpos necesita de la colaboración de los linfocitos T CD4+ en la mayoría de los casos.

Un linfocito B estimulado, tanto por antígeno T dependientes como por T independientes, se transforma en un clon de células plasmáticas que producirán y segregarán anticuerpos en gran cantidad. Estos anticuerpos son específicos frente al epítipo que indujo la respuesta inmune. Esta respuesta inmune, mediada solo por anticuerpos, se denomina: respuesta humoral. El linfocito B estimulado o célula plasmática presenta una morfología diferente a la originaria del linfocito B (núcleo grande y pequeño citoplasma) y más típica de una "célula – factoria" con un núcleo pequeño y un gran citoplasma. Estas células se localizan fundamentalmente en los linfonodos, pulpa roja del bazo, médula ósea y mucosas intestinales y respiratorias. *in vivo* su vida media es muy corta de 2 a 3 días siendo *in vitro* aún menor, llegando a sobrevivir solamente horas (Sánchez, 2002).

En la membrana de los linfocitos B se encuentran inmunoglobulinas de superficie que pueden ser detectadas con un suero o inmunoglobulina anti-inmunoglobulinas marcados con fluorescencia o mediante un anticuerpo monoclonal conjugado y dirigido contra cada isotipo de inmunoglobulinas. Por medio del microscopio de fluorescencia se puede observar que en la membrana aparece una reacción positiva.

### 1.2.2 EOSINÓFILOS

Los granulocitos son un conjunto de células que presentan un gran número de gránulos en su citoplasma, así como, diferentes formas y comportamientos con los colorantes histológicos. Estas células se encuentran en la sangre y pasan a los tejidos solamente cuando son atraídos por la activación de macrófagos o del complemento y posterior liberación de agentes quimiotácticos. Este fenómeno, se conoce como diapedesis.

Los eosinófilos, denominados de esta forma ya que incorporan colorantes histológicos ácidos, como la eosina, pasan de la médula ósea (casi inmaduro) al bazo donde madura, para pasar posteriormente, al torrente circulatorio y a los tejidos. Su vida media es muy corta, menos de una hora y su misión fundamental

es también la fagocítica, aunque sus gránulos no contienen lisozima, contienen grandes cantidades de fosfatasa ácida y peroxidasa. Intervienen muy eficazmente en las parasitosis (Sánchez, 2002).

### 1.3 CITOMETRÍA DE FLUJO

#### 1.3.1 HISTORIA

La industria de la citometría de flujo data de 1972, en este año, el Dr. Len Herzenberg de la Universidad de Stanford, inventó y patentó un citómetro de Flujo. La compañía Becton Dickinson compró los derechos a la Universidad e introdujo de manera comercial el citómetro de flujo llamado FACS-1 y en el año de 1977, la compañía Ortho Diagnostics introduce el SYSTEM 50. (4) De alguna manera, se puede considerar a los citómetros de flujo como un tipo especializado de microscopio de fluorescencia (Reyes, 1999).

#### 1.3.2 FUNDAMENTO.

La citometría de flujo es una herramienta capaz de examinar las propiedades físicas y químicas de las células vivas, microorganismos u otras partículas biológicas, las cuales viajan en suspensión en una solución salina, pasan por un tubo capilar que vibra de tal forma que provoca que caigan pequeñas gotas que contienen una sola célula, ésta pasa frente a una fuente luminosa, un rayo láser que detecta varios parámetros como son: Análisis fenotípico, clasificación de esterilidad, análisis de ADN, análisis cromosómico y clasificación, estudios funcionales, receptores de superficie, actividad enzimática, permeabilidad de la membrana y flujo de calcio.

El rayo de luz que ha pasado a través de las células es captado por una serie de sistemas ópticos, filtros, transductores electrónicos de señales y un equipo de cómputo que colecta la luz emitida a una longitud de onda específica, estos sensores se encuentran a diferentes ángulos conforme al origen de la fuente de luz (Reyes, 1999).

En el momento en que una célula cae por la vibración del capilar, y al pasar por el rayo láser, este le imprime una carga positiva o negativa, luego al llegar a una serie de placas con cargas positivas o negativas, estas placas atraen a las células según su carga y provocan que las células caigan en recipientes diferentes según el desvío que sufren, las células que no reciben ninguna carga durante su paso por el rayo láser, son colocadas en un receptáculo para deshechos.

Los datos del citómetro de flujo se obtienen usando un amplificador lineal o amplificación logarítmica. El uso del amplificador logarítmico es el indicado para las cuestiones biológicas, donde las distribuciones están desviadas a la derecha. En este caso, el efecto de la amplificación logarítmica normaliza la distribución. El uso de una amplificación logarítmica requiere de un amplio rango de fluorescencia, que puede ser después comprimido, como en muchas otras distribuciones biológicas. La amplificación lineal se usa cuando no se está seguro de la amplitud del rango de los signos, por ejemplo, los análisis de DNA, flujo de calcio, etc.

### 1.3.3 SORTING O CLASIFICADOR.

Algunos citómetros están equipados con un clasificador que separa y colecta las células o partículas de interés del resto de la muestra (Reyes, 1999). La ventaja que representa esta tecnología es que se pueden medir varios parámetros en una célula viva individual, pueden identificarse células extremadamente raras de entre muchas que existen en una muestra, además de que se pueden coleccionar separadamente para realizar mayores estudios, y todo ello a una velocidad tal que no compromete la viabilidad de las células (Reyes, 1999).

# ESQUEMA DE UN CITOMETRO DE FLUJO

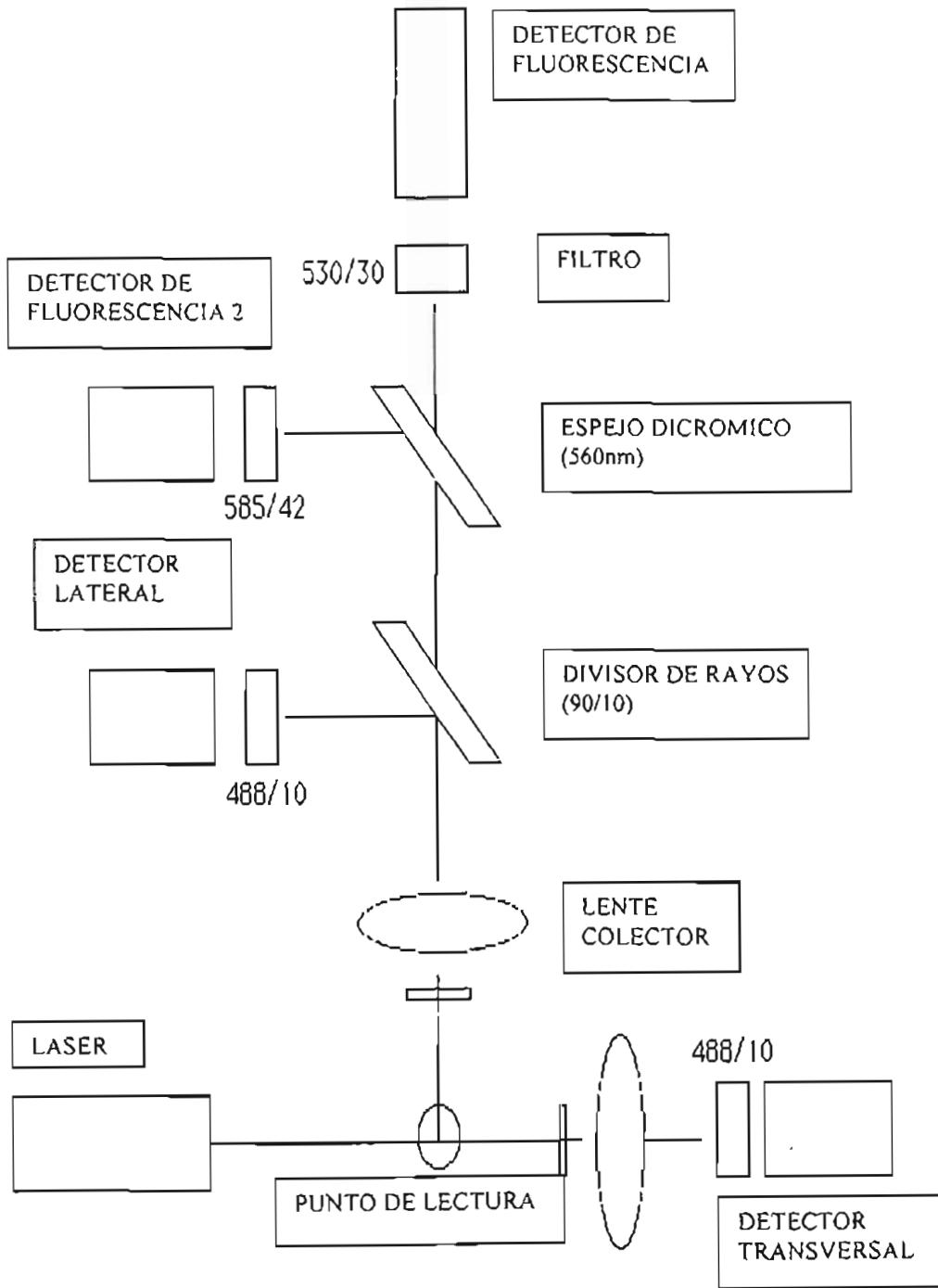


Figura 1.3.1 Esquema simplificado de un citómetro de flujo.

### Cuadro 1.3

Lista de los principales fluorocromos utilizados en Citometría de flujo.

Fluorocromo	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Tipo de Laser	Aplicaciones
Fluoresceína	495	520	Argon	Análisis Fenotípico
Ficoeritrina	495	575	Argon	Análisis Fenotípico
Tricolor	488	650	Argon	Análisis Fenotípico
PerCP	488	670	Argon	Análisis Fenotípico
TRITC (Rhodamina)	488	580	Argon	Análisis Fenotípico
Coumarina	357	460	Argon	Análisis Fenotípico
Alofococianina (APC)	630	660	Helio-Neon	Análisis Fenotípico
APC-Cy7	630	760	Helio-Neon	Análisis Fenotípico
Azul Cascada	350	480	Argon	Análisis Fenotípico
Rojo 613	480	613	Argon	Análisis Fenotípico
Rojo 670	480	670	Argon	Análisis Fenotípico
Rojo Quantum	480	670	Argon	Análisis Fenotípico
Hoechst 33342	350	470	Argon	Análisis de DNA / Apoptosis
Hoechst 33258	350	475	Argon	Análisis de DNA / Tinción de cromosomas
DAPI	372	456	Argon	DNA
Cromomicina A3	457	600	Argon	Análisis de DNA / Tinción de cromosomas
Ioduro de Propidio	495	637	Argon	Análisis de DNA
Bromuro de etidio	493	620	Argon	Análisis de DNA
TO-PRO-3	642	661	Helio-Neon	Análisis de DNA
Naranja de Acridina	503	530/640	Argon	DNA, RNA
Sytox Green	488	530	Argon	DNA
Fluoresceína diacetato	488	530	Argon	Diferenciación de células vivas y muertas
SNARF-1	488	530-640	Argon	Determinación de pH
Indo-1	349	425/490	Argon	Determinación de flujo de calcio
Fiuo-3	488	530	Argon	Determinación de flujo de calcio
Rhodamina 123	515	525	Argon	Mitocondrias
Monochlorobimane	380	481	Argon	Prueba específica para Glutathión

#### 1.3.4 RAYO LASER Y FLUOROCROMOS.

Existen varios tipos de rayo láser que pueden ser utilizados en los sistemas de citometría de flujo, pero los tipos más comunes son los iones de argón, helio-neón, kriptón y láser teñido. La selección del fluorocromo a utilizar es en función tanto de la aplicación que se le va a dar como por la longitud de onda a la que es excitado dicho fluorocromo.

En el cuadro 1.3 se muestra una lista de los principales fluorocromos, junto con la longitud de onda a la que son excitados y la longitud de onda de la fluorescencia que emiten, se menciona también las aplicaciones más comunes para los fluorocromos (Reyes, 1999).

#### 1.3.5 ANÁLISIS MULTICOLOR.

Existen ocasiones donde es importante conocer si más un antígeno coexiste en una misma célula, por lo que se ha desarrollado la técnica del análisis multicolor, la cual nos puede ayudar a determinar si sucede o no la convivencia de los antígenos. Combinando la electrónica con la óptica, se han creado variantes de los análisis de una o dos fluorescencias, donde por una compensación que llevan a cabo los elementos del aparato, nos es posible diferenciar entre varios colores de fluorescencia (Georgi, 1994).

#### 1.3.6 MARCAJE CON FLUOROCROMOS:

Una herramienta muy importante para distinguir las células que serán leídas por el citómetro de flujo son los marcajes con fluorocromos, que nos ayudan a diferenciar los tipos celulares por el color que reflejan debido al fluorocromo con el que han sido identificadas.

Para permitir la unión del fluorocromo a las células es necesario tener un conjugado de anticuerpos y colorantes, donde el anticuerpo se dirige a una molécula específica que se encuentra en la superficie celular, al unirse la inmunoglobulina marcada, consecuentemente, la célula queda teñida, y esta diferencia de color es detectada por el rayo láser del citómetro de flujo.

### 1.3.7 INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS.

El uso del citómetro de flujo en muchas rutinas de Laboratorio clínico ha dado como resultado la aceptación del citómetro en el campo de la inmunofenotipificación celular. Muchas pruebas de Laboratorio han sido ya adaptadas para ser leídas por citometría debido a la rapidez y exactitud de la misma. Uno de los máximos beneficios que ha dado la técnica de citometría de flujo es que ahora se pueden hacer análisis sobre pequeñas poblaciones celulares que antes eran técnicas muy laboriosas en el microscopio manual (Reyes, 1999).

### 1.3.8 APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

Tradicionalmente el citómetro de flujo ha sido una herramienta de gran importancia en la investigación biomédica en todo el mundo, sobre todo por que es posible trabajar con células vivas, por eso es que esta técnica ha sido y seguirá siendo, una herramienta muy valiosa en la investigación básica y aplicada, sobre todo en áreas como la investigación de células T y B, células madres pluripotenciales, células nerviosas, células cancerosas, virus, bacterias, levaduras, mitocondrias, presentación de antígenos, expresión de genes y señales de trasducción. Con la citometría de flujo, los científicos ahora pueden saber cómo es el desarrollo celular, como responden las células a diferentes estímulos ambientales, nos ayuda a entender varios puntos sobre el progreso de las enfermedades y cómo los organismos logran atacar y eliminar los agentes patógenos (Reyes, 1999).



## 2. HIPÓTESIS

LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR LARVA 2 DE *Toxocara canis* EN RATONES CAUSA VARIACIONES EN LINFOCITOS Y EOSINÓFILOS DE SANGRE, TIMO Y BAZO, Y ESTA DIFERENCIA ES DEPENDIENTE DE LA CANTIDAD DE LARVAS INOCULADAS.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El ser humano actúa como hospedero paraténico de larvas de *T. canis*, que migran por diferentes órganos y causan lesiones en estos. Se ha observado gran actividad celular alrededor de las zonas de migración, por lo que se ha propuesto que el parásito puede modificar la respuesta inmune de sus huéspedes (Alba, 1999). Por lo anterior, resulta importante estudiar como evoluciona la respuesta inmune celular desde que empieza la migración del parásito hasta que se enquistas formando granulomas en diferentes tejidos. Debido a la lógica imposibilidad de realizar este tipo de estudios en humanos, se ha propuesto el uso de modelos experimentales en los que el parásito tenga un comportamiento similar. Para ello se han utilizado como modelos experimentales varias especies de animales, entre ellos: ratones, ratas, monos, conejos, pollos, codornices, hámster, cobayos, borregos, cerdos y gerbos (Alba, 1999; Ahmed, 2003). El modelo utilizado para este trabajo fue el ratón, ya que tiene grandes ventajas como la de contar con cepas singénicas, haber sido ampliamente estudiados y sobre todo haber sido utilizados para evaluar la migración del parásito (Alba, 1999).

Se ha estudiado la producción de anticuerpos anti-Toxocara en suero de algunos hospederos paraténicos (Havasiová *et al.*, 1993) y los antígenos específicos que reconocen estos anticuerpos (Magnaval *et al.*, 1991; Alba, 1999; Rincón, 2003). Sin embargo, los datos de la respuesta inmune celular son limitados, la mayoría de reportes son observaciones hechas en puntos aislados de las infecciones y no se conoce como varían en el tiempo las poblaciones de linfocitos en una infección experimental. Por lo anterior, con la ayuda de un citómetro de flujo que es una de las herramientas mas sensibles y específicas para medir poblaciones celulares, se realizó un estudio de cómo varían algunas poblaciones de linfocitos y eosinófilos en un órgano linfoide primario (timo), un órgano linfoide secundario (bazo) y en la sangre de ratones infectados experimentalmente con larvas de *T. canis*.

## OBJETIVO

Evaluar y comparar la cinética celular, a diferentes tiempos, de los linfocitos T, linfocitos B y eosinófilos en sangre, timo y bazo de ratones de cepa Balb/C inoculados con dos dosis diferentes de huevos larvados de *Toxocara canis*.

## 5. MATERIAL Y METODOS

### 5.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se utilizaron ratones machos de la Cepa Balb/C, de 7 a 9 semanas de edad. Los animales fueron alimentados con un producto comercial para roedores y agua purificada *ad libitum*. Se mantuvieron a temperatura ambiente y en ciclos de luz de 12 x 12.

### 5.2 OBTENCIÓN Y CULTIVO DE HUEVOS DE *T. canis*

Los gusanos adultos de *Toxocara canis* se obtuvieron del intestino delgado de cachorros de perro (*Canis familiaris*) de entre 2 a 4 meses de edad. Estos caninos fueron donados por los Centros Antirrábicos de los Municipios de Cuautitlán Izcalli, Tecámac y Coacalco. Los animales se sacrificaron por medio de una inyección intraperitoneal ó intracardiaca de Pentobarbital sódico (Anestesal, Pfizer) a dosis - efecto. Se realizó la necropsia y se localizaron e identificaron gusanos adultos de *T. canis* en el intestino. Se separaron los gusanos hembras y se colocaron en cajas Petri con solución salina fisiológica (SSF), posteriormente se hicieron cortes en ambos extremos del gusano, y se extrajo el útero, que a su vez se maceró. El macerado del útero se filtró en un colador fino para separar los huevos de los restos del parásito. Los huevos se incubaron a 30°C durante 21 días en cajas Petri con SSF y formol al 1%. Al término del proceso se verificó la viabilidad de cada uno de los cultivos mediante la observación al microscopio compuesto del movimiento larvario (Alba, 1999).

### 5.3 INFECCIÓN EXPERIMENTAL

Para la inoculación de los ratones inicialmente se cuantificó el número de huevos larvados viables. El criterio para determinar un huevo viable fue observar la larva bien formada dentro del huevo y con movimiento. Para cuantificar el número de huevos larvados se empleó la técnica descrita por Ohima en 1961 con algunas modificaciones. Las diferentes cantidades de huevos larvados para las

inoculaciones se resuspendieron 0.2ml de SSF y se inocularon mediante una sonda gástrica, la cual se introdujo por vía oral hasta el estómago; para asegurarnos que la sonda llegó a estómago y no a pulmón, se detectó la salida de aire por la sonda, en este caso, la sonda se removió y se repitió el procedimiento; los ratones del grupo control recibieron 0.2ml de SSF.

