



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

Identificación y caracterización parcial de la actividad  
proteolítica del fluido perivitelino y de los productos  
liberados por la larva L2 de *Toxocara canis*

## T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

**GONZALO ERNESTO GONZALEZ PAEZ**

TUTOR: **FERNANDO ALBA HURTADO**

COMITE TUTORAL: **JORGE LUIS TORTORA PEREZ**

**SERGIO RODRIGUEZ CAMARILLO**



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Gonzalo Ernesto  
González Páez

FECHA: 26/01/06

FIRMA: González Páez Gonzalo

## AGRADECIMIENTOS

1. Dr. Gerardo García Tovar (FESC-C4): por las facilidades proporcionadas en el laboratorio y la ayuda en diferentes técnicas metodológicas para la realización de ésta tesis.
2. Dra. Mireya de la Garza (CINVESTAV): por consejos y ayuda metodológica en la preparación de geles de sustrato, así como en la concentración de proteínas.
3. Dr. Raúl Argüello García (CINVESTAV): por préstamo de material, ayuda metodológica y revisión de mi trabajo durante todo el proceso de realización.
4. MVZ. Germán Isauro Garrido (FESC C-4): por realización de laminillas de histología de intestinos de ratones infestados con *Toxocara canis*, además de la manufactura de pistilos para homogenizador.
5. M en C. Pablo Martínez Labat (FESC C-4): Por la revisión anticipada y consejos en la escritura de ésta tesis.
6. M en C. Misael Rubén Oliver González (FESC C-4): por ayuda en la realización de SDS-PAGE.
7. MVZ Reina (FESC C-4): por la ayuda con los cultivos celulares, medios de cultivo y de placas de agar.
8. Sr. Abel (FESC C-4): Por la ayuda brindada con el material y reactivos de laboratorio.
9. Sr. Rafael "Don Rafa" (FESC): Por la ayuda con el manejo y necropsias de cachorros.

## ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
I. Taxonomía de <i>Toxocara canis</i>	2
II. Morfología	3
III. Ciclo Biológico	8
IV. Epidemiología	13
V. Patología	17
VI. Antígenos de excreción-secreción	23
VII. Implicaciones inmunológicas	27
VIII. Proteasas	29
IX. Actividad de proteasas en nematodos y su relación con la patogenicidad	33
X. Importancia del fluido perivitelino	36
2. JUSTIFICACIÓN	38
3. HIPÓTESIS	40
4. OBJETIVOS	40
5. MATERIAL Y MÉTODOS	41
6. RESULTADOS	46
7. DISCUSIÓN	69
8. CONCLUSIONES	76
9. BIBLIOGRAFÍA	77

## LISTA DE CUADROS

1. Frecuencia de <i>Toxocara canis</i> en el hospedero definitivo	14
2. Seroprevalencia de anticuerpos hacia <i>Toxocara canis</i> en humanos en diferentes lugares del mundo	16
3. Contaminación con huevos de <i>Toxocara canis</i> en áreas públicas	17
4. Comparación de las proteínas detectadas en SDS-PAGE al 10% en condiciones reductoras en diferentes productos de larvas de <i>Toxocara canis</i> (TES, PFP y EL)	66
5. Efecto del pH sobre las bandas con actividad proteolítica de TES en diferentes proteínas copolimerizadas a geles SDS-PAGE	67
6. Efecto del pH sobre las bandas con actividad proteolítica de diferentes productos de larvas de <i>Toxocara canis</i> en gelatina copolimerizada a geles SDS-PAGE	68

## LISTA DE FIGURAS

1. Gusanos adulto de <i>Toxocara canis</i> .	3
2. a) y b) Microfotografía electrónica de barrido de las aletas cervicales y labios de <i>Toxocara canis</i> .	4
3. Huevo de <i>Toxocara canis</i> .	5
4. Huevo larvado y larva eclosionando de <i>Toxocara canis</i> .	5
5. Microfotografía por microscopía de transmisión de la superficie corporal de la larva de <i>Toxocara canis</i> (x100,000).	6
6. Estructuras anatómicas de la larva de <i>Toxocara canis</i> .	7
7. Ciclo Biológico de <i>Toxocara canis</i> .	12
8. Corrimiento electroforético del sobrenadante de cultivo (TES) de larvas L <sub>2</sub> de <i>T. canis</i> .	49
9. Corrimiento electroforético de los productos del fluido perivitelino (PFP) de los huevos larvados de <i>T. canis</i> .	50
10. Corrimiento electroforético del extracto de larvas (EL) L <sub>2</sub> de <i>T. canis</i> .	51
11. Detección de la actividad proteolítica de los TES en geles de SDS-PAGE al 10% copolimerizado con gelatina al 0.1%.	52
12. Inhibición de la actividad proteolítica de los TES producida por su incubación durante 30 minutos a 37°C con diferentes inhibidores de proteasas.	53
13. Detección de la actividad proteolítica de los productos de fluido perivitelino (PFP) en geles de SDS-PAGE al 10% copolimerizado con gelatina al 0.1%.	54
14. Inhibición de la actividad proteolítica de los productos de fluido perivitelino (PFP) de huevos larvados de <i>T. canis</i> producida por su incubación durante 30 minutos a 37°C con diferentes inhibidores de proteasas.	55
15. Detección de la actividad proteolítica de un extracto de larvas 2 de <i>T. canis</i> en geles de SDS-PAGE al 10% copolimerizado con gelatina al 0.1%.	56

16. Inhibición de la actividad proteolítica del extracto de larvas 2 de <i>T. canis</i> producida por su incubación durante 30 minutos a 37°C con diferentes inhibidores de proteasas.	57
17. Detección de la actividad proteolítica de TES en geles de SDS-PAGE al 10% copolimerizado con laminina (0.5 mg/gel).	58
18. Inhibición de la actividad proteolítica de TES producida por su incubación durante 30 minutos a 37°C con diferentes inhibidores de proteasas.	59
19. Detección de la actividad proteolítica de TES en geles de SDS-PAGE al 10% copolimerizado con fibronectina (0.5 mg/gel).	60
20. Inhibición de la actividad proteolítica de TES producida por su incubación durante 30 minutos a 37°C con diferentes inhibidores de proteasas.	61
21. Detección de la actividad proteolítica de los TES en geles de SDS-PAGE al 10% copolimerizado con albúmina al 0.1%	62
22. Inhibición de la actividad proteolítica de TES producida por su incubación durante 30 minutos a 37°C con diferentes inhibidores de proteasas.	63
23. Detección de la actividad proteolítica de los TES en geles de SDS-PAGE al 10% copolimerizado con IgG de cabra al 0.1%.	64
24. Inhibición de la actividad proteolítica de TES producida por su incubación durante 30 minutos a 37°C con diferentes inhibidores de proteasas.	65



## RESUMEN

Las larvas de *Toxocara canis* (*T. canis*) migran por diferentes órganos del hospedero como: corazón, ojo, pulmón, riñón, músculo y cerebro. La larva de *T. canis* no posee estructuras como son ganchos, dientes o garras que le permitan penetrar y migrar por los tejidos del hospedero, por lo que se piensa que lo hace a través de enzimas que degradan proteínas del hospedero. Sin embargo existe muy poca información al respecto. En el presente trabajo se intentó identificar y caracterizar parcialmente enzimas con actividad proteolítica que se pudieran localizar en el fluido perivitelino (PFP), en los productos de secreción-excreción (TES) y en los extractos de larvas (EL) de *T. canis*. Los TES se obtuvieron por concentración de los sobrenadantes de los cultivos de larvas L<sub>2</sub> de *Toxocara canis* en medio RPMI-1640 suplementado con 1% de glucosa. Los EL del filtrado de macerados de las larvas de *T. canis*. Los PFP del sobrenadante resultante de la eclosión de las larvas. Para detectar la actividad proteolítica contenida en estas preparaciones se copolimerizaron diferentes proteínas: gelatina, albúmina, IgG de cabra, laminina y fibronectina en geles de poliacrilamida. Para identificar el grupo de proteasas a la que pertenecen las bandas detectadas se utilizaron inhibidores específicos de cisteín, serín, aspartil y metalo-proteasas. Los corrimientos de los TES en geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie mostraron 8 bandas protéicas con PM de 400, 120, 70, 55, 45, 32, 26, y 24 kDa. Una serin-proteasa de 120 kDa con actividad proteolítica en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina, albúmina e IgG de cabra. La actividad de esta proteasa no presentó variación en su actividad a ninguno de los pH utilizados (5.5, 7.5 y 9.0). Sin embargo, en geles de poliacrilamida copolimerizados con IgG de cabra la mayor actividad de la proteasa se observó a pH de 7.6. Los TES presentaron 4 serín proteasas de 81, 46, 34 y 32 kDa con actividad sobre geles con laminina y 3 serin proteasas de 81, 46 y 32 kDa con actividad sobre geles con fibronectina. La mayor actividad de estas proteasas se observó a pH 9. Los PFP en geles SDS-PAGE presentaron 4 bandas de 55, 45, 40 y 38 kDa respectivamente. Se detectaron 3 aspartil proteasas de 91, 68 y 38 kDa con actividad sobre geles con gelatina. Estas proteasas tuvieron mayor actividad a pH 5.5. Se detectaron 8 bandas de 150, 74, 55, 47, 45, 37, 32 y 28 kDa de PM en los EL corridos en geles SDS-PAGE. El EL presentó dos serín-proteasas de 61 y 69 kDa con actividad sobre geles con gelatina. Estas enzimas tuvieron mayor actividad a pH 7.5. Se demostraron proteasas producidas por larvas de *T. canis* que no habían sido reportadas anteriormente y que posiblemente faciliten la migración de las larvas por los tejidos de sus hospedadores o el proceso de eclosión del huevo.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Toxocara canis* es un nematodo parásito, comúnmente encontrado en los perros pero capaz de invadir una amplia variedad de otros hospederos, incluyendo a los humanos (Glickman & Schantz, 1981; Lewis & Maizels, 1993). Este parásito realiza una migración tisular que puede permanecer por muchos años en los tejidos del hospedero, tiene la habilidad de cruzar la placenta e infestar a los fetos en perras gestantes, muestra un tropismo hacia el tejido nervioso en hospederos paraténicos, tiene la habilidad de sobrevivir *in vitro* por algunos meses en medios de cultivo libres de suero, secreta tanto *in vitro* como *in vivo* de una serie de glicoproteínas activas, y presenta una capa superficial que se desprende del parásito ante el ataque del sistema inmune (Maizels & Robertson, 1991).

### I. TAXONOMÍA DE *Toxocara canis*

Phylum NEMATHELMINTHES

Clase NEMATODA

Subclase SECERNENTEA (PHASMODIA)

Orden ASCARIDIDA (Skrjabin, 1915)

Familia TOXOCARIDAE

Subfamilia TOXOCARINAE Hartwitch, 1954

Género: *Toxocara* (Nadler, 1992; Stiles, 1905)

Especie: *canis* (Werner, 1782)

## II. MORFOLOGÍA

### a) Adultos

El cuerpo del adulto de *Toxocara canis* (Figura 1) es cilíndrico y blanquecino con estrías transversales irregulares y aletas cervicales estrechas y lanceoladas (Figura 2a). En la parte anterior presenta tres labios que son característicos de los ascáridos (Figura 2b). Los labios están formados por dos lóbulos laterales diferentes separados por un canalículo, entre los cuales existe un lóbulo intermedio simple. Los lóbulos laterales se estrechan hacia la parte anterior, terminando en un proceso digitiforme que acaba en forma redondeada con pequeños denticulos. El orificio oral se abre en el centro de los labios y se continúa en un esófago que presenta un bulbo posterior muscular (Levine, 1980).

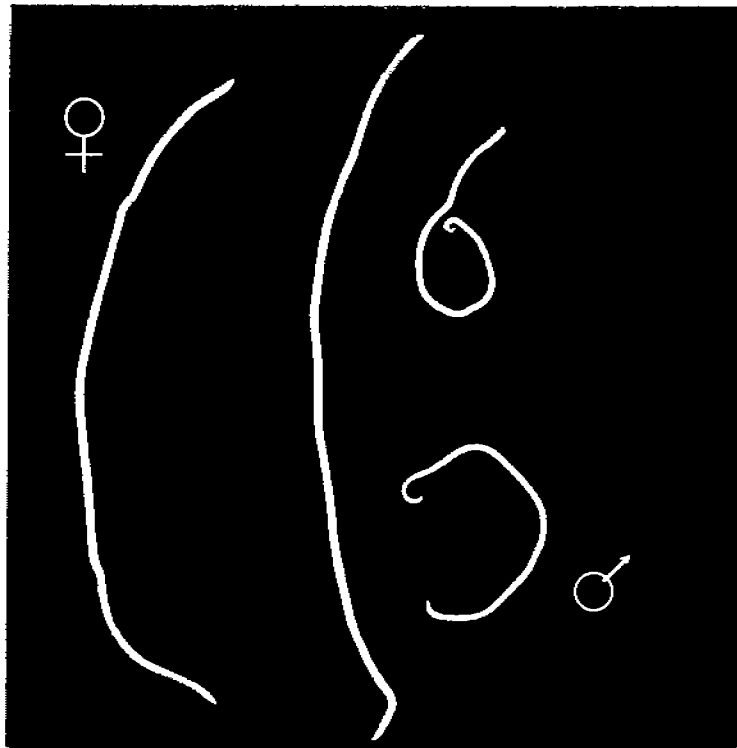


Figura 1. Gusanos adulto de *Toxocara canis*. Fotografía del autor.



Figura 2a y 2b. Microfotografía electrónica de barrido de las aletas cervicales y labios de *Toxocara canis* (Kunkel, 2002)

Los machos miden 9 a 11 cm de longitud por 2.5 mm de diámetro (Schmidt & Roberts, 1984) con un extremo caudal curvado digitiforme, sin aletas caudales, y con dos series de 20-30 papilas preanales, cinco papilas posanales a cada lado de la cola y una papila subventral doble a cada lado del ano, posterior a la cloaca. Presenta espículas ligeramente desiguales y curvadas de 750-1500  $\mu\text{m}$  de longitud y carece de gobernáculo (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

La hembra mide de 6.5 a .18 cm de longitud por 2.5-3 mm de diámetro y su extremo posterior es romo. La vulva se sitúa en el cuarto anterior del cuerpo y cada puesta se estima en unos 200, 000 huevos por día (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

#### **b) Huevos**

Los huevos de *Toxocara canis* son redondos y miden de 85-95  $\mu\text{m}$  x 75-90  $\mu\text{m}$  (Soulsby, 1982; Quiroz, 2003; Beaver, 1986). Son pegajosos, tienen una cubierta gruesa ornamentada, con pequeñas hendiduras o depresiones, y en su interior se encuentra la célula huevo globular, que ocupa prácticamente la totalidad de la cavidad interna, de color oscuro uniforme (Figura 3) (Bardón, 1992).