#### 5.4 OBTENCIÓN Y TINCIÓN DE CÉLULAS.

Con el objeto de obtener células para los ensayos de citometria de flujo, los ratones fueron sacrificados por desnucamiento, inmediatamente se expuso el corazón incidiendo en tórax para obtener la sangre. Se utilizaron jeringas y agujas estériles y la muestra se depositó en tubos estériles, los cuales contenían ácido etilen-diamino-tetracético (EDTA) en dilución al 10% y a dosis de una gota por ml de sangre. Se obtuvo además timo y bazo, los cuales se colocaron en cajas Petri con SSF.

Los órganos colectados (timo y bazo) se disgregaron por macerado sobre una malla metálica fina, presionando con el émbolo de una jeringa, las células disgregadas se colectaron en una caja Petri que contenía solución buffer de fosfatos (PBS). Concluido el macerado, la suspensión de células se centrifugó a 1000rpm durante 10 minutos a 4°C, se resuspendieron en 1ml de PBS. Se contaron las células en una cámara de Newbauer y se ajustó la concentración a  $10^7$  células/ml.

Para la tinción de células, se agregaron a los tubos 100µl de sangre o de la suspensión celular y 20µl de cada conjugado de anticuerpos, se mezcló e incubó en obscuridad a temperatura ambiente por 30 minutos. Siempre se utilizó un tubo sin anticuerpos por cada órgano, incluyendo sangre, para el control de la autofluorescencia. A los tubos que contenían las muestras de sangre se les agregó 1 ml de solución de lisis de los eritrocitos (anexo); se incubó durante 5 minutos en las condiciones anteriores. Las muestras se fijaron con la adición de formaldehído para alcanzar una concentración final de 1%.

Para cada muestra se utilizaron 3 tubos, al primero se le agregaron 20 $\mu$ l de antiCD4 con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y 20  $\mu$ l de antiCD3 con ficoeritrina (PE), al segundo se agregaron 20  $\mu$ l de antiCD8-FITC y 20  $\mu$ l de antiCD19-PE y por ultimo al tercero se le agregaron 20  $\mu$ l de antiCD23-PE.

### 5.5 CONJUGADOS PARA TINCIÓN.

Para llevar a cabo la tinción de células disgregadas, se utilizaron los siguientes anticuerpos anti-ratón: AntiCD3 conjugado con FITC, el cual se une al CD3 presente en la superficie de los linfocitos, antiCD4 conjugado con PE que se une al CD4 presente en la superficie de linfocitos T cooperadores, antiCD8 conjugado con FITC que se une a la superficie de linfocitos T citotóxicos, antiCD19 conjugado con PE que se une a la superficie de los linfocitos B, y antiCD23 conjugado con PE que se une a la superficie de los eosinófilos, todos ellos de la marca Beckton-Dickinson (BD).

### 5.6 LECTURA EN EL CITÓMETRO DE FLUJO.

Se utilizó un citómetro FACScalibur de Becton Dickinson, con lectura simultánea de 4 colores y 15 parámetros. Se utilizó el software Cellquest de BD para el análisis. Se hizo un gráfico en dos dimensiones de tamaño contra granularidad y se seleccionó la región de interés, linfocitos y/o granulocitos. Se obtuvieron gráficos de dos dimensiones de CD4 vs CD3, CD8 vs CD19, y un histograma de frecuencias de CD23.

### 5.7 DISEÑO EXPERIMENTAL.

Los 120 ratones utilizados se dividieron en 3 grupos, dos de ellos con 48 animales y uno con 24 animales. Los ratones del grupo 1 (48 ratones) se inocularon con 500 huevos larvados de *T. canis* (hITc). Los del grupo 2 (48 ratones) se inocularon con 2500 hITc. Los ratones del grupo 3 (24 ratones) solo recibieron SSF y se utilizaron como grupo testigo.

Se sacrificaron por desnucamiento 6 ratones de cada grupo experimental y 3 del grupo control a diferentes periodos (1, 3, 5, 7, 15, 30, 60 100 días post-inoculación). Una vez sacrificados los animales se extrajeron sangre, timo y bazo. Los órganos se procesaron para obtener células, las cuales se tiñeron con anticuerpos monoclonales marcados, se contaron en el citómetro 10,000 células y se obtuvo el porcentaje de células marcadas en cada órgano muestreado.

## 5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con el objeto de analizar la concentración de los diferentes tipos celulares en sangre, se calculó la distribución normal de una población sana (animales del grupo testigo) y se calculó el intervalo de confianza ( $p < 0.05$ ). Se calculó un intervalo de confianza agregando a la media  $\pm$  dos veces la desviación estándar. Cualquier punto fuera de esta franja en la gráfica, fue considerado diferente estadísticamente a la media de los normales con una confianza del 95% (Daniel, 1974; Cartas-Chiñas, 1987).

Para analizar los resultados de timo y bazo se utilizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey. Las pruebas se realizaron con el programa estadístico SPSS.

Los datos utilizados de timo y bazo fueron normalizados de la siguiente manera: Los datos obtenidos de cada grupo experimental se multiplicaron por el factor proporcional del grupo testigo. El factor proporcional se obtuvo de dividir el número del grupo testigo del día entre la media de todos los animales testigo.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 SANGRE.

La cinética del porcentaje de linfocitos T (CD3), linfocitos T cooperadores (CD4+), linfocitos T citotóxicos (CD8+), linfocitos B (CD19) y eosinófilos (CD23) presentes en sangre de animales inoculados con diferentes cantidades de huevos larvados de *Toxocara canis* (hITc) se presentan en las figuras 6.1, 6.2, 6.3, 6.4 y 6.5. Dado que para la determinación se agrupó en una sola muestra la sangre de los animales de cada grupo, no fue posible obtener una desviación estándar, por lo que los datos de los animales inoculados se compararon con los obtenidos de una población sana (20 animales testigo). Se hizo una banda de 2 veces la desviación estándar de los animales sanos y los datos de los animales inoculados que quedaran fuera de esta banda fueron considerados estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

El porcentaje de linfocitos T de los animales inoculados con hITc en general fue mayor que los animales del grupo testigo, estas diferencias fueron estadísticamente significativas para el grupo de los ratones inoculados con 2500 hITc los días 1 y 5 post-inoculación (pi) y para el grupo inoculado con 500 hITc únicamente el día 7 ( $p < 0.05$ ) (figura 6.1.1).

Los linfocitos T CD4+ sanguíneos para ambos grupos experimentales presentaron un pico de aumento ( $p < 0.05$ ) en comparación con los animales del grupo testigo entre los días 5 y 7 y el grupo inoculado con 2500 hITc presentó un segundo pico al día 60 pi (figura 6.1.2).

El porcentaje de linfocitos T CD8+ sanguíneos fue mayor ( $p < 0.05$ ) para el grupo inoculado con 2500 hITc en comparación con el grupo testigo los días 1 y 3 pi y en el grupo inoculado con 500 hITc fueron mayores ( $p < 0.05$ ) los días 1, 7, 15 y 100 pi (figura 6.1.3).

Los ratones de los dos grupos experimentales presentaron un mayor porcentaje ( $p < 0.05$ ) de linfocitos B (CD19) sanguíneos en relación al grupo testigo los días 5, 7, 15 y 100 pi (figura 6.1.4).



Los eosinófilos sanguíneos de los animales inoculados de ambos grupos presentaron dos picos de aumento ( $p < 0.05$ ), el primero a los días 1, 3 y 5 pi, el segundo al día 15 pi. Los animales del grupo inoculado con 2500 hITc presentaron menor ( $p < 0.05$ ) porcentaje de eosinófilos en sangre que el grupo testigo al día 30 pi y los ratones inoculados con 500 hITc presentaron menor ( $p < 0.05$ ) porcentaje de eosinófilos al día 60 pi (figura 6.1.5).

## 6.2 TIMO.

El Timo y el Bazo fueron extraídos y trabajados por separado según la metodología descrita, por lo que se tiene un dato por cada individuo, esto nos permite tener datos suficientes para poder ser examinados por medios estadísticos. Los datos se normalizaron según la forma descrita en material y métodos, y con estos datos ya normalizados, se llevó a cabo la prueba de ANOVA y Tukey para analizar si existe diferencia estadística de los grupos experimentales con respecto al grupo testigo.

El porcentaje de linfocitos T totales (CD3+) presentes en timo se observan en la figura 6.2.1. Los ratones inoculados con 500 hITc presentaron mayor porcentaje de linfocitos que el grupo testigo los días 1, 3 y 15 pi y un menor porcentaje al día 60 pi ( $p < 0.05$ ). El grupo de animales inoculados con 2500 hITc presentaron mayor porcentaje de linfocitos totales que el grupo testigo a los días 1, 3, 15 y 100 pi y un menor porcentaje a los días 5, 7 y 60 pi ( $p < 0.05$ ). La comparación de los porcentajes de linfocitos T CD3+ en timo de los dos grupos de animales inoculados mostró diferencias ( $p < 0.05$ ) los días 5, 7, 60 y 100 pi.

El porcentaje de linfocitos T CD4+ presentes en timo se observan en la figura 6.2.2. Los ratones inoculados con 500 hITc presentaron un mayor porcentaje de células CD4+ los días 1 y 3 pi., por lo contrario, el día 60 posterior a la inoculación el porcentaje fue menor que el grupo testigo ( $p < 0.05$ ). Los animales inoculados con 2500 hITc mostraron mayor porcentaje de células CD4+ que el grupo testigo a los días 1, 3, 15 y 100 y se observa una menor cantidad a los días

5, 7 y 60 ( $p < 0.05$ ). La diferencia entre ambos grupos experimentales se presentó los días 5, 7 y 60 pi. ( $p < 0.05$ ).

El porcentaje de linfocitos T CD8+ presentes en timo se muestran en la figura 6.2.3. El grupo inoculado con 500 hITc presentó un mayor porcentaje de células T CD8+ que el grupo testigo el día 3 pi y un menor porcentaje los días 30 y 60. El grupo con 2500 hITc presentó un mayor porcentaje de células T CD8+ el día 3 pi y un menor porcentaje los días 7, 30 y 60 .i. ( $p < 0.05$ ). Existen diferencias estadísticas entre los grupos experimentales los días 5, 7 y 30 pi. ( $p < 0.05$ ).

Los linfocitos B (CD19) presentan un porcentaje mayor en el grupo inoculado con 2500 hITc los días 5, 7 y 30, presentando un menor porcentaje en este mismo grupo los días 3 y 15, en cambio, en el grupo inoculado con 500 hITc se presentó un menor porcentaje con respecto al grupo testigo los días 3 y 15 pi ( $p < 0.05$ ). La comparación estadística entre los grupos experimentales muestra diferencias los días 3, 5, 7, 15 y 30 pi. ( $p < 0.05$ ) se observan en la figura 6.2.4.

El conteo de eosinófilos (CD23) en timo de los animales inoculados con 500 hITc fue menor los días 3 y 5 y presentó un mayor porcentaje al día 60, en comparación, el grupo inoculado con 2500 hITc presentó mayor porcentaje los días 7, 30 y 60, y un menor porcentaje solamente el día 3 pi ( $p < 0.05$ ). La diferencia entre los grupos experimentales se presentó los días 5, 7, y 30 pi ( $p < 0.05$ ) se observan en la figura 6.2.5.

### 6.3 BAZO.

En bazo se encontró que los linfocitos T totales (CD3+) en el grupo inoculado con 500 hITc presenta un mayor porcentaje el día 7 y menor porcentaje los días 5, 15 y 30 ( $p < 0.05$ ). El grupo inoculado con 2500 hITc presenta mayor porcentaje el día 7 y menor porcentaje de linfocitos totales los días 3, 5, 15 y 30 pi ( $p < 0.05$ ). Hubo diferencia entre los grupos experimentales los días 7 y 30 pi ( $p < 0.05$ ) se observan en la figura 6.3.1.

Para los linfocitos T CD4+ del grupo inoculado con 500 huevos larvados presentó mayor porcentaje el día 7 y menor porcentaje de células los días 5 y 30

pi ( $p < 0.05$ ). El grupo de 2500 presentó mayor porcentaje los días 1 y 7 y menor porcentaje de linfocitos T CD4+ a los días 3, 5, 30 y 60 pi ( $p < 0.05$ ) se observan en la figura 6.3.2.

En cuanto a los linfocitos T CD8+ ambos grupos experimentales presentaron un mayor porcentaje de células con respecto al grupo testigo el día 7, pero la menor cantidad de células en el grupo inoculado con 500 hITc se presentó los días 3, 5 y 15 pi ( $p < 0.05$ ). Para el grupo inoculado con 2500 hITc el menor porcentaje se presentó los días 3, 5, 15, 30 y 100 ( $p < 0.05$ ). La diferencia entre los grupos experimentales se presentó el día 30 pi ( $p < 0.05$ ) se observan en la figura 6.3.3.

Los linfocitos B (CD19) en el bazo se presentaron en mayor porcentaje en el grupo inoculado con 500 huevos larvados los días 5 y 7, presentando un menor porcentaje de células el día 30; comparativamente, el grupo inoculado con 2500 huevos presentó mayor cantidad de células los días 5, 7 y 60, así como un menor porcentaje con respecto al grupo testigo para el día 30 ( $p < 0.05$ ). En cuanto a la diferencia entre los grupos, esta se presentó el día 30 pi ( $p < 0.05$ ) se observan en la figura 6.3.4.

Finalmente, los eosinófilos (CD23) en bazo mostraron mayor porcentaje de células en el grupo inoculado con 500 hITc únicamente el día 5 y menor porcentaje para el día 7 pi ( $p < 0.05$ ). Para el grupo de 2500, el porcentaje fue mayor los días 5, 15 y 100 y el menor porcentaje se presentó el día 7 posterior a la inoculación. ( $p < 0.05$ ) se observan en la figura 6.3.5.

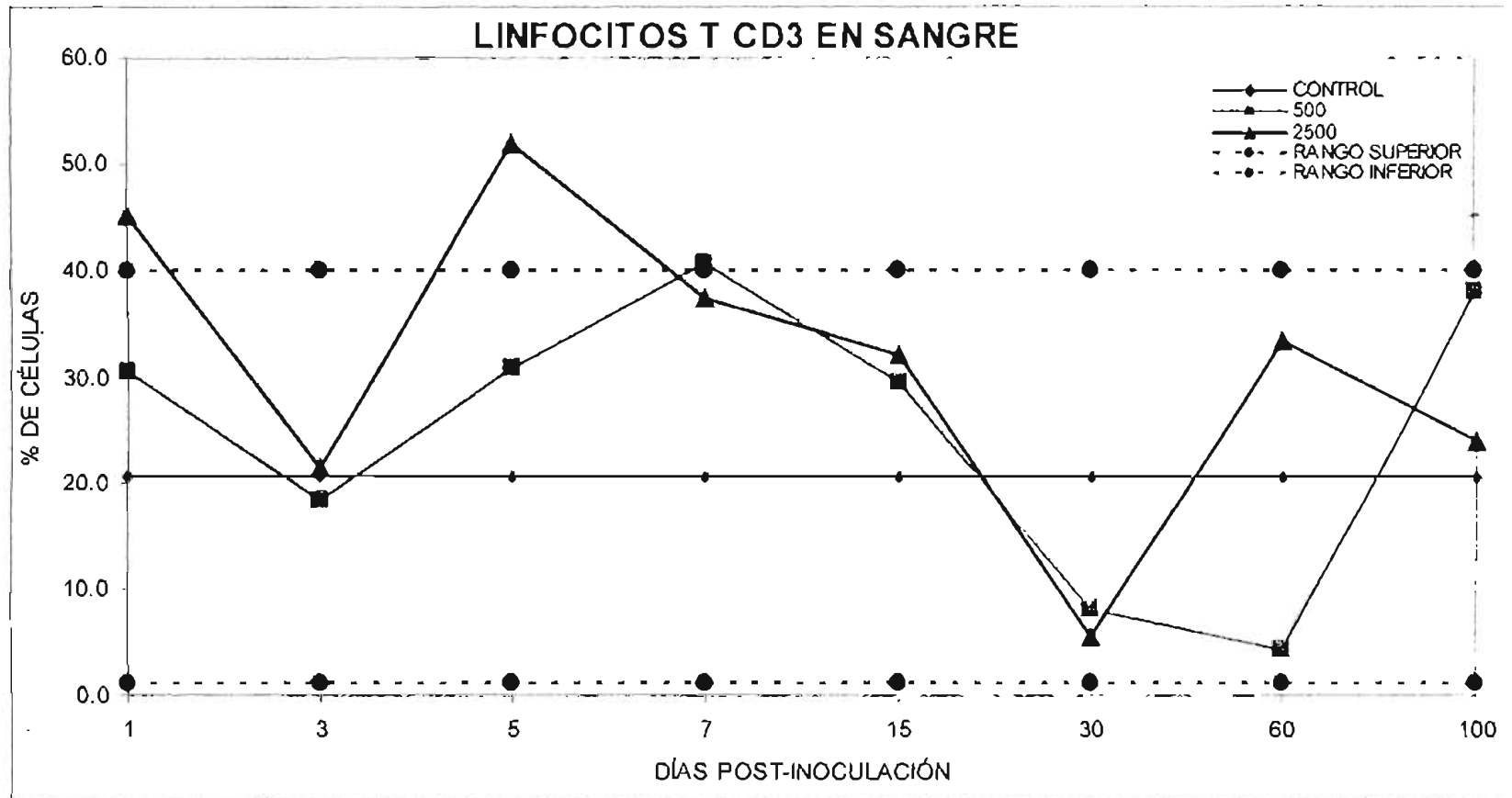


Figura 6.1.1. Porcentaje de Linfocitos T CD3+ en sangre de ratones cepa Balb/C a diferentes días posteriores a la inoculación con huevos larvados de *Toxocara canis* (500 y 2500). Cada valor representa el resultado de agrupar en una sola muestra la sangre de 6 ratones. El grupo testigo representa la media  $\pm$  dos veces la desviación estándar (intervalo de confianza) de 20 ratones normales, los puntos de los grupos inoculados que marquen fuera de las líneas del grupo testigo son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

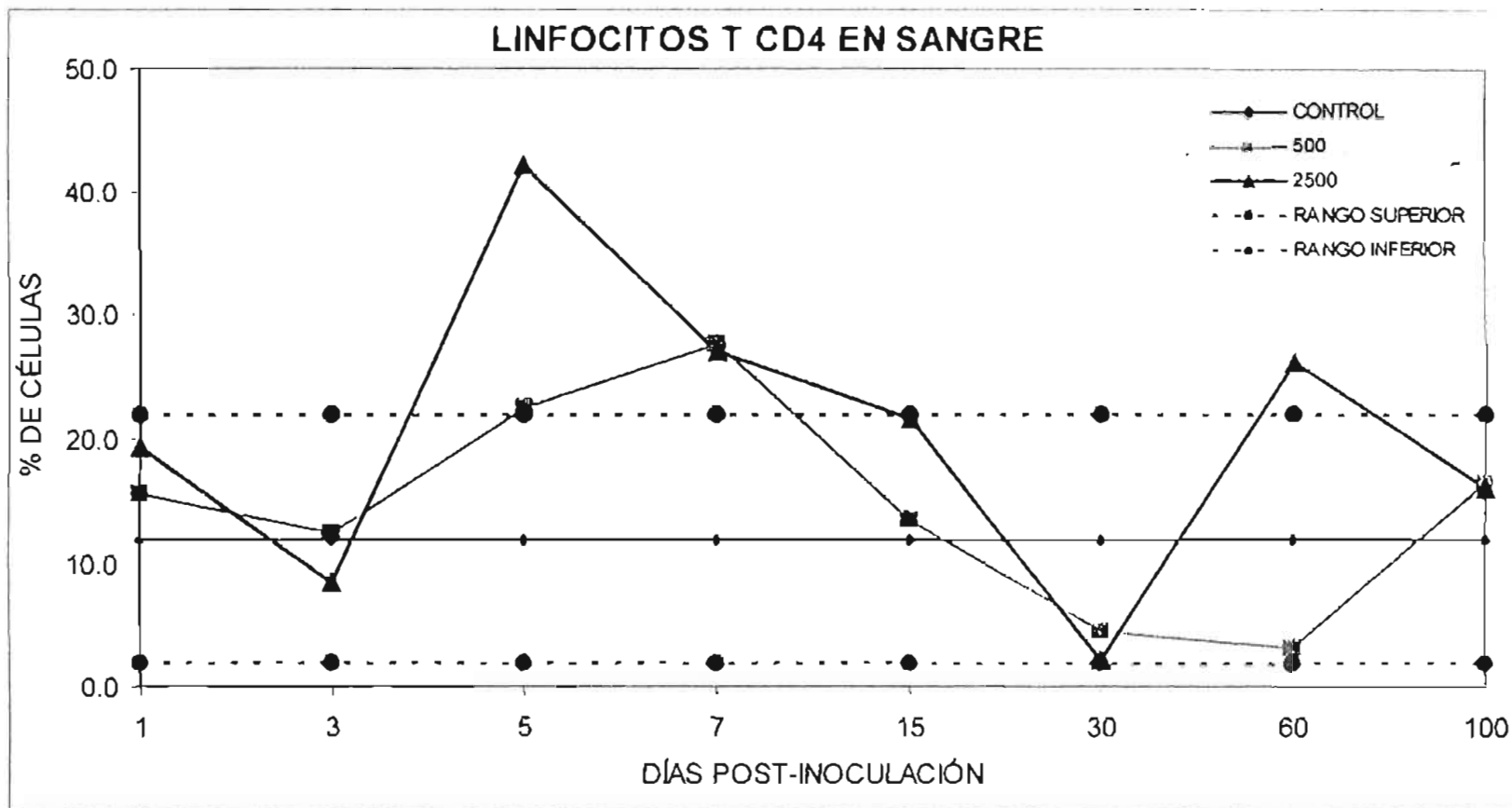


Figura 6.1.2. Porcentaje de Linfocitos T CD4+ en sangre de ratones cepa Balb/C a diferentes días posteriores a la-inoculación con huevos larvados de *Toxocara canis* (500 y 2500). Cada valor representa el resultado de agrupar en una sola muestra la sangre de 6 ratones. El grupo testigo representa la media +/- dos veces la desviación estándar (intervalo de confianza) de 20 ratones normales, los puntos de los grupos inoculados que marquen fuera de las líneas del grupo testigo son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

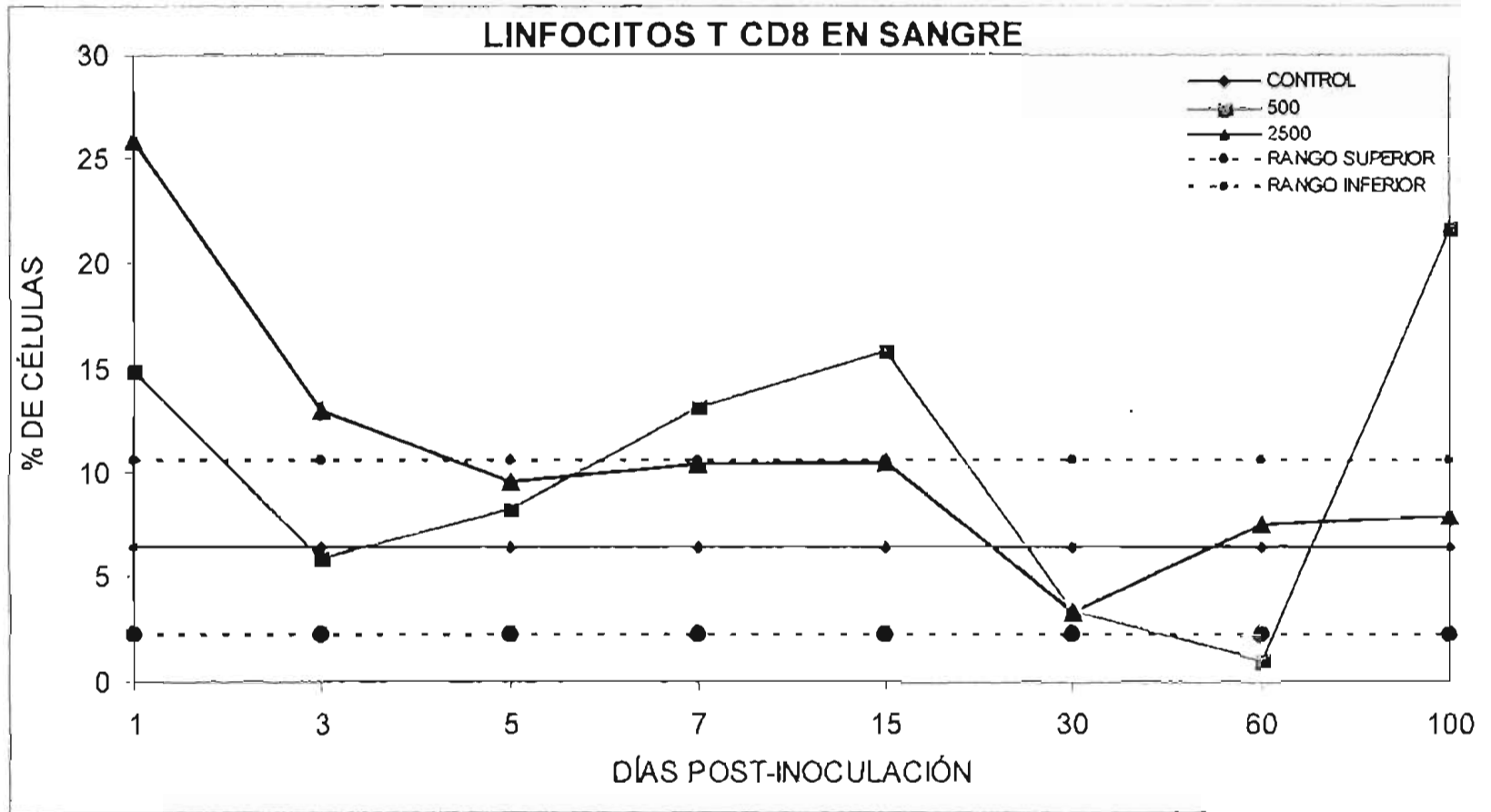


Figura 6.1.3. Porcentaje de Linfocitos T CD8+ en sangre de ratones cepa Balb/C a diferentes días posteriores a la-inoculación con huevos larvados de *Toxocara canis* (500 y 2500). Cada valor representa el resultado de agrupar en una sola muestra la sangre de 6 ratones. El grupo testigo representa la media +/- dos veces la desviación estándar (intervalo de confianza) de 20 ratones normales, los puntos de los grupos inoculados que marquen fuera de las líneas del grupo testigo son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

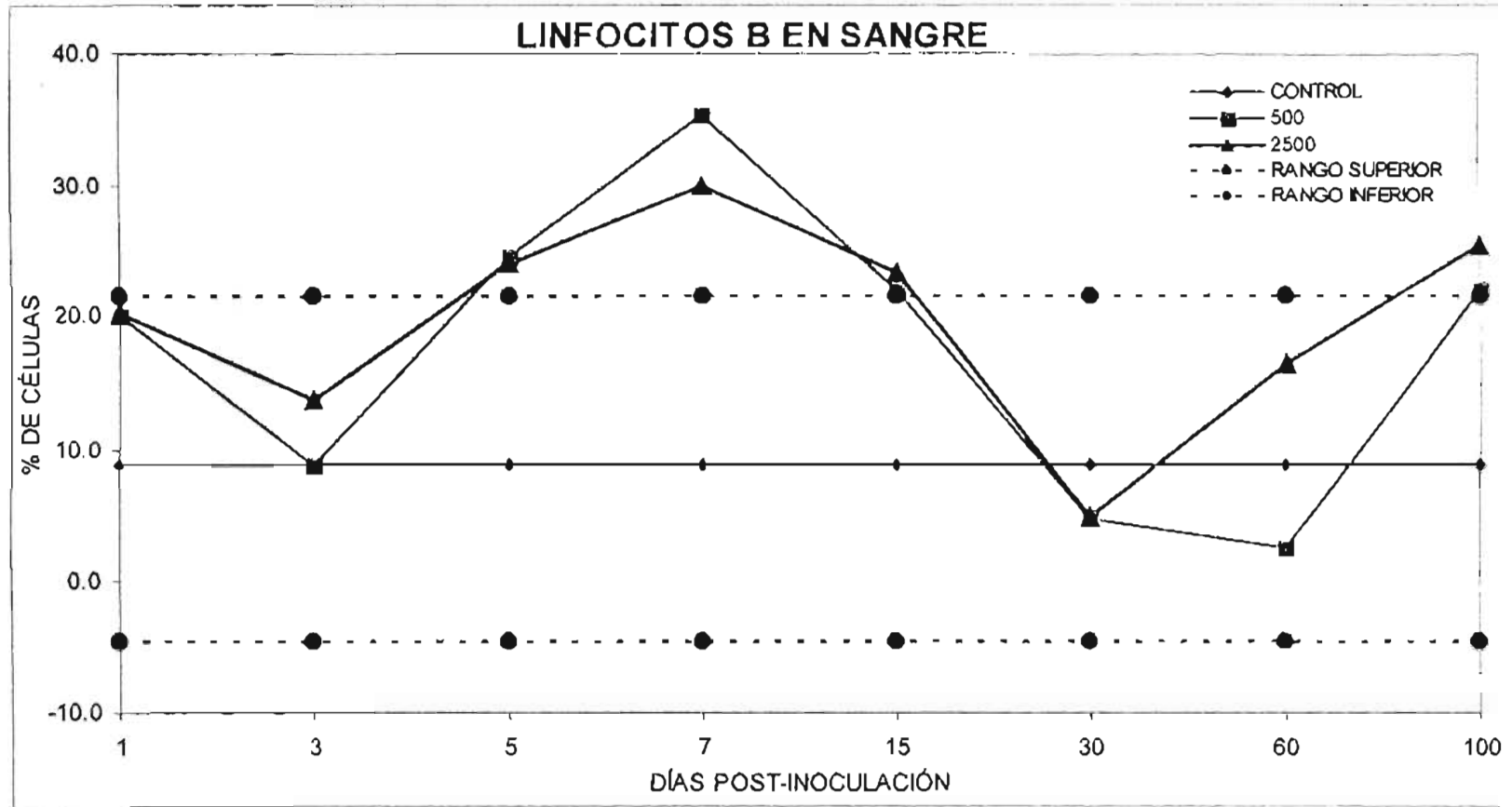


Figura 6.1.4. Porcentaje de Linfocitos B en sangre de ratones cepa Balb/C a diferentes días posteriores a la inoculación con huevos larvados de *Toxocara canis* (500 y 2500). Cada valor representa el resultado de agrupar en una sola muestra la sangre de 6 ratones. El grupo testigo representa la media  $\pm$  dos veces la desviación estándar (intervalo de confianza) de 20 ratones normales, los puntos de los grupos inoculados que marquen fuera de las líneas del grupo testigo son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

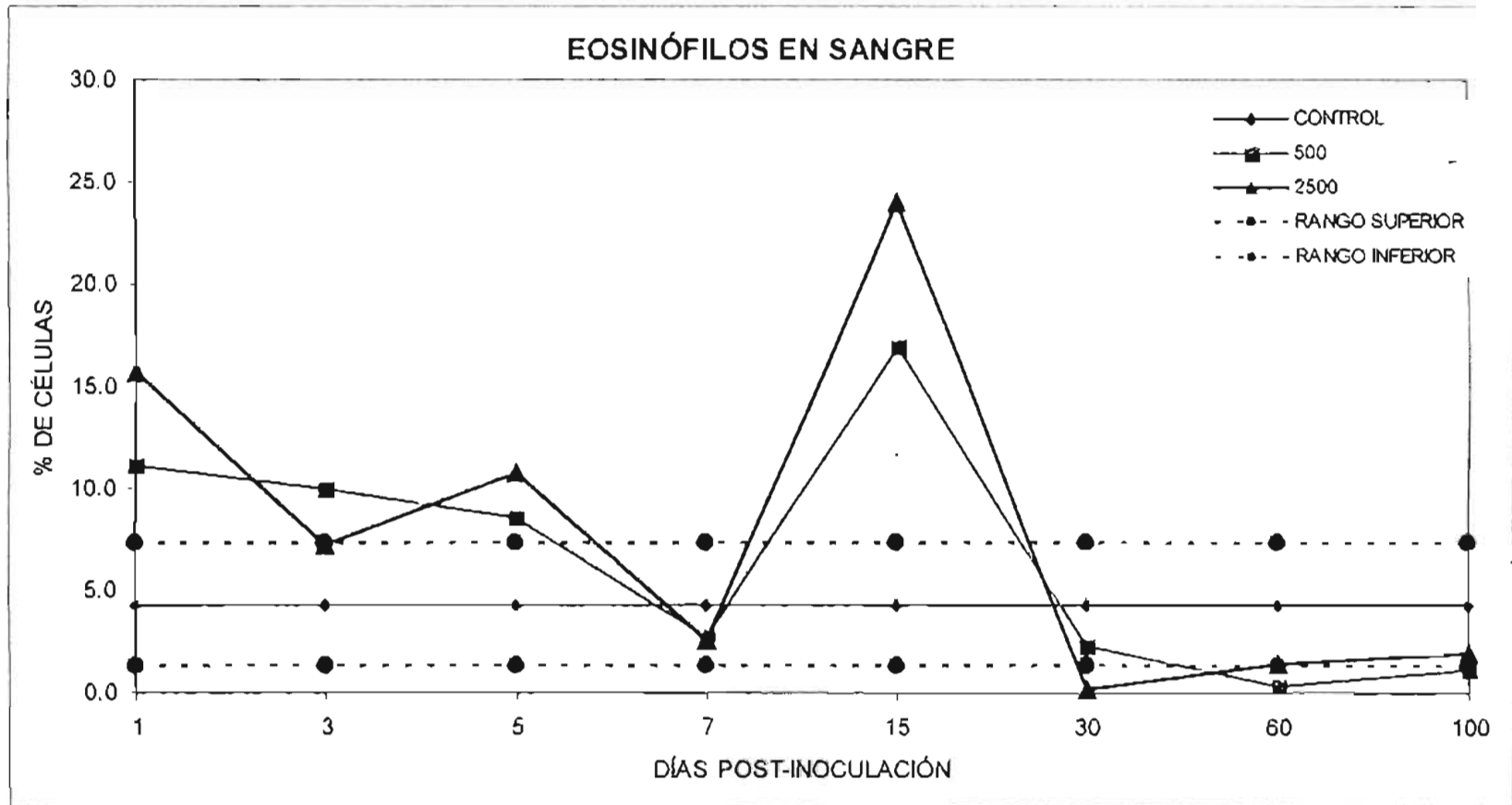


Figura 6.1.5. Porcentaje de eosinófilos en sangre de ratones cepa Balb/C a diferentes días posteriores a la inoculación con huevos larvados de *Toxocara canis* (500 y 2500). Cada valor representa el resultado de agrupar en una sola muestra la sangre de 6 ratones. El grupo testigo representa la media  $\pm$  dos veces la desviación estándar (intervalo de confianza) de 20 ratones normales, los puntos de los grupos inoculados que marquen fuera de las líneas del grupo testigo son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).



CUADRO 6.1.1 PORCENTAJE DE LINFOCITOS T, B Y EOSINÓFILOS EN SANGRE

Cuadro 6.1.1. Se muestran los promedios de los porcentajes de linfocitos T CD3+, CD4+, CD8+, linfocitos B (CD19) y eosinófilos (CD23) en sangre de ratones inoculados con 500 y 2500 huevos larvados de *Toxocara canis* a diferentes tiempos.

SANGRE								
DIAS POST-INOCULACIÓN	1	3	5	7	15	30	60	100
<b>CD3</b>								
CONTROL	22.8	23.7	6.6	29.2	41.3	5.4	5.4	43.0
500	30.6	18.4	30.9	40.8	29.5	8.1	4.3	38.1
2500	45.3	21.6	51.9	37.4	32.2	5.5	33.6	24.0
<b>CD4</b>								
CONTROL	15.7	16.0	5.3	11.0	33.7	2.2	2.2	33.5
500	15.7	12.5	22.6	27.6	13.6	4.7	3.3	16.5
2500	19.4	8.6	42.3	27.0	21.7	2.2	26.1	16.1
<b>CD8</b>								
CONTROL	7.1	7.7	1.3	18.2	7.6	3.2	3.2	9.5
500	14.9	5.9	8.3	13.2	15.9	3.4	1.0	21.6
2500	25.9	13.0	9.6	10.4	10.5	3.3	7.5	7.9
<b>CD19</b>								
CONTROL	3.4	7.6	3.0	18.8	18.6	4.8	4.8	18.0
500	20.0	8.9	24.5	35.4	21.8	4.8	2.6	22.0
2500	20.2	13.8	24.0	30.0	23.3	4.9	16.4	25.3
<b>CD23</b>								
CONTROL	0.3	0.7	2.1	4.7	1.4	0.4	0.4	1.2
500	0.4	1.0	8.6	2.8	1.2	2.3	0.4	0.6
2500	0.2	0.7	10.8	2.6	2.0	0.2	1.4	1.6

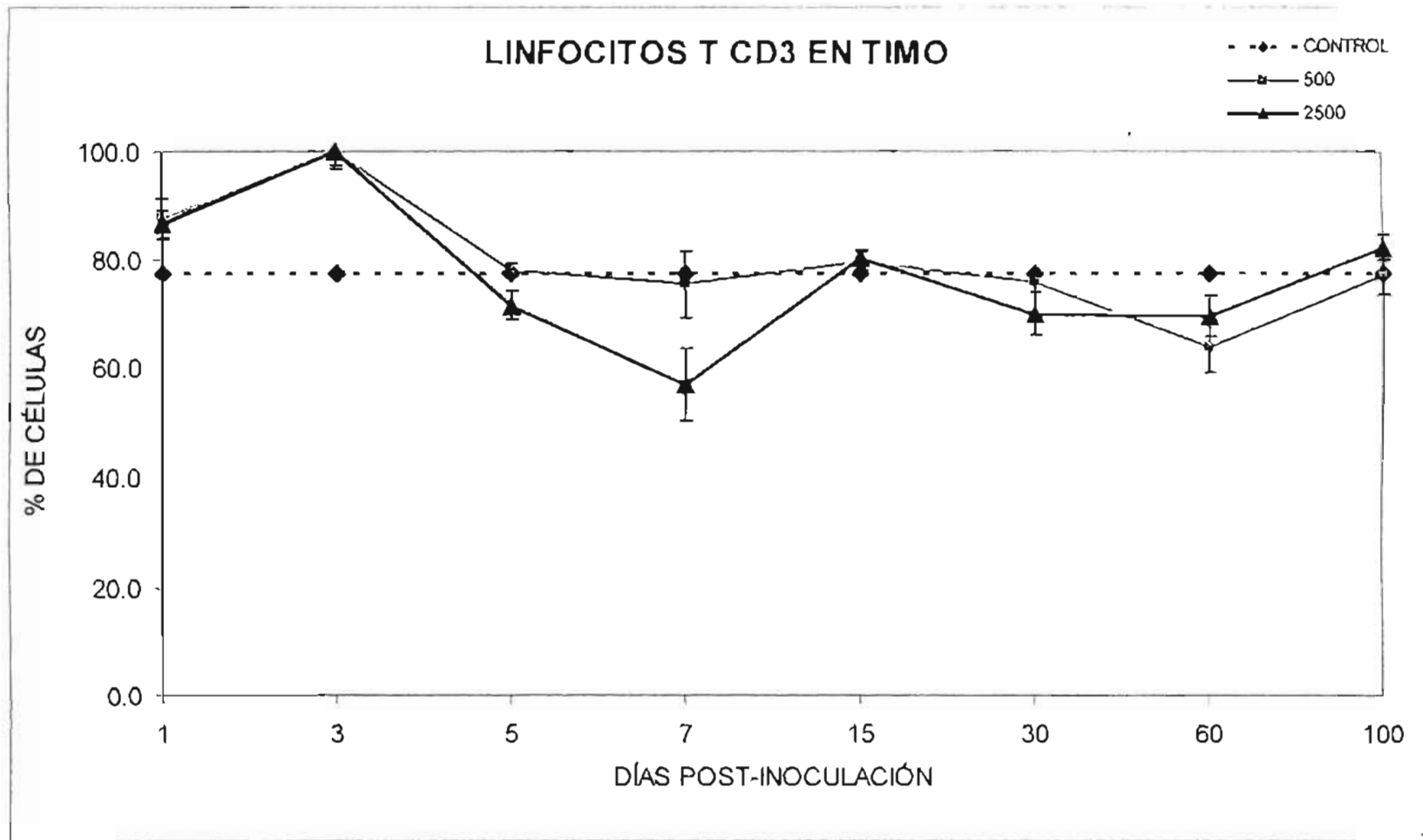


Figura 6.2.1. Porcentaje a diferentes tiempos, de linfocitos T CD3+ en el timo de ratones cepa Balb/C inoculados con huevos larvados de *Toxocara canis* (500 y 2500). Cada valor representa el promedio y la desviación estándar de 6 ratones, el grupo testigo representa la media de 20 ratones normales ( $p < 0.05$ ).