Figura 3. Huevo de *Toxocara canis*. (Garbus, 2003)

El cascarón esta formado por cuatro capas de diferente naturaleza, del interior al exterior lipídica, quitinosa, vitelina y albuminosa (Bardón, 1992).

#### c) Larvas

La larva de segundo estadio, que se forma por muda de la L1 dentro del huevo (Figura 4), es la forma infestante del parásito. Presenta una longitud media de 404  $\mu\text{m}$  (360-434  $\mu\text{m}$ ), con un diámetro a nivel del esófago de 18-21  $\mu\text{m}$  (Nichols, 1956).

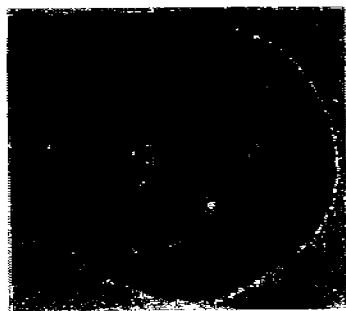


Figura 4. Huevo larvado y larva eclosionando de *Toxocara canis*. Fotografía del autor.

Por microscopía electrónica de transmisión, Vegni Talluriet *et al.*, (1986) observaron que la superficie corporal de la larva se encuentra fuertemente estriada (Figura 5). La cavidad bucal, en posición subterminal y dorsalmente inclinada, está

rodeada de tres labios desarrollados, los cuales están presumiblemente implicados en la recolección del alimento y el anclaje de los tejidos durante la migración. Ligeramente anterior a los labios se sitúa una cápsula bucal superficial, cuyo margen ventral está formado por una cutícula fina, espinosa y afilada y en el extremo anterior de la larva se encuentran las papilas cefálicas

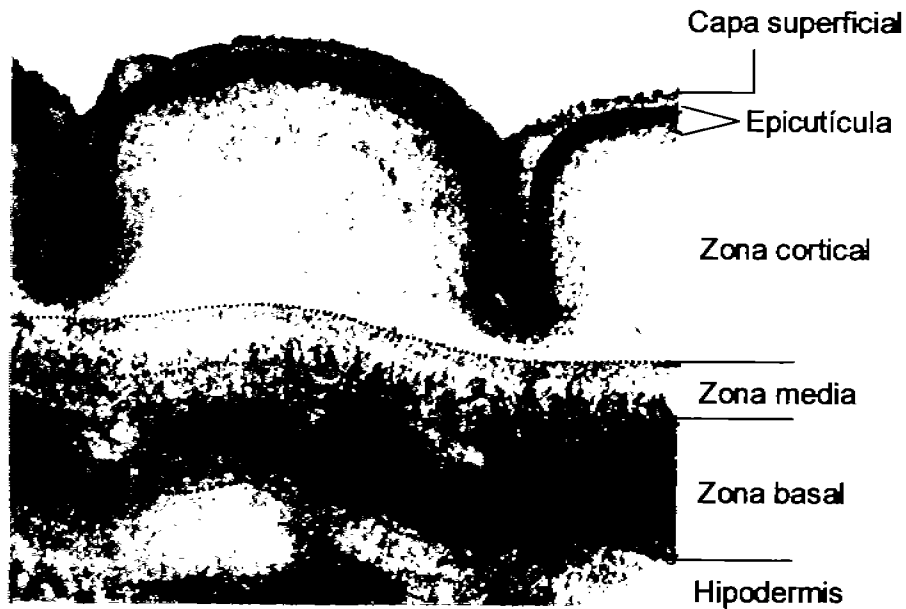


Figura 5. Microfotografía por microscopía de transmisión de la superficie corporal de la larva de *Toxocara canis* (x100,000) (Page *et al.*, 1992)

El aparato bucal continúa en un esófago largo que ocupa un tercio de la longitud total de la larva. A nivel del primer tercio del esófago se sitúa un anillo nervioso muy marcado, mientras que en la posición subterminal se encuentran las células excretoras que desembocan en un poro excretor, situado entre ambas estructuras y desplazado hacia la primera. El esófago se prolonga en un intestino cilíndrico que desemboca en un ano situado en la porción subterminal. El primordio genital se encuentra en el último tercio y adosado a la pared intestinal (Nichols, 1956).

El extremo posterior de la larva es digitiforme, aguzado y ligeramente asimétrico (Figura 6). Posee también dos alas que aparecen como dos líneas refráctiles y que se extienden desde la boca al poro anal (terminan a unos 20  $\mu\text{m}$  del extremo final), así

como dos pares de papilas, un par anterior al poro excretor y otro par detrás de la mitad del cuerpo, cerca del ala lateral (Nichols, 1956).

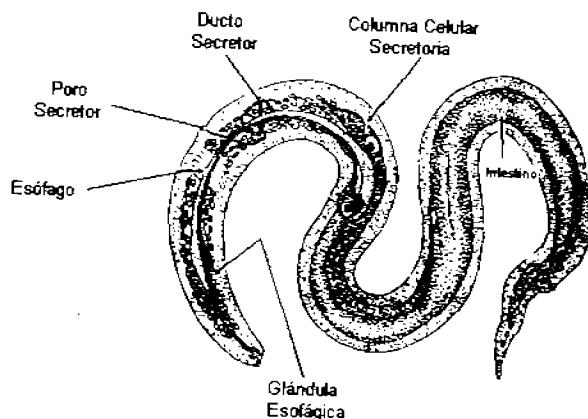


Figura 6. Estructuras anatómicas de la larva de *Toxocara canis* (Nichols, 1956).

Por microscopía electrónica de transmisión, Vegni Talluri *et al.* (1986), observaron tres proyecciones cuniculares separando la cavidad bucal de las cavidades del vestíbulo. Estas estructuras podrían funcionar como una válvula que se abre y se cierra, coordinándose con el movimiento de bombeo del sistema de alimentación, para prevenir la regurgitación del contenido del tracto alimentario. Este mecanismo puede estar soportado por unas fibras musculares que constituyen una gruesa capa al principio del esófago. Debido a que la capa cuticular que cubre estas proyecciones es más gruesa y aparentemente más fuerte que la cutícula adyacente de la cavidad vestibular, podría ser utilizada también como trituradora de alimento.

El esófago ocupa, aproximadamente, un tercio de la longitud total de la larva, y se puede dividir en cuatro regiones: procorpus (20  $\mu\text{m}$  de longitud), metacorpus (35  $\mu\text{m}$  de longitud y 5  $\mu\text{m}$  de ancho), istmo (equivalente a procorpus y metacorpus juntos) y bulbo terminal (20-25  $\mu\text{m}$  de longitud y 6-10  $\mu\text{m}$  de ancho). Rodeando al esófago se encuentra una glándula dorsal bien definida y dos subventrales situadas en la porción posterior del esófago. La abundancia de retículo endoplásmico rugoso y la presencia de

aparato de Golgi en el citoplasma de las células de la glándula dorsal, indica que está intervienen en la secreción de proteínas. Las secreciones de estas células, así como las de las glándulas esofágicas posteriores, además de participar en el mecanismo de alimentación pueden, estar implicadas en la secreción de enzimas histolíticas en el hábitat del hospedero, para facilitar la penetración de las larvas a través de los tejidos (Bardón, 1992).

El intestino aparentemente carece de lumen y está constituido por siete células alargadas cuyo citoplasma contiene gránulos opacos de grasa. El intestino está comprimido lateralmente por las columnas excretoras y posteriormente se expande y ocupa todo el cuerpo de la larva. La última célula intestinal termina 20-30  $\mu\text{m}$  antes del poro anal, con el que se conecta por un fino tubo cuticular. El primordio genital es una pequeña masa situada entre el intestino y la pared corporal ventral, desde la porción anterior al nivel medio del intestino, lo forman cuatro células que no son separables individualmente (Bardón, 1992).

### III. CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico de *Toxocara canis* (Figura 7) es complejo y varía con la edad del hospedero. Puede comprender transmisión prenatal (transplacentaria), calostrala (lactogénica), transmisión directa y transmisión por hospederos paraténicos.

#### a) Cachorros

En cachorros de pocas semanas a tres meses de edad, se produce el siguiente esquema de migración traqueal (Webster, 1958): Inicialmente los huevos alcanzan el estado infestante en 10-15 días, en condiciones ambientales óptimas. Tras la ingestión, las larvas eclosionan en el duodeno y el segundo estado larvario (posiblemente el tercero, según Arango, 1972) atraviesa la pared intestinal y pasa por sangre venosa al hígado. La mayor parte de las larvas alcanzan este órgano a los dos días post-infestación. Hacia el quinto día post-infestación, a través de la vena hepática, llegan al



corazón, arteria pulmonar y a los pulmones cuando miden 800-950  $\mu\text{m}$  de longitud. Atraviesan epitelio de capilares pulmonares y alveólos pulmonares, posteriormente migran a los bronquiolos, tráquea, laringe y faringe en donde son deglutidas, con lo que alcanzan el estómago hacia el décimo día. El tercer estado larvario se forma en los pulmones, tráquea y esófago, y el cuarto estado en el intestino delgado, aproximadamente dos semanas después de la ingestión de los huevos. La muda final a adulto se produce entre la tercera y la cuarta semana, y la enfermedad se evidencia a las cuatro o cinco semanas (Bardón, 1992).

Los gusanos adultos pueden vivir aproximadamente cuatro meses en el intestino delgado y la mayoría se expulsa antes de que el cachorro alcance seis meses de edad. Una pequeña cantidad de larvas en estos cachorros no llegan a completar el ciclo hasta el estado adulto, dado que desde los pulmones vuelven al corazón por la vena pulmonar y desde allí, a través de la circulación sistémica, se distribuyen por todo el organismo, localizándose en los distintos tejidos somáticos, sin desarrollo posterior (Bardón, 1992).

#### **b) Perro adulto**

A medida que los cachorros crecen, se produce un descenso en la tendencia del tipo de desarrollo traqueal, que es sustituido por la migración larvaria. Las larvas migran a diversos órganos y tejidos, y permanecen en estos como larvas de segundo estado. La edad a la cual cesa la migración traqueal y comienza la fase somática varía considerablemente, y está en función del sexo del perro, de exposiciones previas al parásito y de la dosis de huevos ingerida (Koutz y col, 1966).

#### **c) Perra gestante**

El tipo somático de migración sucede cuando los huevos infestantes de *Toxocara canis* son ingeridos por una perra adulta. Ocho días después de la infestación, el segundo estado se encuentra ya en diversos tejidos del cuerpo (hígado, pulmones, riñón), y así permanecen sin experimentar ningún desarrollo. Estas larvas se convierten en residentes de los tejidos del perro adulto, y allí permanecen durante algún tiempo.

Los procesos de diferenciación que con posterioridad sufren estas larvas no están completamente aclarados, pero durante la gestación se movilizan y migran al feto, dando lugar a una infestación prenatal. Las larvas somáticas que se encuentran latentes se reactivan en el interior del granuloma. Estas larvas, así como las procedentes de los huevos recién ingeridos, migran a través de la placenta hasta alcanzar el hígado fetal, resaltando el hecho de que alcanzan el hígado migrando a través de los tejidos del cordón umbilical más que por la ruta hematógica de la vena umbilical (Sprent, 1958). Douglas y Baker (1959) sugirieron que esta movilización no se produce antes del 42º día de gestación, y también que las larvas debían ser adquiridas por la perra al menos 14 días antes de ello; de lo contrario, la infestación no tiene lugar. No todas las larvas se movilizan en cada gestación, sino que algunas permanecen para experimentar el proceso en gestaciones posteriores. La permanencia de las larvas en las perras puede ser larga, y los animales infestados incluso durante más de un año son todavía capaces de transmitir la infestación a cachorros. El factor o factores que inducen la movilización de las larvas y su migración no están determinados, pero tienen probablemente una causa hormonal.

Cuando las larvas alcanzan el hígado del feto sufren una muda, transformándose en larvas de tercer estado, las cuales al producirse el nacimiento del cachorro aparecen en los pulmones, localización en donde siguen apareciendo durante la primera semana de vida. La muda al cuarto estado se produce durante esta primera semana, cuando las larvas están en los pulmones o, posteriormente, en el estómago. Hacia el fin de la segunda semana, las larvas mudan al quinto estado, alcanzando entonces los 5-7 mm de longitud. Posteriormente, experimentan un rápido crecimiento, y las forma adultas pueden encontrarse al final de la tercera semana, si bien su número se incrementa durante las dos semanas siguientes (Sprent, 1958).

#### **d) Perra lactando**

También se producen infestaciones neonatales de los cachorros desde la madre a través de la ruta transmamaria (Stone y Girardeau, 1967). Las larvas pasan a los cachorros lactantes por el calostro, y se desarrollan directamente, dando gusanos adultos en su intestino. A pesar de esto, la transmisión transmamaria es relativamente poco

importante si se le compara con la ruta prenatal; Burke (1985) observó que el 98.5% de las infestaciones de los cachorros son prenatales y el 1.5% se realiza durante la lactancia.

#### **e) Hospederos paraténicos**

Otro modo adicional de infestación es el que se realiza debido a los hábitos depredadores del hospedero canino. Los huevos infestantes ingeridos por roedores producen larvas de segundo estado, que se alojan en diversos tejidos y órganos de estos hospederos paraténicos. Tales larvas prosiguen su desarrollo cuando el roedor es ingerido por un carnívoro, y el parásito alcanza, sin migración, el estado adulto en el intestino (Soulsby, 1987).

#### **f) Humanos**

En el caso de que los huevos de *Toxocara canis* sean ingeridos por humanos, las larvas penetran el epitelio mucosal pero tiempo después, quedan en una fase de desarrollo restringido en el tejido. No obstante, las larvas no muestran un desarrollo o diferenciación morfológica y no pueden completar su ciclo de desarrollo, pero mantienen un metabolismo activo mostrando un comportamiento migratorio regularmente hacia músculo esquelético y tejido nervioso. Sus recorridos por todo el cuerpo en esta fase conducen al estado clínico conocido como *larva migrans visceral* y *larva migrans ocular* (Maizels et al., 2000).