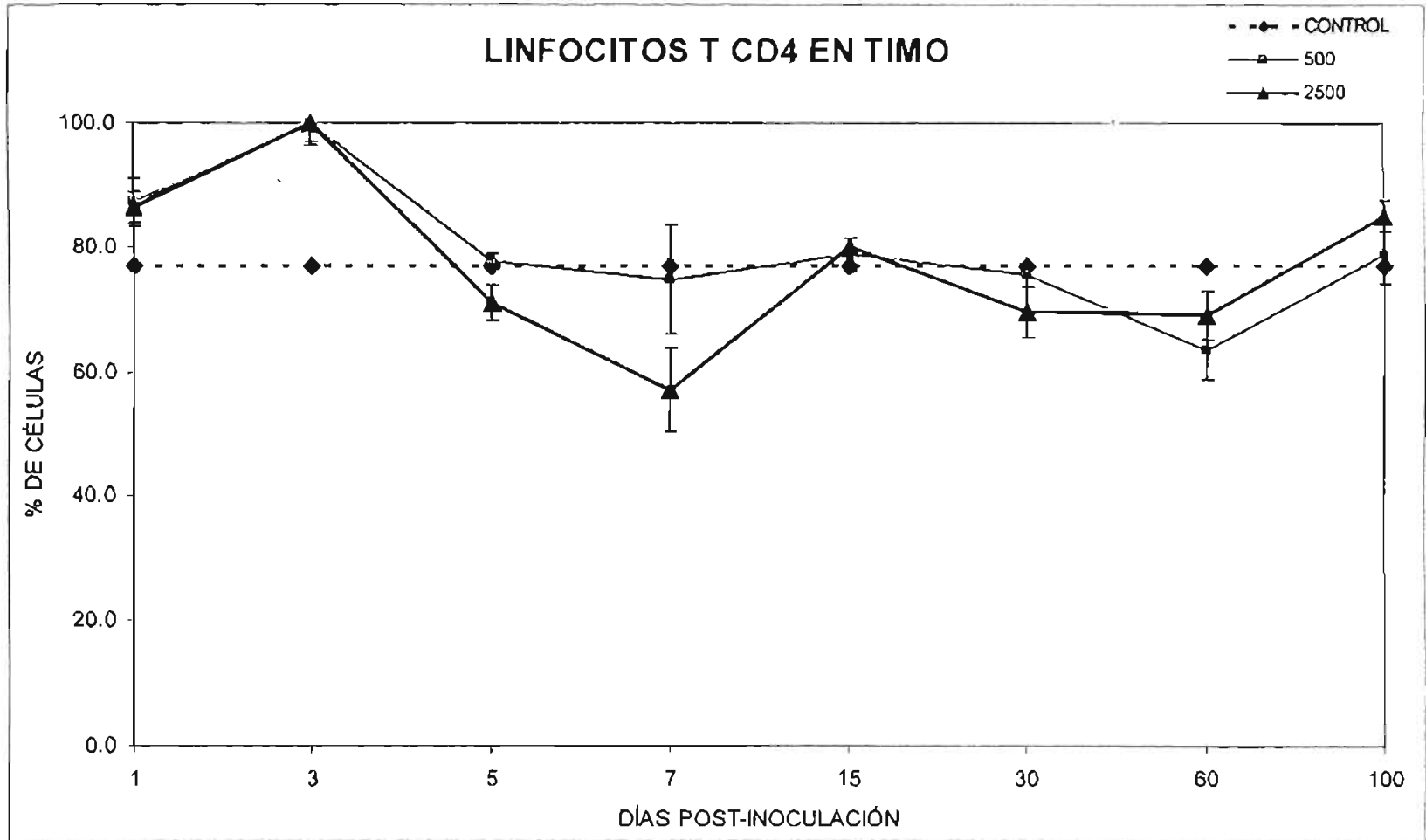


Figura 6.2.2. Porcentaje a diferentes tiempos, de linfocitos T CD4+ en el timo de ratones cepa Balb/C inoculados con huevos larvados de *Toxocara canis* (500 y 2500). Cada valor representa el promedio y la desviación estándar de 6 ratones, el grupo testigo representa la media de 20 ratones normales ( $p < 0.05$ ).

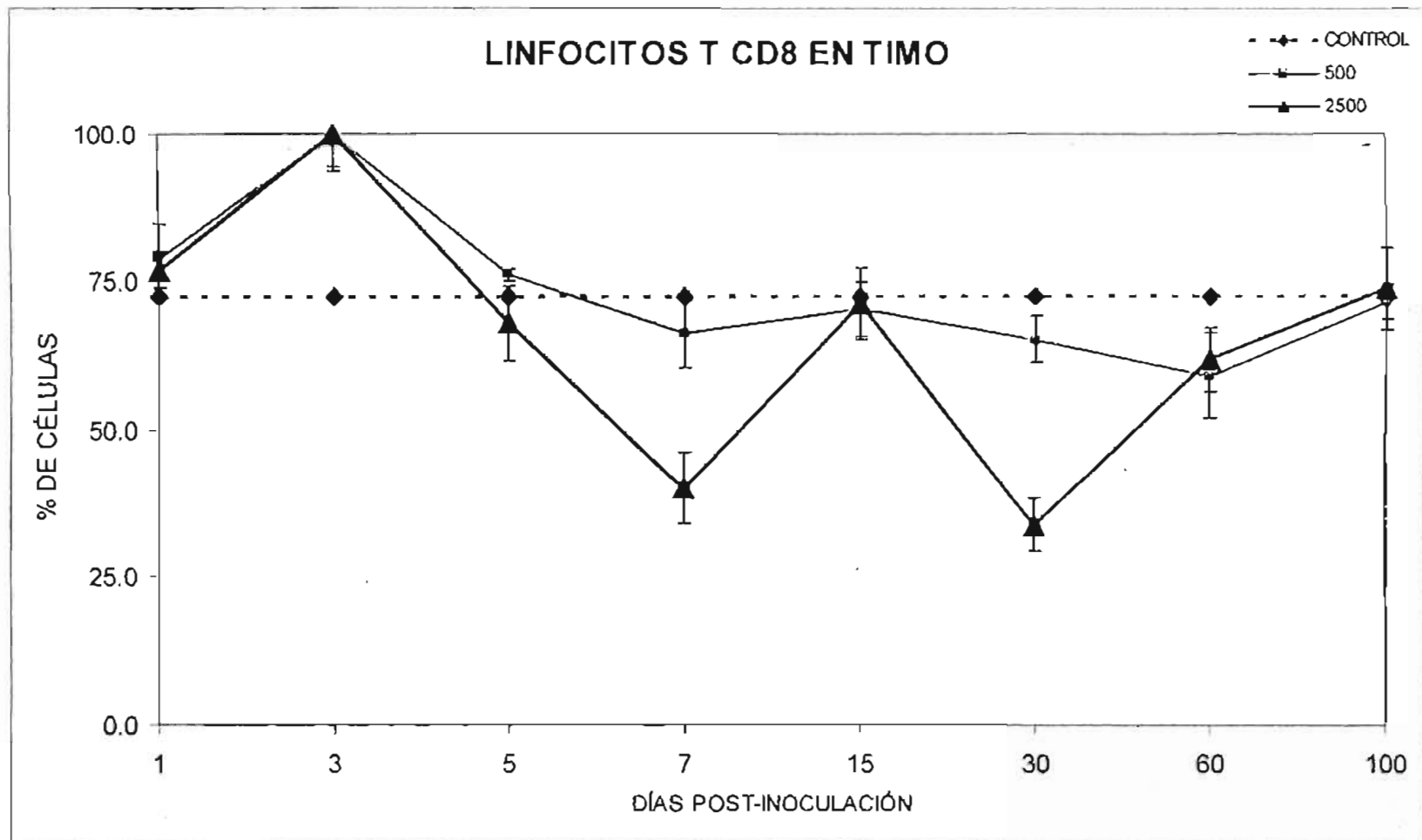


Figura 6.2.3. Porcentaje a diferentes tiempos, de linfocitos T CD8+ en el timo de ratones cepa Balb/C inoculados con huevos larvados de *Toxocara canis* (500 y 2500). Cada valor representa el promedio y la desviación estándar de 6 ratones, el grupo testigo representa la media de 20 ratones normales ( $p < 0.05$ ).

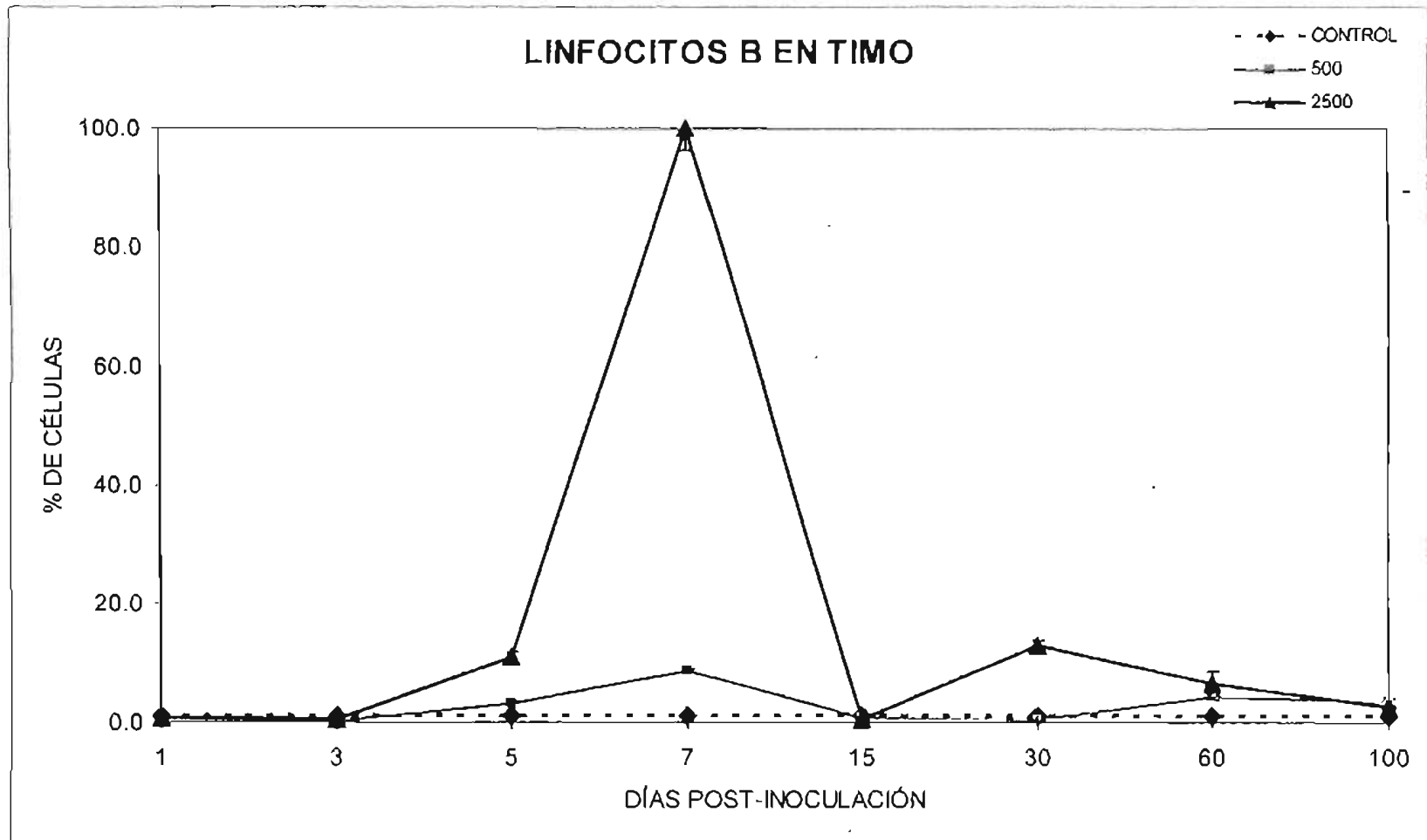


Figura 6.2.4. Porcentaje a diferentes tiempos, de linfocitos B en el timo de ratones cepa Balb/C inoculados con huevos larvados de *Toxocara canis* (500 y 2500). Cada valor representa el promedio y la desviación estándar de 6 ratones, el grupo testigo representa la media de 20 ratones normales ( $p < 0.05$ ).

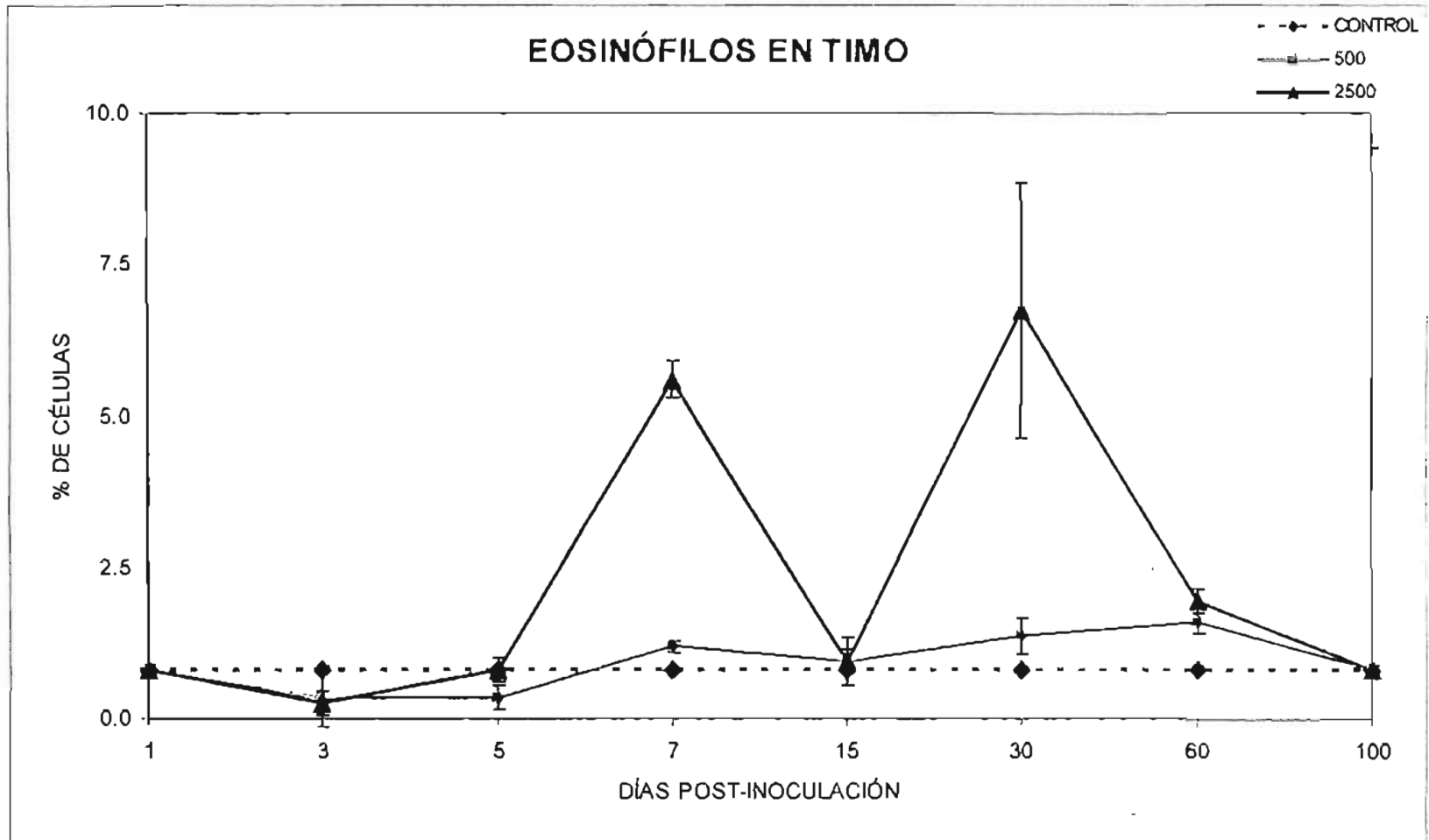


Figura 6.2.5. Porcentaje a diferentes tiempos, de eosinófilos en el timo de ratones cepa Balb/C inoculados con huevos larvados de *Toxocara canis* (500 y 2500). Cada valor representa el promedio y la desviación estándar de 6 ratones, el grupo testigo representa la media de 20 ratones normales ( $p < 0.05$ ).

CUADRO 6.2.1 PORCENTAJE DE LINFOCITOS T, B Y EOSINÓFILOS EN TIMO

Cuadro 6.2.1. Se muestran los promedios de los porcentajes de linfocitos T CD3+, CD4+, CD8+, linfocitos B (CD19) y eosinófilos (CD23) en sangre de ratones inoculados con 500 y 2500 huevos larvados de *Toxocara canis* a diferentes tiempos.

TIMO								
DIAS POST-INOCULACIÓN	1	3	5	7	15	30	60	100
<b>CD3</b>								
CONTROL	66.4	50.8	88.3	82.5	86.2	85.5	85.5	75.1
500	75.1	72.6	89.1	80.3	88.7	83.6	70.4	74.9
2500	74.3	74.8	81.4	60.5	89.5	77.1	76.7	79.8
<b>CD4</b>								
CONTROL	66.3	50.8	88.3	81.6	86.2	85.4	85.4	72.2
500	75.1	71.4	89.1	79.2	88.2	83.6	70.4	74.0
2500	74.3	74.8	81.4	60.5	89.5	77.1	76.7	79.8
<b>CD8</b>								
CONTROL	64.9	42.2	74.6	81.2	84.0	79.1	79.1	75.1
500	70.6	65.8	78.4	74.2	81.4	71.1	64.4	74.0
2500	68.8	59.5	70.0	44.7	82.4	36.6	67.4	76.4
<b>CD19</b>								
CONTROL	1.1	3.7	0.1	0.1	1.4	1.0	1.0	0.3
500	0.8	1.0	0.3	0.8	1.0	0.6	4.0	0.8
2500	0.8	2.4	1.0	21.0	0.6	11.9	6.1	0.6
<b>CD23</b>								
CONTROL	0.2	2.5	1.2	0.2	0.6	0.7	0.7	0.2
500	0.2	1.1	0.5	0.3	0.7	1.2	1.4	0.2
2500	0.2	0.8	1.2	1.4	0.7	5.9	1.7	0.2

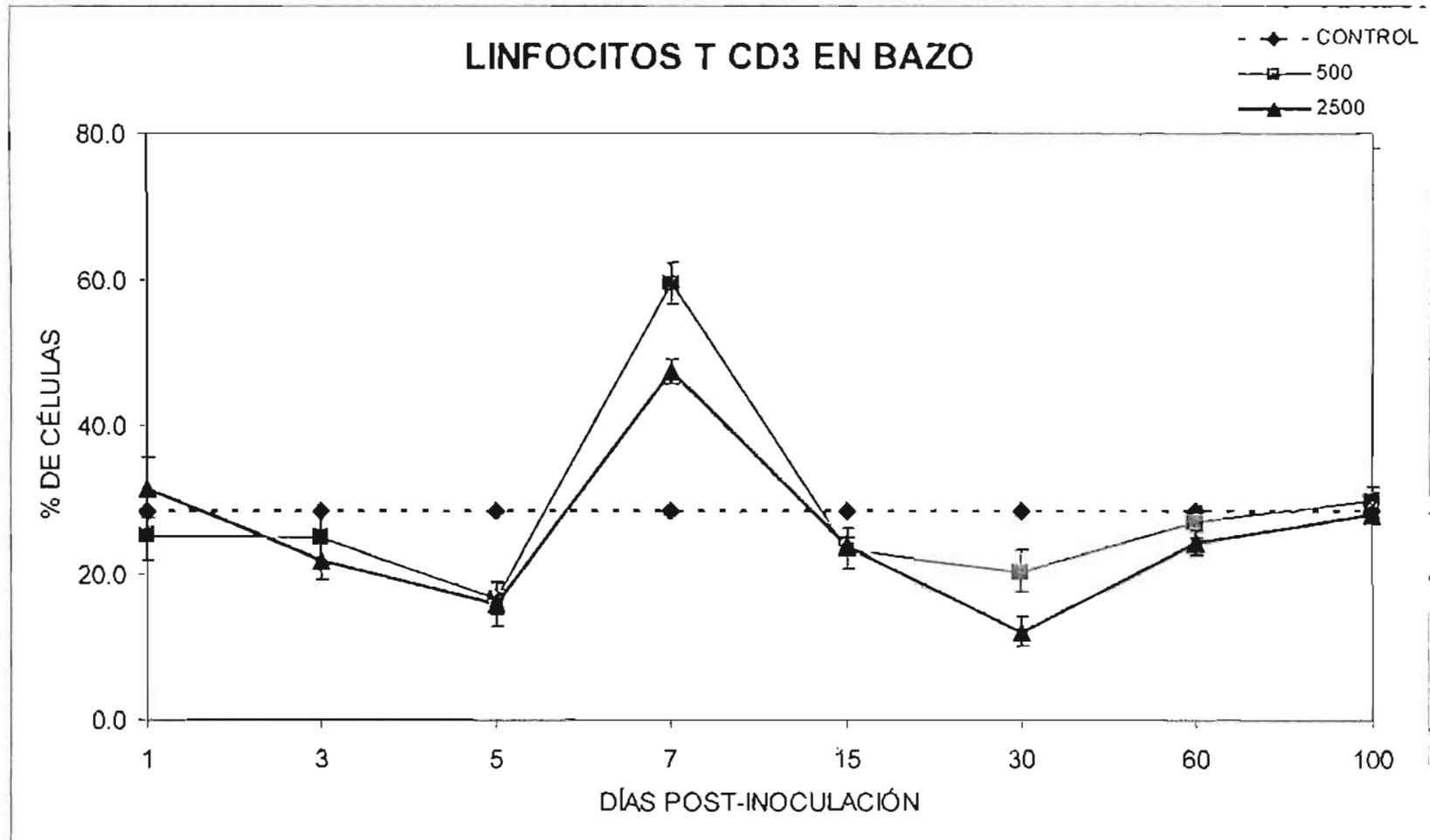


Figura 6.3.1. Porcentaje a diferentes tiempos, de linfocitos T CD3+ en el bazo de ratones cepa Balb/C inoculados con huevos larvados de *Toxocara canis* (500 y 2500). Cada valor representa el promedio y la desviación estándar de 6 ratones, el grupo testigo representa la media de 20 ratones normales ( $p < 0.05$ ).



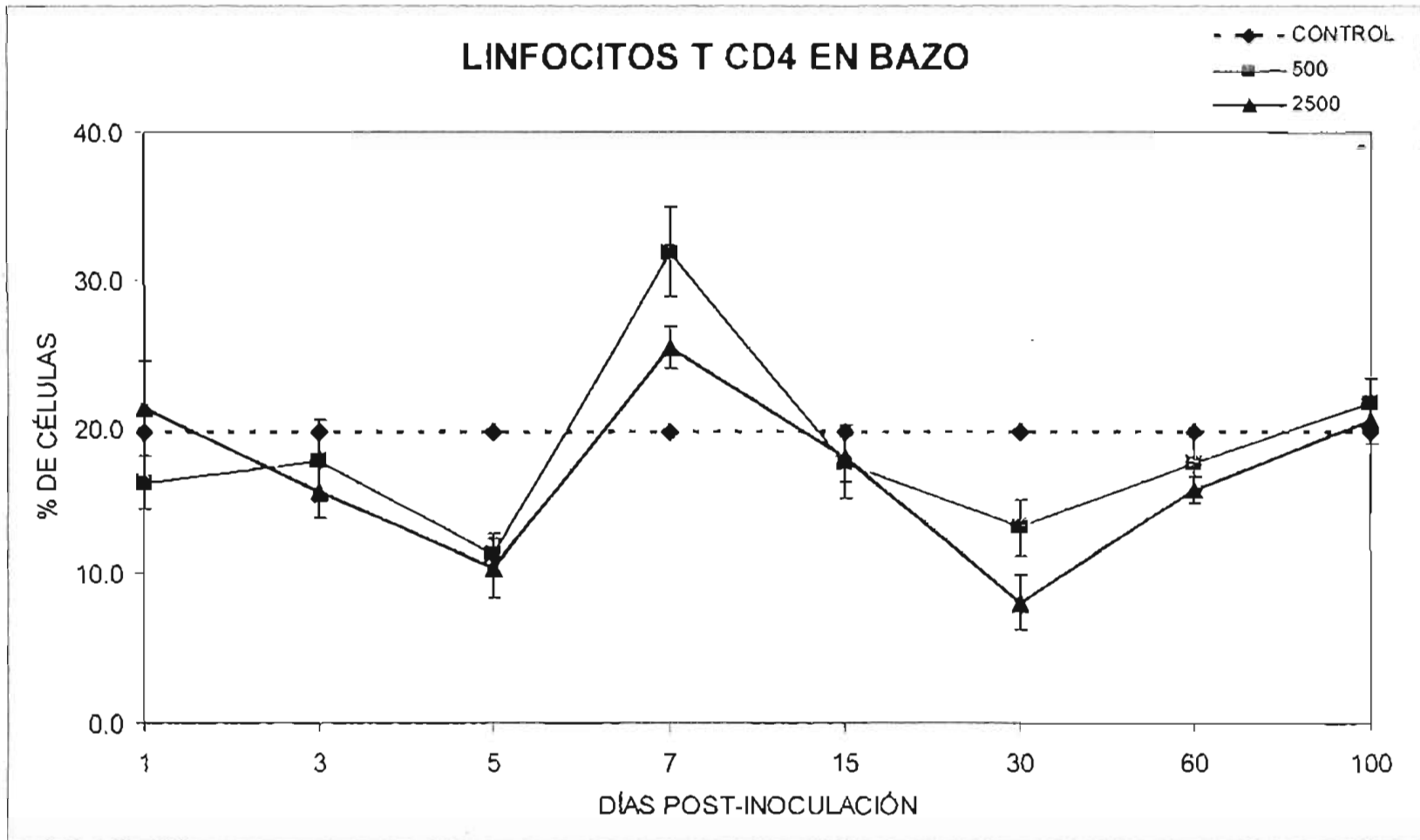


Figura 6.3.2. Porcentaje a diferentes tiempos, de linfocitos T CD4+ en el bazo de ratones cepa Balb/C inoculados con huevos larvados de *Toxocara canis* (500 y 2500). Cada valor representa el promedio y la desviación estándar de 6 ratones, el grupo testigo representa la media de 20 ratones normales ( $p < 0.05$ ).

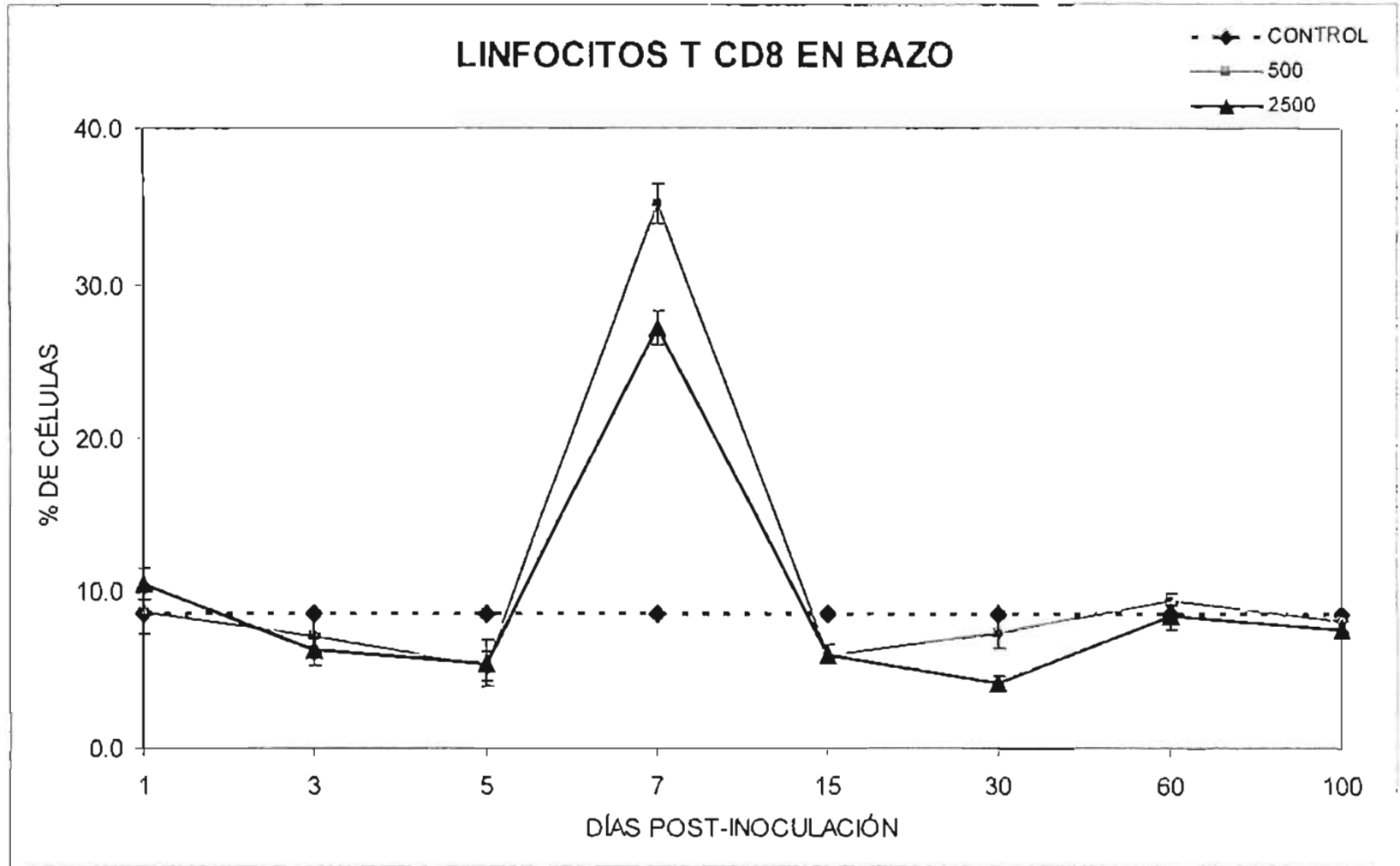


Figura 6.3.3. Porcentaje a diferentes tiempos, de linfocitos T CD8+ en el bazo de ratones cepa Balb/C inoculados con huevos larvados de *Toxocara canis* (500 y 2500). Cada valor representa el promedio y la desviación estándar de 6 ratones, el grupo testigo representa la media de 20 ratones normales ( $p < 0.05$ ).

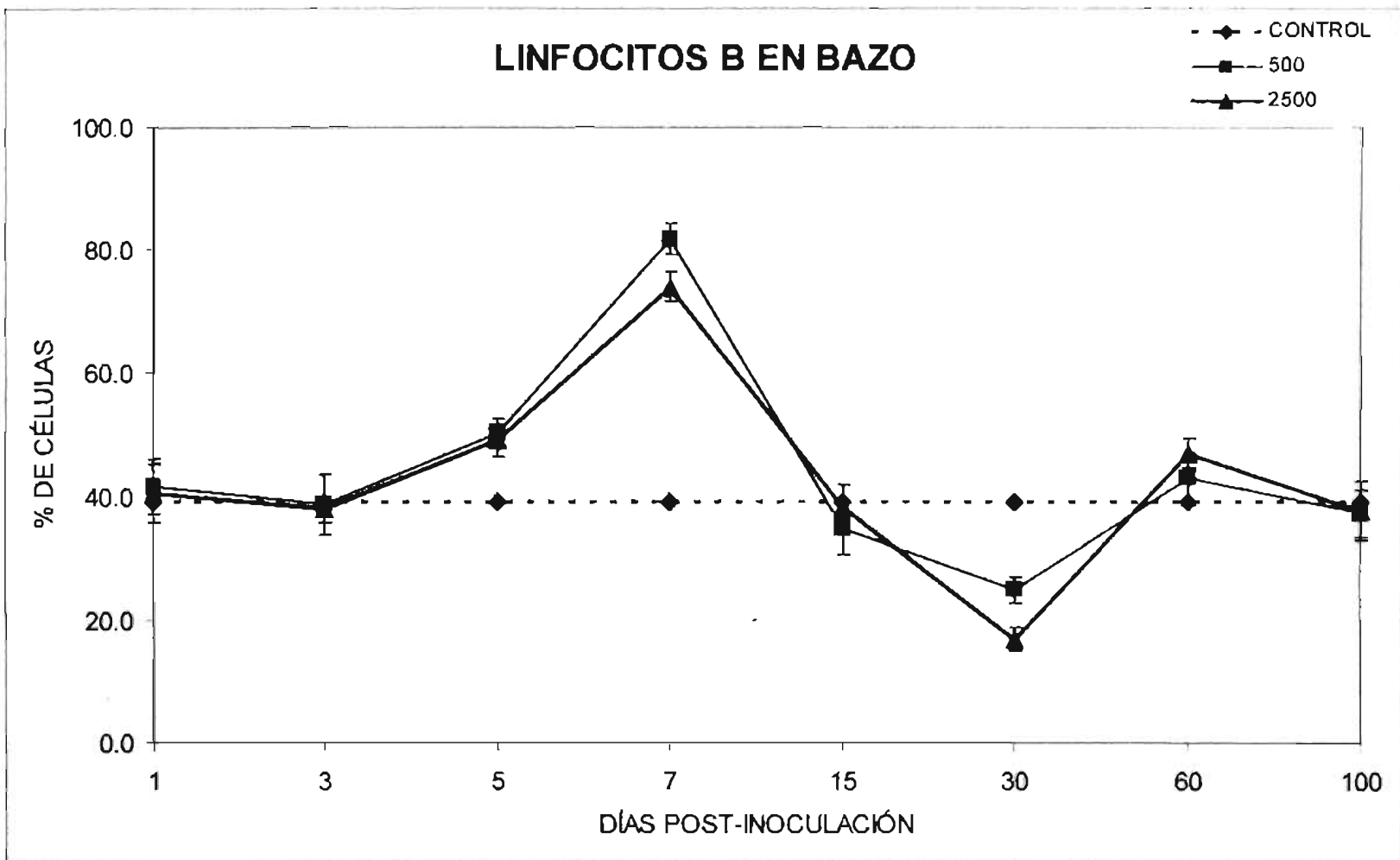


Figura 6.3.4. Porcentaje a diferentes tiempos, de linfocitos B en el bazo de ratones cepa Balb/C inoculados con huevos larvados de *Toxocara canis* (500 y 2500). Cada valor representa el promedio y la desviación estándar de 6 ratones, el grupo testigo representa la media de 20 ratones normales ( $p < 0.05$ ).