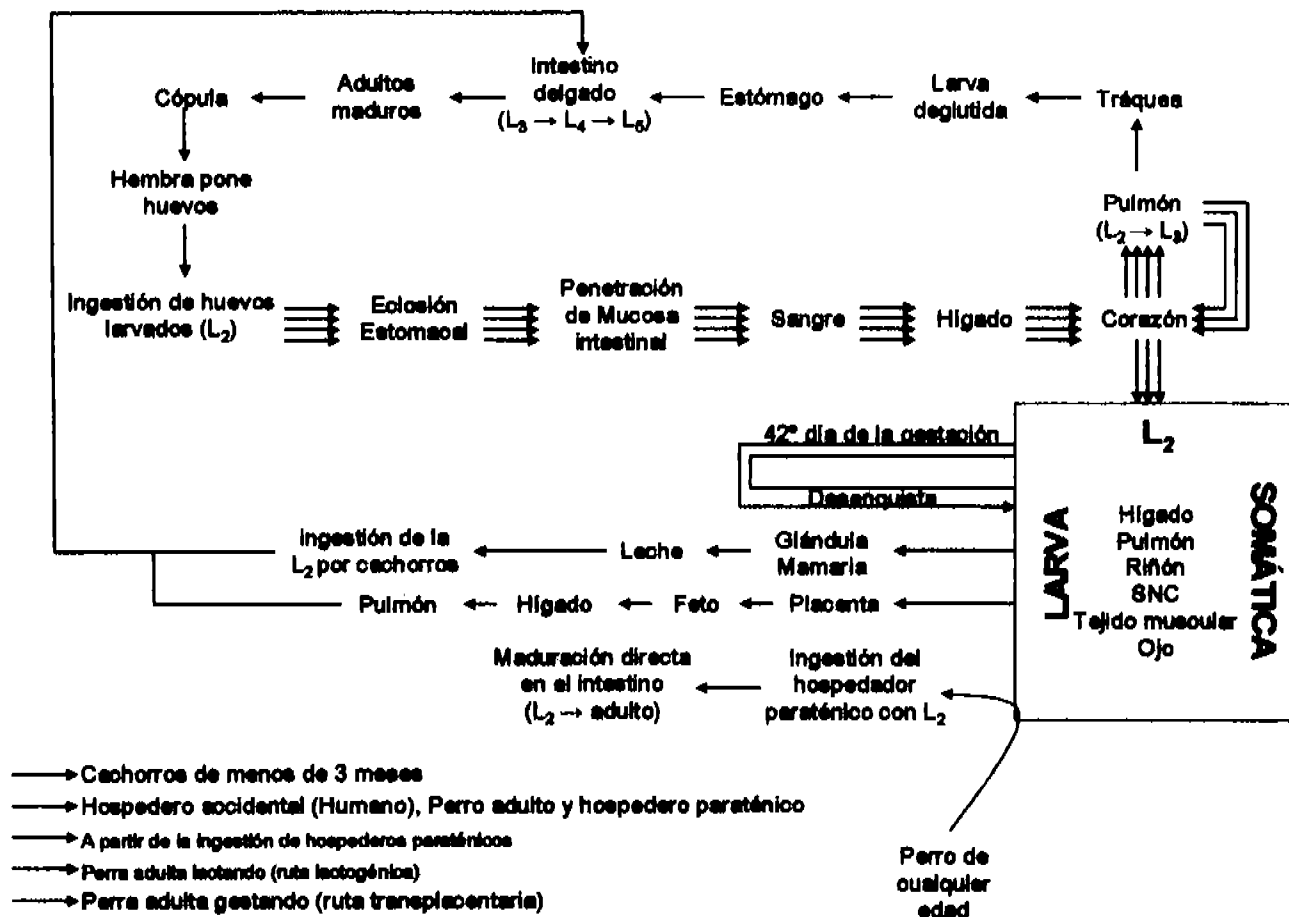


Fig. 7. Ciclo Biológico de *Toxocara canis*. Las flechas indican el tipo de migración llevada a cabo por el parásito.

#### IV. EPIDEMIOLOGÍA

La Toxocariosis es una de las más importantes enfermedades parasitarias de perros y otros caninos. Su distribución geográfica es mundial, con alta incidencia y patogenicidad. La costumbre del hombre de vivir rodeado de animales domésticos, particularmente de perros y gatos, ha facilitado que la toxocariosis sea una de las zoonosis helmínticas más ampliamente difundidas en todo el mundo (Despommier, 2003).

La fuente de infestación son los perros y otros carnívoros que contaminan con sus heces el suelo. Los huevos eliminados son resistentes a la mayoría de los desinfectantes de uso común y a las condiciones del medio ambiente siempre y cuando exista humedad. La evolución del huevo para desarrollar la segunda larva depende además de oxígeno, de una temperatura adecuada (Quiroz, 2003).

La prevalencia de *Toxocara canis* en los perros es muy alta debido, sobre todo, a la eficiencia de la transmisión prenatal, por lo que la mayoría de los perros cachorros recién nacidos están infestados con *Toxocara canis*. Numerosos estudios arrojan positividad desde el 5% hasta más del 80% en los resultados (Cuadro 1), los cuales dependen de la procedencia de los animales, condiciones higiénico-sanitarias e incluso de las diferencias en los procedimientos de diagnóstico (Cordero del Campillo *et al.*, 1999 y Quiroz, 2003).

Cuadro 1. Frecuencia de *Toxocara canis* en el hospedero definitivo.

Región	Tipo de muestra	Número de casos	% de Parasitación	Referencia
Egipto	heces	---	80.6%	Khalil, 1977
Nigeria	heces	---	18.55%	Fashuyi, 1981
Canadá	heces	332	34%	Ghadirian <i>et al.</i> , 1976
E.U.A	heces	182	49.5%	Marron & Schroeder, 1978
Brasil	heces y necropsia	158	44.3%	Chieffi & Muller, 1976
Japón	heces	15	86.6%	Matsumura & Endo, 1982
Pakistán	heces	150	48.6%	Umar <i>et al.</i> , 1986
Armenia	heces	---	42.8%	Davidyants & Chobanyan, 1981
Bélgica	necropsia	212	38.9%	Vanparijis <i>et al.</i> , 1991
España	heces	400	31%	Simon & Conde Simón, 1987
Portugal	heces	100	36.3%	Arandas-Rego, 1980
Nueva Zelanda	heces	147	2.8%	Dodge, 1980
México, D.F.	heces	470	19.8%	Eguia-Aguilar, 1998
México, D.F.	necropsia	100	15%	Martínez <i>et al.</i> , 1998

--- no determinado

Ocasionalmente intervienen hospederos paraténicos (roedores, aves) en los que se encuentran con cierta frecuencia larvas tisulares, lo que presenta otra posibilidad de infestación para el perro. Los huevos de *Toxocara canis* pueden ser ingeridos por una variedad de hospederos paraténicos como gusanos de tierra, ratas, ratones, palomas, pollos, borregos, ovejas, cerdos, tortugas, cucarachas y muy significativamente los humanos. La infestación humana ha sido clásicamente asociada a la geofagia (pica), pero la ingestión de huevos puede ocurrir mediante manos contaminadas con heces y/o por comer vegetales y productos animales crudos contaminados (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

La tendencia de algunos niños de comer tierra (pica) es el factor principal de riesgo de la infestación. La compulsión de comer tierra por un desorden conductual puede afectar del 2-10% de los niños entre los 1-6 años de edad. La pica está frecuentemente asociada con deficiencia de hierro o zinc. Alrededor del 40% de los

pacientes con complicaciones oculares relacionadas con este parásito presentaron una historia clínica de pica (Overgaauw, 1997).