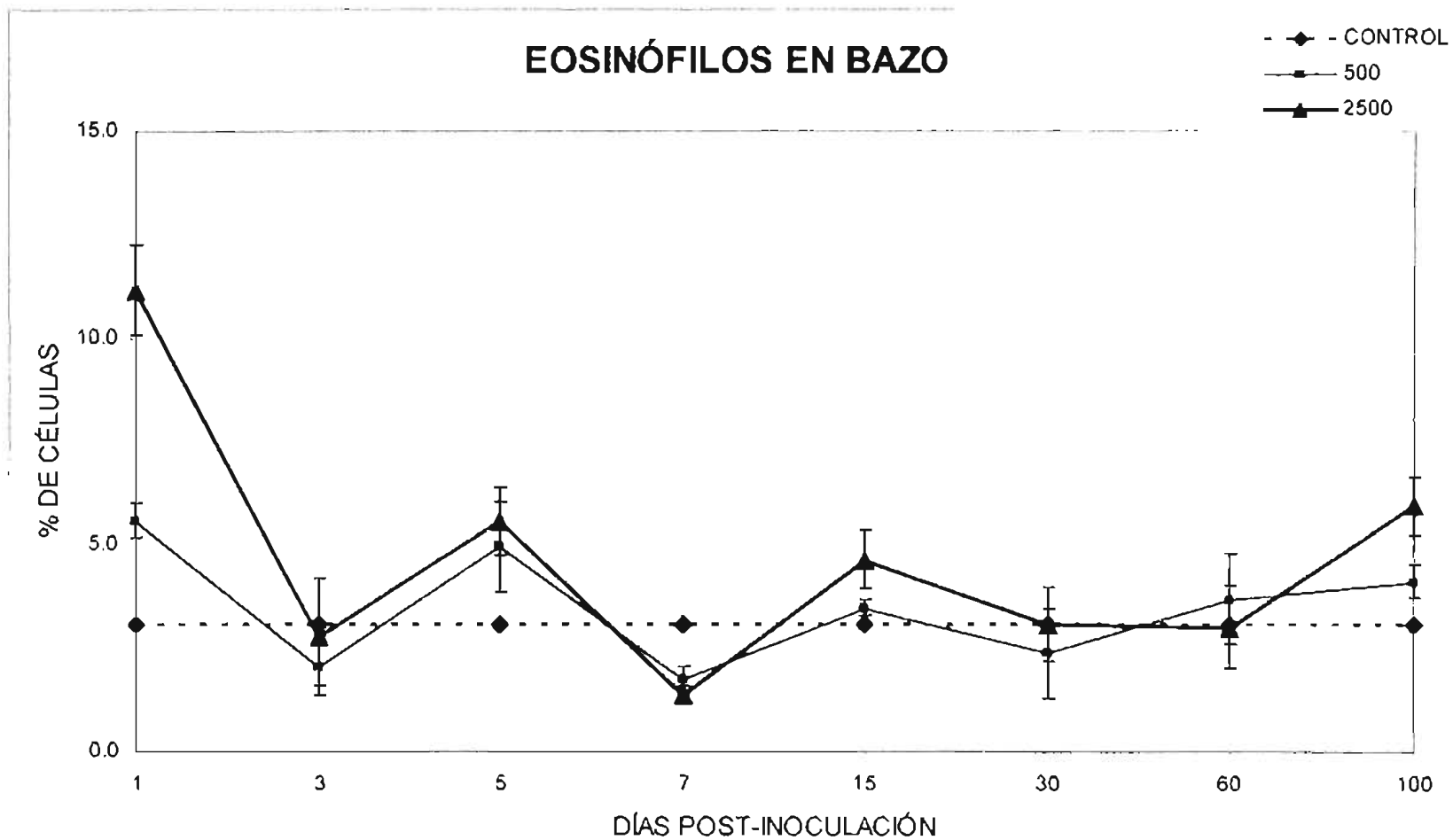


Figura 6.3.5. Porcentaje a diferentes tiempos, de eosinófilos en el bazo de ratones cepa Balb/C inoculados con huevos larvados de *Toxocara canis* (500 y 2500). Cada valor representa el promedio y la desviación estándar de 6 ratones, el grupo testigo representa la media de 20 ratones normales ( $p < 0.05$ )

CUADRO 6.2.1 PORCENTAJE DE LINFOCITOS T, B Y EOSINÓFILOS EN BAZO

Cuadro 6.2.1. Se muestran los promedios de los porcentajes de linfocitos T CD3+, CD4+, CD8+, linfocitos B (CD19) y eosinófilos (CD23) en sangre de ratones inoculados con 500 y 2500 huevos larvados de *Toxocara canis* a diferentes tiempos.

BAZO								
DIAS POST-INOCULACIÓN	1	3	5	7	15	30	60	100
<b>CD3</b>								
CONTROL	19.6	37.2	45.5	15.4	29.4	28.0	28.0	23.7
500	17.3	32.6	26.5	32.2	24.1	20.1	26.6	24.8
2500	21.8	28.5	25.3	25.7	24.4	12.0	23.8	23.4
<b>CD4</b>								
CONTROL	14.0	25.9	31.2	12.4	18.8	20.2	20.2	15.9
500	11.5	23.2	17.7	20.0	16.8	13.4	17.9	17.4
2500	15.1	20.4	16.3	16.0	17.0	8.2	16.1	16.5
<b>CD8</b>								
CONTROL	5.6	11.3	14.3	3.0	10.7	7.9	7.9	7.9
500	5.7	9.4	8.7	12.2	7.4	6.8	8.7	7.4
2500	6.8	8.2	9.0	9.4	7.4	3.8	7.7	7.0
<b>CD19</b>								
CONTROL	51.8	49.5	28.2	14.4	38.5	44.9	44.9	40.9
500	55.1	48.9	36.4	30.1	34.2	28.6	49.2	39.0
2500	53.6	48.0	35.4	27.3	37.6	19.3	53.9	39.4
<b>CD23</b>								
CONTROL	0.5	3.0	2.8	2.9	1.6	6.3	6.3	1.2
500	0.9	2.0	4.5	1.7	1.8	4.9	7.5	1.6
2500	1.8	2.7	5.0	1.3	2.4	6.2	6.1	2.3

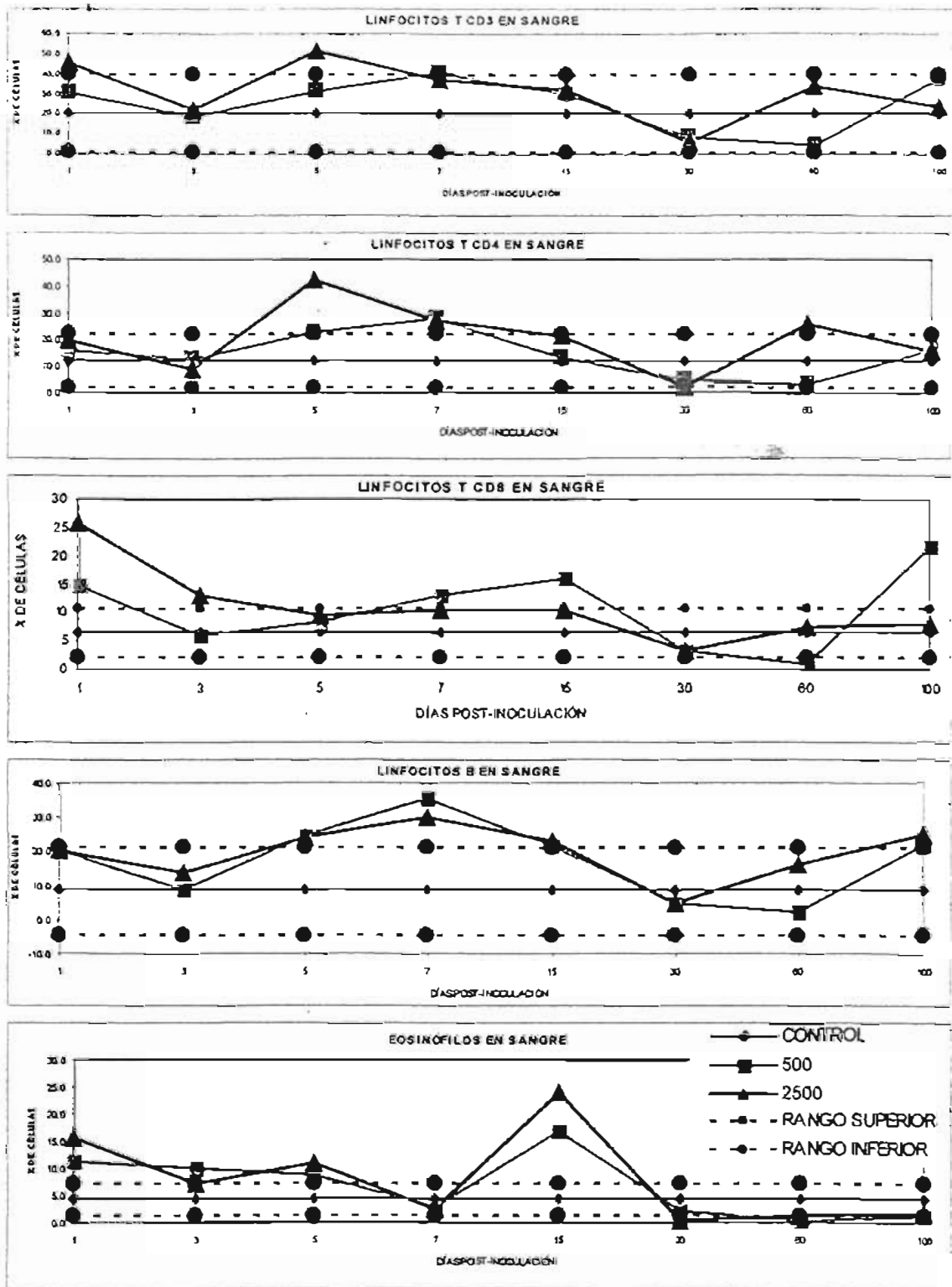


Figura 6.3.6 Comparación de los valores en porcentaje obtenidos a diferentes tiempos en las poblaciones de linfocitos y eosinófilos en sangre de ratones cepa Balb/C inoculados con 500 y 2500 huevos larvados de *Toxocara canis*.

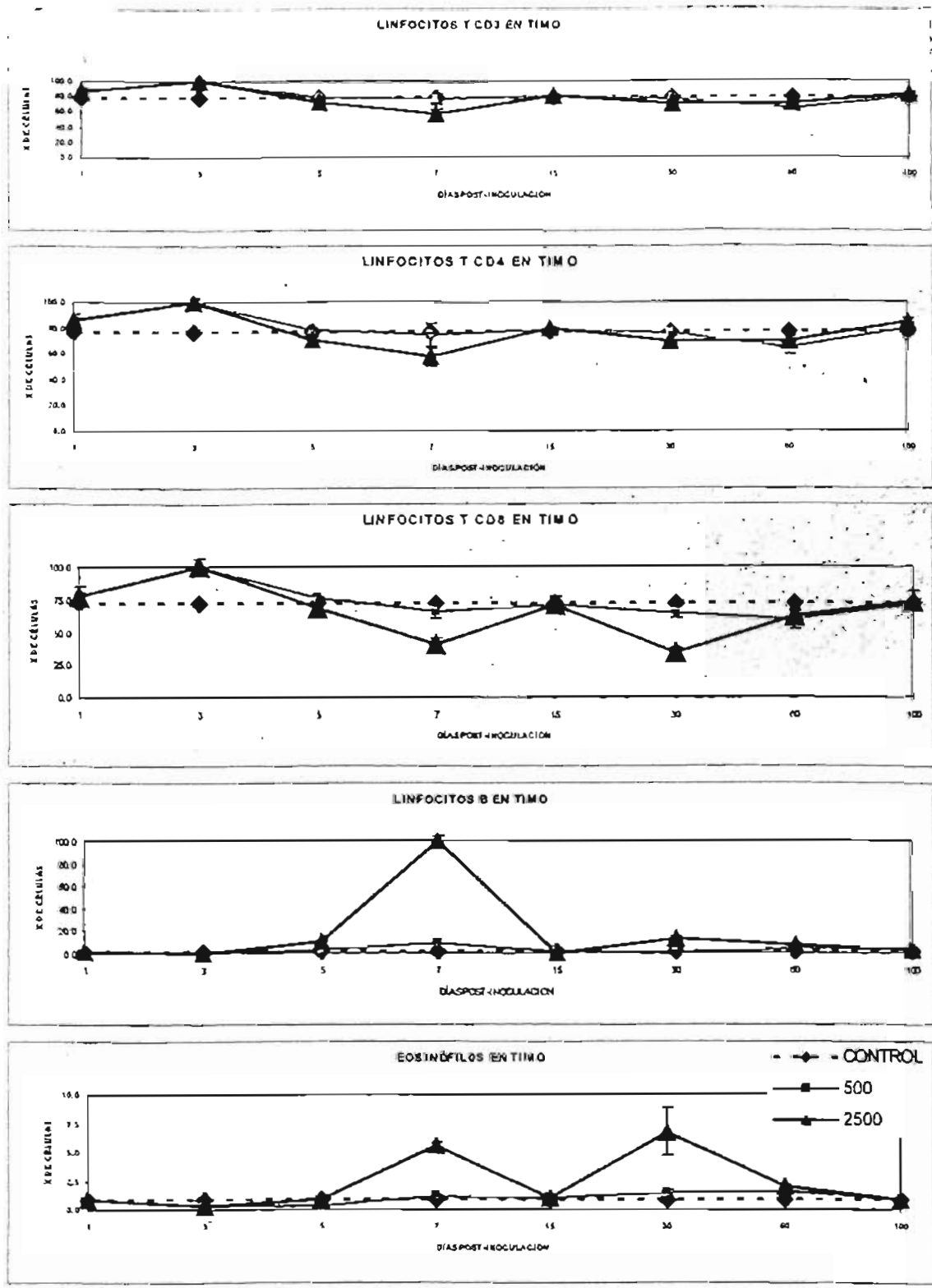


Figura 6.3.7 Comparación de los valores en porcentaje obtenidos a diferentes tiempos en las poblaciones de linfocitos y eosinófilos en timo de ratones cepa Balb/C inoculados con 500 y 2500 huevos larvados de *Toxocara canis*.

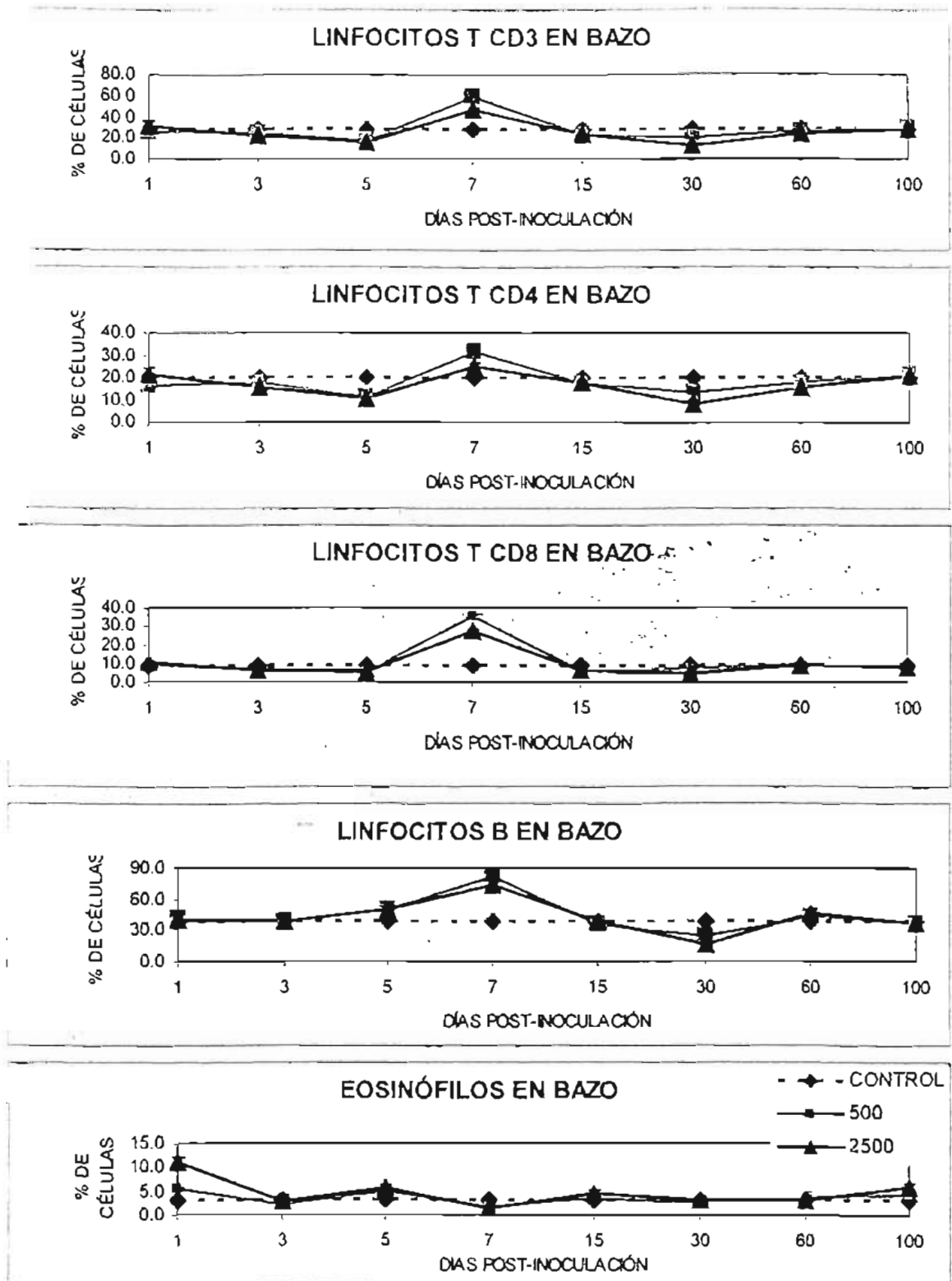


Figura 6.3.8 Comparación de los valores en porcentaje obtenidos a diferentes tiempos en las poblaciones de linfocitos y eosinófilos en bazo de ratones cepa Balb/C inoculados con 500 y 2500 huevos larvados de *Toxocara canis*.



## 7. DISCUSIÓN

Las larvas de *T. canis* en hospederos paraténicos producen gran cantidad de lesiones en diferentes órganos (Cypess, 1982; Alba, 1999). En estos órganos se ha demostrado gran cantidad de infiltrados celulares alrededor de las larvas, pero también se han encontrado larvas lejos de dichos infiltrados, por lo que se ha propuesto que el parásito modifica la respuesta inmune del hospedador. Lo anterior, podría explicar la observación hecha en varios países donde se ha encontrado que niños con asma presentan mayor cantidad de anticuerpos anti-Toxocara que una población de niños no asmáticos (Cabrera, 1980; Muñoz, 2003).

La inoculación de hITc indujo cambios en la proporción de leucocitos sanguíneos, se pudo observar una linfocitosis a los días 5 y 7 pi. El día 5 aumentó la proporción de linfocitos T totales y el día 7 aumentó la proporción de los linfocitos B. Este aumento probablemente se deba a la actividad mitogénica sobre linfocitos que se ha observado por parte de los antígenos de secreciones y excreciones de *T. canis* (Wang *et al.*, 1995). Además, se ha demostrado que durante la inflamación aguda el tejido necrótico produce un factor inespecífico que induce la leucocitosis (Sell, 1996), esto puede ser otra causa de la linfocitosis observada, puesto que se ha visto que al principio de una infección en modelos experimentales hay grandes zonas de inflamación y necrosis en diferentes tejidos (Sugane & Oshima, 1983; Alba, 1999).

La inoculación de hITc en los ratones modificó la proporción de linfocitos CD4+ y de CD8+ en sangre. La proporción de linfocitos CD4+ en sangre aumentó los días 5 y 7 pi. El día 15 pi bajaron los niveles de CD4+ y aumentaron los niveles de CD8+. El día 60 pi bajaron los niveles de CD8+ y aumentaron los niveles de CD4+. El día 100 aumentaron las proporciones de CD8+ y bajaron las de CD4+. Los resultados anteriores demostraron que los tipos celulares, en ambos grupos experimentales, variaron en el tiempo después de la infección, en la fase aguda (5 a 7 días) aumentaron los CD4+, probablemente del tipo Th2, puesto que correlaciona con un aumento de eosinófilos, que como han demostrado otros

autores (Limaye *et al.*, 1990), es dependiente de la IL-5 y el patrón de interleucinas típico de una respuesta Th2 incluye IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-12 (Mosnann & Coffman, 1989).

El marcador CD8+ se encuentra en los linfocitos T citotóxicos (Abbas *et al.*, 1993). En este trabajo se observó que la proporción de Linfocitos T CD8+ en sangre aumentó el día 15 pi en los animales inoculados, y paulatinamente bajó al día 60 pi. Otros autores han demostrado que los linfocitos T citotóxicos (CD8+) ocasionan la producción de IFN- $\gamma$ , lo que activa la expansión de una respuesta Th1 y antagoniza el desarrollo de una respuesta Th2 (Mosnann & Coffman, 1989). Lo anterior concuerda con la baja en la proporción de eosinófilos observado en sangre. Las células con respuesta Th1 reclutan y activan macrófagos, inducen producción de citocinas fibrogénicas como el TGF- $\beta$ , inducen la destrucción del tejido debido a los productos de los macrófagos, ocasionan la formación de granulomas y una proliferación de fibroblastos y depósitos de colágena. Todos estos efectos han podido ser detectados a partir del día 20 pi en cortes histológicos de diferentes tejidos por otros autores (Alba, 1999; Buendía, 2004).

El porcentaje de eosinófilos en sangre demostró que en este modelo animal la inoculación de hITc induce un aumento en el porcentaje de eosinófilos sanguíneos. La curva de eosinófilos presentó dos picos uno el día 5 y otro al día 15 pi. Resultados equivalentes a los anteriores han sido reportados por otros autores, con la diferencia de que los picos se presentaron los días 10 y 28 pi en ratones Balb/C (Sugane *et al.*, 1982). El origen de esta eosinofilia ha generado gran interés y controversia, se ha demostrado que la eosinofilia producida en ratones infectados experimentalmente con otros helmintos como *Ascaris suum*, *Schistosoma mansoni* y *Trichinella spiralis* es dependiente de linfocitos T (Nielsen *et al.*, 1974; Phillips *et al.*, 1977; Ruitenbergh *et al.*, 1977). Sugane *et al.* en 1982 encontraron que la eosinofilia periférica en ratones Balb/C nu+(nu/+) infectados experimentalmente con larvas de *T. canis* presenta dos picos en los días 10 y 20 pi y que se presenta solo el primer pico en ratones atímicos Balb/C nu/nu (nu/nu) infectados; lo anterior sugiere que la eosinofilia producida por *T. canis* puede ser T

dependiente o T independiente. Estudios posteriores, demostraron la importancia que tiene la interleucina 5 (IL-5) en la aparición de eosinofilia en otras infecciones por helmintos y que la aplicación de anticuerpos anti-IL5 suprime totalmente esta eosinofilia (Limaye *et al.*, 1990; Coffman *et al.*, 1989). Parson *et al.* en 1993 bloquearon totalmente la eosinofilia al tratar con anticuerpos monoclonales anti-IL-5 ratones C57/BL/6J infectados con larvas de *T. canis*, esto no aclaró el asunto, pues la IL-5 es producida por células Th2, que son muy raras en ratones atímicos (Kennedy *et al.*, 1992). Posteriormente se demostró que en pulmón las células T, CD4 y CD8 negativas (doble negativas) tanto de ratones normales como de ratones atímicos infectados con larvas de *T. canis* producían IL-5 y que la eosinofilia en los dos modelos se puede suprimir con la aplicación de anticuerpos monoclonales anti-IL-5 (Kusama *et al.*, 1995; Takamoto and Sugane, 1993; Takamoto *et al.*, 1995). Además, ratones genéticamente deficientes de IL-5 no desarrollan eosinofilia después de la infección experimental con hITc (Takamoto *et al.*, 1997).

El papel que juegan los leucocitos y en especial los 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 efecto tóxico sobre algunos parásitos, este mismo efecto no se ha podido observar *in vivo* (Abbas *et al.*, 1993; Mahmoud, 1989). 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 degranulación de los eosinófilos, pero esto no afecta ni la movilidad ni la viabilidad de las larvas (Fattah *et al.*, 1986), resulta interesante señalar que no se ha podido demostrar que esta degranulación sea dependiente de IgE (Jones *et al.*, 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 *et al.*, 1990).

En este estudio se detectó un aumento de los diferentes tipos de linfocitos (CD3+, CD4+ CD8+ y CD19+) en bazo entre los días 5 y 7 pi. El bazo es un órgano de recolección de antígenos circulantes, las larvas de *T. canis* están

secretando en forma continua una gran cantidad de antígenos de secreciones y excreciones, y se ha demostrado que tienen actividad mitogénica sobre linfocitos (Wang *et al.*, 1995). Si bien aumentan los linfocitos, estos no son necesariamente protectores puesto que la activación es policlonal, y por lo tanto distrae la respuesta inmune específica contra el parásito. Se ha detectado también que estos antígenos inducen la producción de auto-anticuerpos y disminución de las células T (Yamashita *et al.*, 1993).

Los linfocitos B en sangre aumentan igual que los linfocitos B en bazo, lo cual no es de extrañar puesto que el bazo es un órgano linfoide secundario en donde los linfocitos B están en espera de la presentación del antígeno. Una vez que entran en contacto con él, se multiplican y fácilmente salen al torrente circulatorio. Lo anterior coincide con los reportes de otros autores en donde se ha demostrado la presencia de anticuerpos anti-Toxocara en suero a partir del día 10 pi y hasta varios meses después (Havasiová, 1993; Parsons *et al.*, 1986; Alba, 1999).

La proporción de linfocitos T en timo aumenta en los animales sacrificados el día 3 pi pero en los sacrificados en días posteriores disminuye con respecto a los animales del grupo testigo. El aumento a los tres días probablemente se deba a una respuesta inespecífica del órgano, puesto que por ser un órgano primario no reacciona específicamente a los antígenos y a que muchos linfocitos salen del mismo para llegar al lugar donde se encuentran las larvas.

En este trabajo se identificaron los porcentajes de células que expresaban cierto marcador, pero no se contó el número total de células en cada órgano, lo anterior si bien nos da una idea de cómo se alteran las poblaciones pudiera enmascarar algunos efectos, puesto que no da números absolutos.

También se obtuvieron datos sobre la presencia de marcadores celulares, sin embargo no se evaluó el tipo de interleucinas que se estaban produciendo, por lo que su función solo se puede presuponer. Por lo anterior, para futuros estudios se sugiere que se utilicen anticuerpos dirigidos contra interleucinas o interferones

que puedan diferenciar, en forma más clara, el tipo de respuesta montada en una infección experimental

## 8. CONCLUSIONES

- Los animales inoculados con 2500 hITc presentaron entre los días 1 y 5 pi linfocitosis en sangre y los inoculados con 500 hITc presentaron la linfocitosis el día 7 pi.
- En general la proporción de linfocitos CD4+ en sangre aumentó los días 5 y 7 pi. El día 15 pi bajaron los niveles de CD4+ en sangre y aumentaron los niveles de CD8+. El día 60 p.i. bajaron los niveles de CD8+ y aumentaron los niveles de CD4+. El día 100 aumentaron las proporciones de CD8+ y bajaron las de CD4+.
- Los ratones de los dos grupos experimentales presentaron un mayor porcentaje ( $p < 0.05$ ) de linfocitos B sanguíneos en relación al grupo testigo los días 5, 7, 15 y 100 pi.
- Se detectaron dos picos de eosinofilia en sangre en los dos grupos de animales inoculados (500 y 2500 hITc) los días 5 y 15 p.i.
- Los linfocitos T totales (CD3+) en bazo de los dos grupos experimentales presenta un mayor porcentaje el día 7 y menor porcentaje los días 5, 15 y 30 ( $p < 0.05$ ). Patrón similar al observado para linfocitos CD4+ y CD8+ en ambos grupos experimentales.
- Los linfocitos T en timo aumentaron los primeros 3 días pi, pero después descendieron hasta ser estadísticamente menores que los del grupo control a los días 5, 7 y 60 pi.
- La respuesta inmune celular varía en el tiempo, pues los niveles de linfocitos T, linfocitos B y eosinófilos variaron en el tiempo con respecto a los animales testigo.

## ANEXO

### FORMULA DE SOLUCIONES:

<b>PBS 10X:</b>		<b>PGB</b>		
NaCl	80gr	PBS pH 7.2		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2gr	GLUCOSA 20mM		
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10.6gr	ALBUMINA 0.5%		
KCl	2gr	Para 300ml de PGB:		
AGUA	1000ml	300ml PBS + 1.5 gr Albumina + 1.08 gr Glucosa		
1X: 100 ml + 900 AGUA, ajustar pH 7.2 a 7.4				
<b>PF</b>		<b>PGN</b>		
FORMALDEHÍDO 2%		GLUCOSA 20mM		
PBS pH 7.2		SUERO DE RATÓN 5%		
100 ml PBS + 2 ml Formol		PBS		
		0.36 gr	5ml	100ml
<b>BUFFER DE LISIS</b>				
Reactivo	Concentración	Peso Mol.	0.5 L	1 L
NH <sub>4</sub> Cl	154 mM	53.5 g	8.29 g	4.145 g
Na <sub>2</sub> EDTA	100 mM	372.2g	37.20 mg	18.6 mg
KHCO <sub>3</sub>	10 mM	100.12g	1.00 g	0.5 g
Pesar, agregar agua desionizada, ajustar pH a 7.4 y aforar				

## ABREVIATURAS

ANOVA:	Análisis de Varianza
BD	Becton-Dickinson
°C	Grados centígrados
CD:	Cluster de Diferenciación
EDTA:	Acido etilen-diamino-tetracético
FITC:	Isotiocianato de fluoresceina
<i>et al:</i>	Colaboradores de un trabajo de Investigación
hITc:	Huevos larvados de <i>Toxocara canis</i>
IgE:	Inmunoglobulina E
IgG:	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
kDa	Kilodaltons
LB:	Linfocitos B
LMO:	Larva migrans ocular
LMV:	Larva migrans visceral
LT:	Linfocitos T
min:	Minutos
ml:	Mililitros
mm <sup>3</sup>	Milímetro cúbico
PBS:	Solución salina de fosfatos
PE:	Ficoeritrina
pi:	Posterior a la inoculación
pg	Picogramos
rpm	Revoluciones por minuto
SSF:	Solución salina fisiológica
TES:	Antígenos de secreción y excreción de <i>Toxocara canis</i> .



## LISTA DE FIGURAS

1.1.3.1	CICLO BIOLÓGICO DE <i>Toxocara canis</i> . . . . .	3
1.2.1	ORIGEN DE LAS CÉLULAS LEUCOCITARIAS . . . . .	14
1.3.1	ESQUEMA DE UN CITÓMETRO DE FLUJO . . . . .	21
6.1.1	LINFOCITOS T CD3 EN SANGRE . . . . .	36
6.1.2	LINFOCITOS T CD4 EN SANGRE . . . . .	37
6.1.3	LINFOCITOS T CD8 EN SANGRE . . . . .	38
6.1.4	LINFOCITOS B EN SANGRE . . . . .	39
6.1.5	EOSINÓFILOS EN SANGRE . . . . .	40
6.2.1	LINFOCITOS T CD3 EN TIMO . . . . .	42
6.2.2	LINFOCITOS T CD4 EN TIMO . . . . .	43
6.2.3	LINFOCITOS T CD8 EN TIMO . . . . .	44
6.2.4	LINFOCITOS B EN TIMO . . . . .	45
6.2.5	EOSINÓFILOS EN TIMO . . . . .	46
6.3.1	LINFOCITOS T CD3 EN BAZO . . . . .	48
6.3.2	LINFOCITOS T CD4 EN BAZO . . . . .	49
6.3.3	LINFOCITOS T CD8 EN BAZO . . . . .	50
6.3.4	LINFOCITOS B EN BAZO . . . . .	51
6.3.5	EOSINÓFILOS EN BAZO . . . . .	52
6.3.6	COMPARACIÓN DE VALORES EN SANGRE . . . . .	54
6.3.7	COMPARACIÓN DE VALORES EN TIMO . . . . .	55
6.3.8	COMPARACIÓN DE VALORES EN BAZO . . . . .	56

## LISTA DE CUADROS

1.3	LISTA DE LOS PRINCIPALES FLUOROCROMOS UTILIZADOS EN CITOMETRÍA DE FLUJO .....	22
6.1.1	PORCENTAJE DE LINFOCITOS T, B Y EOSINÓFILOS EN SANGRE .....	41
6.2.1	PORCENTAJE DE LINFOCITOS T, B Y EOSINÓFILOS EN TIMO .....	47
6.3.1	PORCENTAJE DE LINFOCITOS T, B Y EOSINÓFILOS EN BAZO .....	53

## 9. BIBLIOGRAFÍA:

- Abbas, A.K.; Lichtman, A. H. & Pober J.S. Cellular and Molecular Immunology.. USA: Ed. W.B. Saunders Company, 1993.
- Abe K, Hashiyama M. Purification of primordial germ cells from TNAP-geomouse embryos using FACS-GAL. *Develop Biol* 1996; 180 ( 2 ): 468-472.
- Aguila de la Puente C, Cuéllar D C, Guillén Llera JL. Anticuerpos monoclonales frente al antígeno excretor-secretor de *Toxocara canis*. *Rev Ib Parasitol* 1988; 48(2): 209-220.
- Ahmed M, Aldawek M. Larval toxocarosis in sheep: the immunohistochemical characterization of lesions in some affected organs. *Vet Parasitol* 2002; 105: 207-209.
- Akao N, Tomoda K. Cerebellar ataxia due to *Toxocara* infection in Mongolian gerbils, *Meriones unguiculatus*. *Vet Parasitol* 2003; 113: 229-237.
- Alba, HF. Manual de Prácticas de Parasitología Veterinaria. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM, 1994.
- Alba, HF. Evaluación de un modelo de Toxocariasis ocular y sistémica empleando jerbos (*Meriones unguiculatus*). Tesis de doctorado, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. (1999).
- Alba, HF. Manual de Prácticas de Parasitología Veterinaria. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM, 2004.
- Apuntes de Inmunología Porcina (Presentación en CD-ROM). Sanchez VJM. España, 2002.
- Asao, N, Chu AE, Tsukidate S, Fujita KA. Rapid and sensitive scening kit for the detection of anti-*Toxocara* larval ES antibodies. *Paras Int* 1997; 108: 184-195.
- Atsushi S, Yun-Wen Z. Flow-Cytometric separation and enrichment of Hepatic Progenitor cells in the developing mouse liver. *Hepatology* 2000; 32 ( 6 ): 1230-1239.
- Auk-Tikalniena R, Kublickiena U, Vy-niauskas A, Fiilinskienà R. Histological investigations of *Toxocara canis* tissues and their micromorphological changes under the action of albendazole *in vivo*. *Acta Zool Lituanica* 2000; 10 ( 2 ): 1392-1657.
- Badley JL, Grieve RB, Bowman DD, Glickman LT, Rockey JH. Analisis of *Toxocara canis* larval Excretory-Secretory antigens: Phisicochemical characterization and antibody recognition. *J Parasitol* 1987; 73: 593-600.
- Baldisserotto M, Carlo FM, Conchin MG, Soares M, Araujo MA, Kramer B. Ultrasound findings in children with toxocarisis: report on 18 cases. *Pediatric Radiol* 1999; 29 ( 5 ): 316-319.
- Bardon R, Guillén JL, Aguila C. Idiotypic replica of a *Toxocara canis*, excretory-secretory antigen epitope. *Int. J Paras* 1995; 25( 1 ): 105-111.
- Bass JI, Mehta KA, Glickman LT, Blocker R, Eppes BM. Asymptomatic toxocarisis in children. A prospective study and treatment trial. *Clin Pediatr Phila* 1987; 26 (9): 441-446.
- Beaver PC, Snyder CH, Carrera GM, Dent JH, Lafferty JW. Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. Report of three cases. *Pediatrics* 1952; 9:7.

- Beaver PC, Juns RC, Cupp EW. Parasitología clínica. 2ª Ed. Barcelona, España: Salvat, 1986.
- Bernal J. Mascotas que parasitan las plazas. Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad de Buenos Aires. Divulgación Científica 1998.
- Blood DC, Radostits O M. Medicina Veterinaria, 6ª ed. México: Editorial Interamericana, 1986.
- Badley JL, Grieve RB, Bowman DD, Glickman LT, Rockey JH. Analisis of *Toxocara canis* larval Excretory-Secretory antigens: Phisicochemical characterization and antibody recognition. J Parasitol 1987; 73: 593-600.
- Bridget A, Puffer M, Matthew S. Expression and Coreceptor function of apj for primate immunodeficiency virases. Virology Oct 2000; 276 ( 2 ): 435-444.
- Cabrera M. A. And Suazo AT. Titers of antibodies for visceral *larva migrans* in hospitalized patients. Bol Med Hosp Infant Méx 1980; 37 ( 2 ): 195-201.
- Cartas-Chiñas J. Estadística Médica. Probabilidad y estadística descriptiva, , México, D. F. Ed. Limusa, 1987
- Ciarmela ML, Minvielle MC. Biological interaction between soil fungi and *Toxocara canis* eggs. Vet Parasitol 2002; 103: 251-257.
- Chisid, MJ, Dale DC, West BC, Wolff SM. The hypereosinophilic syndrome. Analisis de fourteen cases with review of the literature. Medicine 1975; 54: 1-27.
- Coffman RL, Seymour BWP, Hudak S, Jackson J, Rennick D Antibody to interleukin-5 inhibits helminth induced eosinophilia in mice. Science 1989; 245: 308-309.
- Cox DM, Holland CV. The relationship between numbers of larvae recovered from the brain of *Toxocara canis*-infected mice and social behaviour and anxiety in the host. Department of Zoology, Trinity College, Dublin 2, Ireland, 1998.
- Cuéllar C, Fenoy S, De Aguila C, Guillén JL. Cross reactions of sera from *Toxascaris leonina* and *Ascaris suum* infected mice with *Toxocara canis*. Int J Paras 1993; 25( 6 ): 731-739.
- Cuéllar C, Fenoy S, Guillén JL. Cross-reactions of sera from *Toxascaris leonina* and *Ascaris suum* infected mice with *Toxocara canis*, *Toxascaris leonina* and *Ascaris suum* antigens. Int. J Parasitol 1995; 25 (6): 731-739.
- Cuéllar C, Fenoy S, De Aguila C, Guillén, JL. Isotipe specific inmune responses in murine experimental toxocariasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2001; 96( 4 ): 549-553.
- Chia-Kwung F, Yun-Ho L, Wen-Yuan D, Kua E. Infectivity and pathogenicity of 14-month-cultured embryonated eggs of *Toxocara canis* in mice. Vet Parasitol 2003; 113: 145-155.
- Cypess HR. Visceral larva migrans. In Parasitic zoonoses. Steel H.J. 205-212. 1982.
- Daniel, W: Biostatistics. Foundation for analysis in the health sciences., USA, Ed. John Willeg and Sons Inc, 1974.
- DeSavigni DH. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. J Parasitol 1975; 61: 781-782.

Doedens A, Loukas A. cDNA encoding *Tc*-MUC-5, a mucin from *Toxocara canis* larvae identified by expression screening. *Acta Tropica* 2001; 79: 211–217.

Dunn AM. *Helmintología Veterinaria*. 2ª Edición. Manual Moderno, México, 1983

Dvoroznakova E, Boroskova Z, Dubinsky P, Tomasovicova O, Hribalova V, Machnicka B. Immunomodulative effect of muramyldipeptide in mice with larval *Toxocarosis*. *Parasitol Res* 1999; 85 ( 12 ): 1034-1040.

El Manual Merck de Veterinaria, 3ª ed USA: Editorial Merck y Co, 1998.

Epe C, Ising-Volmer S, Stoye M. Results of parasitological examinations of faecal samples from horses, donkeys, dogs, cats and hedgehogs between 1984 and 1991. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 1993; 100 ( 11 ): 426-428.