Las cifras de seroprevalencia (Cuadro 2), tanto en niños como adultos, muestran una distribución cosmopolita aunque con amplias variaciones de acuerdo con las características sanitarias de cada país o región. Las poblaciones de bajo nivel socio-económico presentan generalmente altas tasas de infección por *Toxocara* y concomitantemente también alta frecuencia de enteroparásitos; en los países desarrollados, aún cuando la prevalencia de enfermedades parasitarias es habitualmente baja, la Toxocariosis es la helmintiosis más frecuente (Anaruma y col., 2002).

Cuadro 2. Seroprevalencia de anticuerpos hacia *Toxocara canis* en humanos en diferentes lugares del mundo. PCI: Parálisis cerebral infantil

Región	Muestra de la población	Seroprevalencia	Referencia
Francia	Adultos sanos Zonas urbanas	2%	Magnaaval <i>et al.</i> , 2001
Italia	Adultos sanos Zonas urbanas	3.9%	Genchi <i>et al.</i> , 1990
Corea	Adultos sanos Zonas urbanas	5%	Park <i>et al.</i> , 2002
Suecia	Adultos sanos Zonas urbanas	7%	Ljungstrom & Van Knapen, 1989
Escocia	Adultos sanos Zonas rurales	16%	Girdwood <i>et al.</i> , 1978
Polonia	Adultos sanos Zonas rurales	20.7%	Hermanowska <i>et al.</i> , 2001
Sur de Francia	Adultos sanos Zonas rurales	37%	Glickman <i>et al.</i> , 1987
Indias Occidentales	Niños	86%	Thompson <i>et al.</i> , 1986
Isla la Reunión Colonia Francesa (Cte Africano)	Adultos	92.8%	Maganaval <i>et al.</i> , 1994
Bedford, Ing.	Niños	14.6%	Josephs <i>et al.</i> , 1981
Londres	Adultos donadores de sangre	2.6%	De Savigny <i>et al.</i> , 1979
Australia	Adultos donadores de sangre	7%	Nicholas <i>et al.</i> , 1986
Venezuela	Indios Amazónicos	34.9%	Lynch <i>et al.</i> , 1988
E.U.A	Niños	4.6-7.3%	Hermann <i>et al.</i> , 1985
Alemania	Niños	2.5%	Lamina, 1986
Caribe	Niños	83%	Thompson <i>et al.</i> , 1986
Brasil	Niños	39%	Tolan <i>et al.</i> , 2001
Rep. Checa	Niños	5.8-36%	<i>Idem</i>
España	Niños	5.2%	<i>Idem</i>
Jordania	Niños	10.9%	<i>Idem</i>
Colombia	Niños	47.5%	<i>Idem</i>
Nepal	Niños	81%	<i>Idem</i>
Rep. Eslovenia	Niños	13%	<i>Idem</i>
Querétaro (Mex)	Niños	7.5%	Martínez <i>et al.</i> , 1997
México, DF	Niños (PCI)	1.9%	Fernández <i>et al.</i> , 1999
Cd. de México	Adolescentes	0.13%	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2000



Las personas que habitan en ambientes contaminados con huevos de *Toxocara spp.* también están expuestos a un gran riesgo de infestación. Los datos sobre la presencia, concentración y estado de embrionamiento de huevos potencialmente infestantes de *Toxocara canis* en el ambiente pueden proveer un ensayo útil en el nivel y significancia de la contaminación en una localidad dada (Cuadro 3) (Holland, 1997).

Cuadro 3. Contaminación con huevos de *Toxocara canis* en áreas públicas.

Región	Procedencia	Número de casos	% de contaminación	Referencia
Canadá	Parques públicos	43	32.55%	Ghadirian <i>et al.</i> , 1976
E.U.A	Parque públicos	232	22%	Dada & Lindsquist, 1979
Brasil	Parques públicos	15	60%	Chieffi & Muller, 1978
Corea	Campos de fútbol	—	7.90%	Lee <i>et al.</i> , 1982
India	Parques	527	46.43%	Gunaseelan <i>et al.</i> , 1985
Japón	Parques	227	41.9%	Uga <i>et al.</i> , 1989
Alemania	Parques infantiles	31	87%	Duwell, 1983
España	Zonas de entrenamiento canino	21	47.6%	Angulo <i>et al.</i> , 1985
Inglaterra	Parques	503	66%	Snow <i>et al.</i> , 1987
Portugal	Parques públicos	23	39.13%	Arandas-Rego, 1980
Australia	Cajones de arena para juegos	41	0%	Winkel <i>et al.</i> , 1990

## V. PATOLOGÍA

### a) Perros

El daño generado por *Toxocara canis* está en relación por una parte, con sus necesidades metabólicas y, por otra, con la migración larvaria que realizan por diferentes tejidos.

Las infestaciones moderadas en cachorros normalmente no cursan con manifestaciones apreciables en la fase de migración extraintestinal. En cambio, las infestaciones intensas pueden manifestarse por tos, taquipnea, flujo nasal, y signos nerviosos de intranquilidad, que podrían deberse a la acción irritativa de los adultos en el intestino, o bien a las larvas erráticas en el sistema nervioso autónomo (SNA). Paralelamente se observan alteraciones digestivas como emisión de heces blandas, a veces diarreicas y con frecuencia se acompañan de abundante mucosidad y sangre. El abdomen se puede encontrar muy dilatado, con reacción dolorosa a la palpación y no es rara la eliminación de nematodos con el vómito o de forma espontánea con las heces. El raquitismo que se observa con frecuencia en los cachorros puede obedecer a invasiones intensas por ascáridos (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

El daño ocasionado en el intestino delgado por las formas juveniles y los adultos de *T. canis* en el intestino delgado se debe en parte a la acción mecánica por obstrucción, que dependiendo de la cantidad de gusanos, interfiere notablemente con el paso de alimentos, alterando la digestión y absorción. Otras veces los parásitos invaden el conducto colédoco y canales biliares produciendo estasis biliar y provocan por una parte mala digestión debido a la deficiente cantidad de bilis que pasa al intestino y por otra, congestión biliar a nivel hepático. Este nematodo en su localización intestinal se alimenta principalmente del contenido intestinal. Esta acción es una competencia por los elementos nutritivos del hospedero, que pueden ocasionar desnutrición (Quiroz, 2003).

La acción irritativa que provocan estos ascáridos sobre la pared intestinal interfiere también con una adecuada digestión. Por otra parte, algunos productos de excreción-secreción (TEX) alteran el contenido intestinal, provocando mala digestión y por otra parte, problemas de intoxicación al ser absorbidos (Quiroz, 2003).

Las formas juveniles y los adultos en el intestino causan enteritis catarral, algunas veces con perforación intestinal y peritonitis, sobre todo en cachorros. Un estado de desnutrición es evidente con la presencia de un abdomen abultado, mucosas pálidas y gran cantidad de gusanos en el intestino delgado (Quiroz, 2003).

Las larvas de *Toxocara canis* en la placenta y en el feto a nivel de hígado, pulmón y cerebro ejercen acciones mecánicas, expoliatriz, traumática, tóxica y antigénica (Quiroz, 2003).

## **b) Humanos**

### **i) *Larva migrans visceral***

El síndrome de larva migrans visceral (VLM) se ha descrito en humanos por la migración de las larvas de *T. canis* y ocasionalmente por otros nematodos (*Capillaria hepatica*, *T. cati*, *Gnathostoma sp.*, *Ascaris suum* y *Ascaris lumbricoides*) (Gillespie & Pearsons, 2001).

La enfermedad frecuentemente se observa en niños que practican la geofagia e ingieren los huevos embrionados que se encuentran en la tierra. Usualmente no causa severos problemas, sin embargo puede persistir por meses o por más de un año (Shore, 2001). Algunos síntomas de infestación incluyen tos, ronquera, fiebre, con infiltración pulmonar, hepatomegalia, esplenomegalia y anemia (Gillespie & Pearsons, 2001).

Una segunda fuente probable de infestación para el hombre, la cual ha sido poco considerada pero es de gran importancia, es que la larva está presente en los tejidos de los animales de consumo humano. Por ejemplo, la larva de *T. canis* se ha encontrado en hígado de cerdo. En este sentido Beaver (1966) reportó que una alta y persistente eosinofilia, sugestiva de infestación con *Toxocara canis* u otros helmintos, estuvo presente en todos los pacientes a los que se les prescribió hígado crudo como tratamiento para la anemia perniciosa.

La migración de las larvas de *T. canis* continúa a través de la fase aguda de la enfermedad y éstas pueden encontrarse en hígado, pulmón, riñón, corazón, músculo, cerebro y ojo (Beaver *et al.*, 1952). La larva atrapada en estos sitios no induce una reacción tisular (Byres & Kimura, 1974) pero sí un granuloma eosinofílico característico, formado por células epitelioides y células gigantes (Beaver *et al.*, 1952)

alrededor de la larva, producido por una reacción inflamatoria eosinofílica y neutrofilica en el hospedero. Los eosinófilos y los monocitos del granuloma son gradualmente rodeados por una cápsula fibrosa (Higashikawa, 1960).

La migración de las larvas por los pulmones resulta en la infiltración con células inflamatorias. Snyder (1961) reportó consolidaciones focales en los pulmones observados radiográficamente en el 42% de niños con larva migrans visceral. Los síntomas respiratorios implicados (tos y silvidos) fueron aparentes en el 20% de estos pacientes; fueron vistos signos de complicaciones respiratorias en más del 70% de los pacientes.

La migración de gran número de larvas de *Toxocara canis* al músculo cardíaco se ha asociado con casos fatales de *larva migrans visceral* con miocarditis granulomatosa y necrosis focal de la musculatura cardíaca. Una marcada miositis con granulomas de 2 a 2.5 mm y granulomas crónicos de 1.5 mm de diámetro han sido registrados en ratones infestados experimentalmente (Becroft, 1964).

Varias implicaciones neurológicas han sido reportadas ocasionalmente en pacientes con *larva migrans visceral*. Beaver (1952) reportó el hallazgo de larvas en cerebros humanos en asociación con la enfermedad. Otros cuadros como encefalitis y signos de ataxia, parálisis, convulsiones y epilepsia han sido reportados (Schochet, 1967), así como títulos de anticuerpos positivos hacia *T. canis* en un alto porcentaje, 20 y 16% de los adultos y niños epilépticos respectivamente, contra el 4.5% de la población adulta normal. Critchley *et al.*, (1982), también reportaron una alta prevalencia de anticuerpos a *T. canis* en pacientes epilépticos, pero no establecieron una relación causal entre la epilepsia y la infestación por *T. canis*.

El papel de la larva de *T. canis* en la etiología de las alteraciones en el sistema nervioso central (SNC) ha sido ensayado experimentalmente. La larva migra al cerebro de ratones y hospederos paraténicos primates (no humanos) (Glickman & Summers, 1983) y se ha visto que se acumula en el cerebro de los ratones tiempo después de la infestación (Kayes & Oaks, 1976). Burren (1968) reportó que la larva no fue

encapsulada en el cerebro de los ratones pero que, por su migración en el cerebro la larva deja rastros marcados por una infiltración de linfocitos. En monos, se han reportado granulomas y destrucción focal del cerebro y médula espinal (Glickman & Summers, 1983). Estos mismos autores reportaron granulomas histiocíticos debido al daño mecánico en el tejido cerebral y el granuloma formado por células gigantes, macrófagos, células mononucleares y eosinófilos rodeando a la larva. Signos severos neurológicos se han reportado también en monos. Seis de nueve monos infestados con 100,000 a 400,000 huevos de *T. canis* mostraron una invasión larvaria cerebral discreta y un leve depresión, pero los tres monos restantes mostraron signos neurológicos severos que terminaron en parálisis de 8 a 16 días después de la infestación con una invasión larvaria marcada y cambios patológicos en el cerebro (Tomimura *et al.*, 1976). Dos de los ocho monos infestados con 45,000 huevos y uno de los ocho monos infestados con tres dosis de 15,000 huevos desarrollaron signos de ataxia a los días 41 al 50 y al día 83 después de la infestación. Este signo no fue progresivo pero si persistió durante algún tiempo (Glickman & Summers, 1983).

#### *ii) Larva migrans ocular*

La presencia y el daño producido por las larvas de *T. canis* en el ojo determina una enfermedad conocida como *larva migrans ocular* (OLM). La reacción a cuerpos extraños y a los antígenos puede causar un daño local o general en la retina y otras estructuras intraoculares, la infestación intraocular es usualmente unilateral, pero ocasionalmente los dos ojos son afectados (Gillespie & Pearsons, 2001).

La toxocariosis ocular se observa generalmente en ausencia de otros signos y síntomas de VLM, por lo que se considera que sucede en personas inicialmente expuestas a un pequeño número de larvas, por lo que no montan una respuesta inmune importante y las larvas pueden migrar libremente por varios órganos y accidentalmente llegar al ojo (Schantz *et al.*, 1979; Glickman & Shofer, 1987).

La toxocariosis ocular puede tener varios cuadros clínicos, ninguno de ellos característicos. Las manifestaciones incluyen falta de agudeza visual, estrabismo, leucorrea, irritación ocular y endoftalmitis (Shields, 1984).

Las lesiones detectadas en los ojos han sido granulomatosas ubicadas cerca del disco óptico o intrarretinales, retinocoroiditis posterior y periférica, panuveítis, papilitis óptica, uveítis, deformación o desprendimiento de retina, infiltración de células inflamatorias en humor vítreo, lesiones hemorrágicas y neurorretinitis como secuela de migración de larvas en retina (Smith & Greer, 1971).

La presencia de una sola larva viable parece ser la responsable de las lesiones oculares. Así, Watzke *et al.*, (1984), encontraron larvas viables activas en ojos inflamados de primates, mientras que no hubo larvas en los ojos donde las lesiones no estuvieron presentes. También, una inyección intravítrea de larvas muertas de *T. canis* en monos y larvas muertas de *A. suum* en cobayos, indujeron solo una leve inflamación del humor vítreo con infiltrados celulares mononucleares. En contraste, una inyección intraocular de medio de cultivo de *T. canis* y que presumiblemente tenía antígenos de excreción-secreción (TES), causó severas reacciones inflamatorias del humor vítreo del día 3, hasta una y media semanas después de la inyección, sin embargo la inflamación disminuyó rápidamente un mes después (Watzke, 1984).

### *iii) Toxocariosis encubierta*

Se refiere a un cuadro clínico frecuentemente mal diagnosticado, ya que transcurre enteramente en la modalidad subclínica, apenas identificable por las pruebas serológicas con un sinnúmero de síntomas inespecíficos (Rovedo *et al.*, 1992).