Fattah DI, Maizels RM, McLaren DJ, Spry CJF. *Toxocara canis*: Interaction of human blood eosinophils with the infective larvae. *Exp Parasitol* 1986; 61: 421-431.

Fattah D, Page KR, Bezbaruah S, Priest R, Horgan CM, Solari R. A rapid activation assay for human Eosinophils based on adhesion to immobilized ICAM-1, VCAM-1 and IgG. *Cytokine* 1996; 8 ( 3 ): 248-259.

Fenoy RS, Cuéllar del Hoyo C, Aguila P, Guillén JL. Posibles reacciones cruzadas del antígeno excretor-secretor. *J. Paras* 1989; 7: 1037-1038.

Fenoy RS, Cuéllar del Hoyo C, Aguila P, Guillén JL. Persistence of immune response in human toxocarosis as measured by ELISA. *J Paras* 1992; 7: 1037-1038.

Finkelman FD, Gause WC, Urban JF. Cytokine control of protective immunity to nematode infections. *Mol Paras* 1995; 65: 467-476.

Fisher M. *Toxocara cati*: an underestimated zoonotic agent. *Trends Parasitol* 2003; 19 ( 4 ): 290-293.

Georgi JR, Georgi ME. *Parasitología en Clínica Animal*, México: Editorial Interamericana - McGraw-Hill, Colección Manuales Clínicos Veterinarios, 1994.

Gems D, Maizels RM. Abundantly expressed mucin-like protein from *Toxocara canis* infective larvae: The precursor of larval surface coat glycoproteins. *Med Sc* 1996; 93: 1665-1670.

Ghosh S, Majumder M, Majumder S, Ganguly NK, Bishnu P. Chatterjee Saracin: A Lectin from *Saraca indica* Seed Integument Induces Apoptosis in Human T-Lymphocytes. *Arch Biochem Biophys* 1999; 371 ( 2 ): 163-168.

Godfrey DI, Kinder SJ. Flow Cytometric study of T cell development in nod mice reveals a deficiency in TCR+CD4-CD8-Thymocytes. *J Autoimmun* 1997; 10 ( 3 ): 279-285.

Gutiérrez QM, Martínez-Barbabosa I, Alonso GT, Fernández PAM, Ruiz GLA, García Y. Reactividad serológica a cinco antígenos de parásitos en adolescentes escolares. *Rev Mex Patol Clín* 2000; 47(1): 32-37.

Habluetzel G, Traldi S. An estimation of *Toxocara canis* prevalence in dogs, environmental egg contamination and risk of human infection in the Marche region of Italy. *Vet Parasitol* 2003; 113: 243–252.

- Hartman D, Cottee P. *Haemonchus contortus*: molecular characterisation of a small heat shock protein. *Experimental Parasitol* 2003; 104: 96–103.
- Hill IR, Denham DA, Scholtz CL. *Toxocara canis* larvae in the brain of a British child. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985; 79: 351-354.
- Hiratochia M, Takamotoa M, Tatemichib S, Suganea K. Inhibition of interleukin 5 production with no influence on interleukin 4 production by an anti-allergic drug, tranilast, in *Toxocara canis*-infected mice. *Internat J Immunopharmacol* 2000; 21: 463-471.
- Humbert, *Dermatology* 201 (3): 230-234, 2000.
- Huntley CC, Costas MC, Lyerly A. Visceral *larva migrans* syndrome: Clinical characteristics and immunologic studies in 51 patients. *Pediatrics* 1965; 36 ( 4 ): 523-536.
- Iglesias R, Leiro J, Ubeira FM, Santamarina MT, Navarrete I, Sanmartin ML. Antigenic cross-reactivity in mice between third-stage larvae of *Anisakis simplex* and other nematodos. *Parasitol Res* 1996; 82 ( 4 ): 378-381.
- Jones ER, Finkelman DF, Hester BR, Kayes GS. *Toxocara canis*, failure to find receptors (FceR) on eosinophils from infected mice suggest that murine eosinophils, do not Hill helminto larvae by an IgE dependent mechanism. *Exp Paras* 1994; 78: 64-75.
- Kennedy JD, Carl WP, Lake JP. Extrathymic T cell maturation: phenotypic analysis of T cell subsets in nude mice as a function of age. *J Immunol* 1992; 148: 1620-1626.
- Kramer F, Vollrath T, Schnieder T, Epe C. Improved detection of endoparasite DNA in the soil sample PCR by the use of anti-inhibitory substances. *Vet. Paras* 2002; 108: 217-226.
- Kusama Y, Takamoto M, Kasahara T, Takatsu K, Nariuchis H, Sugane K. Mecanismos of eosinophilia in BALB/c-nu/+ and congenitally athymic BALB/c-nu/nu mice infected with *Toxocara canis*. *Immunology* 1995; 84: 461-468.
- Kwung C, Yun-Ho L. Infectivity and pathogenicity of 14-month-cultured embryonated eggs of *Toxocara canis* in mice. *Vet Parasitol* 2003; 113: 145–155.
- Laird PR, Carballo AD, Reyes EM, Zamora E, Garcia RE, Prieto D, *Toxocara sp.* en parques y zonas públicas de Ciudad de la Habana. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 2000; 38 ( 2 ): 112-116.
- Limaye AP, Abrams JS, Silver JE, Ottesen EA, Nutman TB. Regulation of parasite induced eosinophilia: selectively increased interleukin-5 production in helminth infected patient. *J Exp Med* 1990; 172: 399-405.
- Lombardi S, Vegni-Talluri M, Banchieri L, Esposito F. The in vitro adherence of murine eosinophils, neutrophils and non-induced and induced macrophages to infective larvae of *Toxocara canis*. (*Nemátoda, Ascaridae*). *Int J Parasitol* 1990; 20: 603-613.
- López S, Espinosa R, Pavel LM, Merchant T, Zárata S, Méndez E, *et al.* Characterization of a Monoclonal Antibody Directed to the Surface of MA104 Cells That Blocks the Infectivity of Rotaviruses. *Virology* 2000; 273 ( 1 ): 160-168.
- Lowichik A, Ruff AJ. Parasitic infections of the central nervous system in children. Part II: Disseminated infections. *J. Child. Neurol* 1995; 10 ( 2 ): 77-87.

- Lynch RN, Hagel I, Vargas V, Rotundo A, Varela CA, Di Pisco CM, Hodgen A N. Comparable seropositivity for ascariasis and toxocariasis in tropical slum children. *Paras Res* 1993; 63: 547-550.
- Magnaual JF, Fabre R, Maurières P, Charlet JP, Larrard B. Application of the Western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitol Res* 1991; 77: 697-702.
- Magnaual JF, Fabre R, Mausieres P, Charlet JP, Larrard B. Evaluation a fan inmunoenzymatic assay detecting specific anti-*Toxocara* inmunoglobulin E for diagnosis and post-treatment follow-up of human toxocariasis. *J Clin Mic* 1992; 30 ( 9 ): 2269-2274.
- Magnaual JF, Galindo V, Glickman LT, Clanet M. Human *Toxocara* infection of the central nervous system and neurological disorders: a case control study. *Parasitol* 1997; 115: 537-543.
- Mahmoud AAF. Parasitic protozoa and helminths: biological and immunological challenges. *Science* 1989; 246: 1015-1022.
- Maizels RM, Savigny D, Ogilvie BM. Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. *Parasitol Immunol* 1984; 6: 23-34.
- Maizels RM, Kennedy MW, Meghji M, Robertson BD, Smith HV. Shared carbohydrate epitopes on distinct surface and secreted antigen of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *J Immunol* 1987; 139: 207-214.
- Maizels R, Tetteh K, Loukas A, *Toxocara canis*: genes expressed by the arrested infective larval stage of a parasitic nematode, *Internat J Parasitol* 2000; 30: 495-508.
- Maizels R, Loukas A, The Surface and Secreted Antigens of *Toxocara canis*: Genes, Protein Structure and Function. *Parasitic Nematodes* 2001.
- Markell EM, Voge M, John TD. *Medical Parasitology*. W.B. Saunders Company, USA. 1986.
- Martínez BI, Fernández PAM, Vázquez O, Tsuji A, Ruiz HA. Frecuencia de *Toxocara canis* en perros y áreas verdes del sur de la ciudad de México, Distrito Federal, *Vet Mex*, 2000.
- Martínez R, Miranda E. Presencia de Proteínas Reactivas por Western blott en Suero de Pacientes con *Toxocara canis*. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Universidad Nacional Federico Villarreal, Perú, 2002.
- McTier A, Siedek EM, Clemence RG. Efficacy of selamectin against Experimentally induced and naturally acquired ascarid (*Toxocara canis* and *Toxascaris leonina*) infections in dogs. *Vet Parasitol* 2000; 90: 333-345.
- McTier TL, Siedek EM. Efficacy of selamectin against experimentally induced and naturally acquired ascarid (*Toxocara canis* and *Toxascaris leonina*) infections in dogs . *Vet Parasitol* 2000; 91: 333-345.
- Meghji M, Maizels MR. Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *Mol Bioch Paras* 1986; 18: 155-170.
- Michel JT, Visser ACD, Van Lennep J. Evaluation of various methods to quantify Endothelial cells attached to Vascular Prostheses: comparison with a new "gold standard" FACS method. *J Sur Res* 1996; 61 ( 1 ): 237-243.
- Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to diferent functional properties. *Ann Rev Immunol* 1989; 7: 145-173.

- Munira M, Maizels MR. Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *Mol Bioch Paras* 1986; 18: 155-170.
- Muñoz GMA. Determinación por western-Blot de los antígenos de secreción-excreción de *Toxocara canis* que son reconocidos por anticuerpos de la clase IgE en pacientes asmáticos. Tesis de Maestría. Programa de Maestría en Microbiología de FES-Cuautitlán. 2002.
- Nelson S, Greene T, Ernhart CB. *Toxocara canis* infection in preschool age children: risk factors and the cognitive development of preschool children. *Neurotoxicol Teratol* 1996; 18 ( 2 ): 167-174.
- Nicholas WL, Stewart AC, Mitchell GF. Antibody responses to *Toxocara canis* using sera from parasite infected mice and protection from toxocarasis by immunisation with E/S antigens. *Ast J Exp Biol Med Sci* 1984; 62: 619-626.
- Nielsen K, Fogh L, Anderson S. Eosinophil response to migrating *Ascaris suum* larvae in normal and congenitally thymusless mice. *Acta Path Microbiol Scand* 1974; 82: 919-925.
- Okatar N, Barcin E, Kazandi E, Korkmaz O. Cerebral *Toxocara* mimicking a malignant glioma, Case Report. *Norol Bil* 2002; 19: 2.
- Olsen OW. Animal parasites. Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1974.
- Owhashi M, Arita H, Niwa A. Production of eosinophil chemotactic factor by CD8+ T-cells in *Toxocara canis*-infected mice. *Parasitol Res* 1997; 84 ( 2 ): 136-138.
- Page AP, Rudin W, Fluir E, Blaxter ML, Maizels RM. *Toxocara canis*: A labile antigenic surface coat overlying the epicuticle of infective larvae. *Exp Paras* 1992; 75: 72-86.
- Parsons JC; Bowman DD, Grive RB. Tissue localization of excretory-Secretory antigens of larval *Toxocara canis* in acute and chronic murine toxocarasis. *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35 ( 5 ): 974-981.
- Payne-Johnson, Maitland TP, Sherington J, Shanks DJ. Efficacy of selamectin administered topically to pregnant and lactating female dogs in the treatment and prevention of adult roundworm (*Toxocara canis*) infections and flea (*Ctenocephalides felis felis*) infestations in the dams and their pups. *Vet Parasitol* 2000; 91: 347-358.
- Perez L, Magadan R, Tormo BR, Torres K, Peña O, Hernandez R, *et al*. A new method for determining lymphoid subpopulations and its application in monitoring patients with HIV infection. Center of Molecular Immunology 1998, Havana, Cuba.
- Perteguer MJ, Cuéllar C. Cross-reactivity between *Anisakis simplex* sensitization and visceral larva migrans by *Toxocara canis*. *Acta Tropica* 2003.
- Phillips SM, Diconza JJ, Gold JA, Reid WA. Schistosomiasis in the congenitally athymic (nude) mouse. I. Thymic dependency of eosinophilia, granuloma formation and host morbidity. *J Immunol* 1977; 118: 594-600.
- Piotr K, Mallika I, Ellinor IB, Peerschke AP, Kaplan KBM, Reid B. Human C1q Induces Eosinophil Migration. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 81 ( 1 ): 48-54.
- Quiroz RH. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos, México: Editorial Limusa, 2000.



- Relimpio LI, Sosa DMD, Gutierrez IJM, Fernandez FP, Estaban E. Toxocariasis ocular. *larva migrans*. Servicio de Oftalmología del Hospital Virgen Macarena. Sevilla, 1998.
- Reyes EJA. Apuntes de Citometría de Flujo, México: Editada por Beckton Dickinson de México, 1999.
- Richard S. Manual Clínico de Pequeñas Especies, México: Editorial Mc Graw Hill – Interamericana, 1994.
- Rincón MR. Reconocimiento de los antígenos de excreción-secreción de la larva (L2) de *Toxocara canis* por medio del Western blot en sueros de conejos infectados experimentalmente, Tesis Profesional, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, 2001.
- Rodriguez FS, Guillén LL. Toxocariasis ocular: La realidad de un problema poco conocido. Arch. Soc. Española de Oftalmol 2002; 10.
- Rodriguez P, Pelletier J. NAP-2: Histone chaperone function and Phosphorylation state through the cell cycle. J Mol Biol 2000; 298 ( 2 ): 225-238.
- Roitt I. Inmunología Básica, México: Edit. Panamericana, 2000.
- Ruitenberg EJ, Elgersma A, Kruizinga W, Leenstra F. *Trichinella spiralis* infection in congenitally athymic (nude) mice. Parasitological, serological and haematological studies with observations on intestinal pathology. Immunol 1977; 33: 581-585.
- Sanchez VJM Apuntes de inmunología porcina, Presentación en CD, España, 2002.
- Sá-Nunes A, Corrado AP, Baruffia MD, Faccioli LH. Disodium cromoglycate prevents ileum hyperreactivity to histamine in *Toxocara canis*-infected guinea pigs , Pharmacol Res 2003; 48: 451-455.
- Schantz MP, Glickman LT. *Toxocara visceral larva migrans*. New Engl J Med 1978; 298: 436-438.
- Sell S. Immunology, Immunopathology & Immunity. Ed. Appleton and lange. Stamford, Connecticut, USA 1996.
- Sieben S, Hertl M, Al Masaoudi T, Hans F, Brunhilde MB. Characterization of T Cell Responses to Fragrances. Toxicol Appl Pharma 2001; 172 ( 3 ): 172-178
- Smith HV. Immune evasion and immunopathology in *Toxocara canis* infection. Kennedy M. W., London, England. 1991: 116–139.
- SPSS, Programa estadístico presentado en CD-Room.
- Sommer C, Ringelstein EB, Biniek R, Glockner WM. Adult *Toxocara canis* encephalitis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1994; 57( 2 ): 229-231.
- Sommerfelt IE, Santillán G. Immunological and hematological response in experimental *Toxocara canis*-infected pigs. Vet Parasitol 2001; 96: 127–134.
- Soulsby E JL. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. Lea & Febiger, USA. 1982.

- Stevenson P, Jacobs DE. *Toxocara* infection in pigs. The use of indirect fluorescent antibody tests and an in vitro larval precipitate test for detecting specific antibodies. *J Parasitol* 1977; 51 ( 2 ): 149-154.
- Sugane K, Oshima T. Trapping of large numbers of larvae in the livers of *Toxocara canis* reinfected mice. *J Helminthol* 1983; 57 ( 2 ): 95-99.
- Surendra J, Chavan SL, Tamma S, Kaplan M, Gersten M, Savita G, Pahwa M. Reduction in T Cell Apoptosis in Patients with HIV Disease Following Antiretroviral Therapy. *Clin Immunol* 1999; 93 ( 1 ): 24-33.
- Takamoto M, Sugane K. Mechanisms of eosinophilia in *Toxocara canis* infected mice: *In vitro* production of interleukin 5 lung cells of both normal and congenitally athymic nude mice. *Parasit Immunol* 1993; 15: 493-500.
- Takamoto M, Kusama Y, Takatsu K, Nairuchi H, Sugane K. Occurrence of interleukin 5 production by CD4- CD8- (double negative) T cells in lung of both normal and congenitally athymic nude mice infected with *Toxocara canis*. *Immunol* 1995; 85: 285-291.
- Takamoto M, Ovington KS, Behm CA, Sugane K, Young IG, Matthaei K. Eosinophilia, parasite burden and lung damage in *Toxocara canis* infection in C57Bl/6 mice genetically deficient in IL-5. *Immunol* 1997; 90 ( 4 ): 511-517.
- Toellner KM, Scheel-Toellner D, Sprenger R, Duchrow M, Trümper L, Ernst M, *et al*. The human germinal centre cells, follicular dendritic cells and germinal centre T cells produce B Cell-stimulating cytokines. *Cytokine* 1995; 7 ( 4 ): 344-354.
- Tonimura T, Yokota M, Takiguchi M. Experimental visceral *larva migrans* in mokey. 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.
- Torbit J, Sutton B. Toxocariasis Previously Misdiagnosed as an Optic Nerve Coloboma Indianapolis. Eye Care Center, Indiana University School of Optometry, 2000.
- Tyzard I. *Inmunologia Veterinaria*, 6ª ed. México: El Manual Moderno, 2000.
- Universidad de Chile. Boletín Chileno de Parasitología, Facultad de Medicina, Instituto de Ciencias Biomédicas, Programa de Parasitología 2000; 55 ( 3-4 ).
- Wade ES, Georgi H. Radiolabeling and autoradiographic tracing of *Toxocara canis* larvae in male mice. *J Paras* 1987; 73 ( 1 ): 116-120.
- Wang MQ, Jiang HJ, Inohue H, Myozaki M, Yamashita U. B cell mitogenic activity of *Toxocara canis* adult worm antigen. *Parasit Immunol* 1995; 17: 609-615.
- Warren KS, Mahmoud AAF. Algorithms in the diagnosis and management to exotic diseases. *J Infect Dis* 1977; 55: 99-109.
- Wen-Ching Y, Shuchang H, Jia-Hung L, Po-Chi S, Yu-Tzu H, Wen-Chung T, *et al*. Use of Fluorescein Labelled Antibody and Fluorescence Activated Cell Sorter for Rapid Identification of Mycobacterium Species. *Biochem Biophys Res Comm* 1998; 250 ( 2 ): 403-408.
- Woodruff AW, Bisseru B, Bowe JC. Infection with animal helminths as a factor in causing poliomyelitis and epilepsy. *Br Med J* 1966; 1: 1576-1579.

Yamasaki H, Taib R, Watanabe Y, Wash MJ, Zasmy N, Araki K. Molecular characterization of a cDNA encoding an excretory-secretory antigen from *Toxocara canis* second stage larvae and its application to the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Paras Int* 1998; 47: 171-181.

Yamashita U, Jiang HG, Inohue H, Mutoh Y, Fujita H. Immune functions of *Toxocara canis*-infection. *Jpn J Parasitol* 1993; 42: 211-219.

Yaron I, Yaron R, Soji F, Oluwole M, Hardy A. UVB Irradiation of Human-Derived Peripheral Blood Lymphocytes Induces Apoptosis but Not T-Cell Anergy: Additive Effects with Various Immunosuppressive Agents. *Cel Immunol* 1996; 168 ( 2 ): 258-266.