La toxocariosis encubierta ha sido descrita con una serie de síntomas que son inespecíficos, pero juntos forman una enfermedad reconocible. Los síntomas inducen dolor abdominal, anorexia, sueño y comportamiento alterado, adenitis cervical, ronquera, problemas respiratorios (Mustoe, 1999), dolor de cabeza asociado con una eosinofilia normal o ligeramente elevada (Radman' *et al.*, 2000). La eosinofilia es

menos frecuente y menos pronunciada que el VLM y los títulos de anticuerpos contra *T. canis* también son menores (Tolan *et al.*, 2001).

### **iii) *Toxocariosis cerebral***

La larva de *T. canis* migra al cerebro de animales de laboratorio experimentalmente infestados. Sin embargo, una revisión de la literatura inglesa de 1950 a la fecha, encontró menos de veinte reportes de toxocariosis cerebral en humanos. Se han detectado larvas de *Toxocara canis* en el fluido espinal del cerebro (CSF), en el tejido cerebral, en las meninges, y/o por inmunodiagnóstico en CSF (Wang *et al.*, 1983).

La frecuencia y localización de la larva de *T. canis* en el SNC en humanos es desconocida. Estudios de autopsia de casos aislados han revelado larvas de *T. canis* en leptomeninges (Dent *et al.*, 1956), en la materia gris y blanca del cerebro y cerebelo (Hill *et al.*, 1985), tálamo (Beautyman *et al.*, 1966) y médula espinal (Dent *et al.*, 1956). La mayoría de estos casos no presentaron signos clínicos neurológicos. Por esta razón, el significado clínico y la frecuencia verdadera de la localización cerebral de la larva de *Toxocara canis* en casos no fatales es desconocida.

## **VI. ANTÍGENOS DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN (TES)**

La habilidad de los parásitos en etapa arrestada para sobrevivir en los tejidos por muchos años depende de mecanismos inmuno-evasivos y anti-inflamatorios muy sofisticados y dependientes del parásito (Ghafoor *et al.*, 1984; Smith, 1991). Las macromoléculas secretadas son los primeros candidatos para explicar la evasión inmune. Los anticuerpos hacia glicoproteínas TES secretadas, también detectan antígenos *in vivo*, lo cual sugiere que estos productos son secretados por los parásitos durante la infestación. Se piensa que este parásito utiliza gran parte de su energía en la producción de estas moléculas para evadir la respuesta inmunológica (Tetteh *et al.*, 1999).

De tiempo atrás se reconoce que los productos secretados por los nematodos constituyen un aspecto relevante para su éxito como parásitos (Schwartz, 1921; Stirewalt, 1963). De Savigny (1975) fue el primero en demostrar que la larva de *T. canis* puede ser cultivada por largos periodos de tiempo, y que los sobrenadantes de estos cultivos contienen antígenos, los cuales fueron mostrados posteriormente como específicos en el diagnóstico en la toxocariosis humana (Sugane & Oshima, 1983; Maizels *et al.*, 1984, 1993; Badley *et al.*, 1987).

Durante los últimos años, los genes que codifican los antígenos secretados y de superficie de *T. canis* han sido clonados y expresados designándolos a ambos como TES (indicando el peso molecular del producto correspondiente). Como resultado de estas investigaciones, estos productos son los mejor caracterizados entre los helmintos parásitos en términos de su repertorio de proteínas secretadas (Page *et al.*, 1992).

Cinco macromoléculas TES principales han sido definidos y están descritos como TES-32, TES-55, TES-70, TES-120 y TES-400 kDa (Maizels *et al.*, 1984; Meghji & Maizels, 1986; Maizels & Robertson, 1991). Todos los productos TES están glicosilados. Estos glicoconjugados son rápidamente reconocidos por el sistema inmunológico y provocan una fuerte respuesta de anticuerpos. No hay evidencia de que esta respuesta tenga una función protectora y Maizels y Robertson (1991) han sugerido que una de las ventajas de producir grandes cantidades de estos antígenos de excreción-secreción es el distraer al sistema inmunológico al sintetizar anticuerpos no protectores.

#### **TES-26, Tc-PEB-1, proteína con afinidad a fosfatidil-etanolamina**

El gen para TES-26 es uno de los más expresados en la etapa de larva infectiva, sin embargo no se ha encontrado mRNA para el TES-26 en gusanos adultos de *T. canis* (Gems *et al.*, 1995). La parte carboxilo terminal en el aminoácido 138 muestra una similitud significativa (36% de similitud en aminoácidos) a la proteína con afinidad a fosfatidil-etanolamina de mamífero, que es muy abundante en los espermatozoides



(Gems *et al.*, 1995). Estudios de unión con TES-26 recombinante mostraron que es una proteína con afinidad a fosfatidil-etanolamina funcional (Gems *et al.*, 1995).

### **TES-32, Te-CTL-1, Lectina 1 de tipo C**

TES-32 es la proteína más abundante secretada por el parásito (Maizels *et al.*, 1984). Se conoce por reactividad con anticuerpos monoclonales, que esta proteína se expresa en la matriz cuticular de la larva del parásito (Page *et al.*, 1992). Mediante la secuenciación completa del dominio principal, se mostró una similitud con lectinas de tipo C de mamíferos (dependientes de calcio) (C-TLs).

Las predicciones con modelos estructurales muestran una forma muy similar del TES-32 con una lectina con afinidad a manosa de mamífero, pero con diferencias cruciales alrededor del sitio activo. La mayoría de los miembros de la superfamilia de C-TL son receptores de mamíferos tales como las selectinas, CD23 y DEC-205. Otras lectinas de tipo C incluyen a la proteína A con afinidad a manosa (MBP-A) encontrada en el suero de mamíferos y en moléculas de defensa innata de invertebrados (Weis *et al.*, 1998). Por lo anterior, se postula una proteína relacionada con las defensas del hospedero, que permite al parásito, “distracer” al sistema inmune (Loukas & Maizels, 1999).

### **TES 45 y TES 55**

Son dos glicoproteínas que han sido identificadas a nivel genético y también pertenecen al grupo de las lectinas. Por cromatografía de afinidad con manosa-agarosa se muestra que TES-32 se une selectivamente y también TES-45 en pequeñas cantidades. Al contrario de TES-32, TES-45 no se une a la N-acetilgalactosamina. No hay información secuencial del TES-45, pero este se reconoce por anticuerpos policlonales generados por TES-32 sugiriendo una secuencia similar entre ambas. TES-55 ya ha sido purificada y secuenciada (Loukas *et al.*, 2000).

### **TES-70, Tc-CTL-4, Lectina 4 de tipo C**

TES-70 es una glicoproteína secretada en abundancia, recientemente se encontró que es una nueva lectina de tipo C. Exhibe actividad de lectina uniéndose específicamente a las superficies de células epiteliales (MDCK, riñón canino) de manera calcio-dependiente (Loukas *et al.*, 2000). Esta es una importante demostración de que los ligandos para las lectinas de *T. canis* incluyen determinantes sobre la superficies celulares del hospedero.

### **TES-120, mucinas Tc-MUC-1, MUC-2 y MUC-3**

Un componente principal de la capa superficial de la larva de *T. canis* migra electroforéticamente como una serie de 3 bandas relativamente cercanas con una movilidad aparente de 120 kDa en SDS-PAGE. Una de estas fue clonada, secuenciada e identificada como una mucina rica en serina designada MUC-1 (Gems & Maizels, 1996). Se ha establecido recientemente que hay al menos cinco genes distintos para mucinas en este parásito, las cuales presentan similitud general, pero con diferencias importantes. Estas, nombradas MUC-2, MUC-3, MUC-4 y MUC-5 y son ricas en treonina.

Por espectrofotometría de masas de las bandas purificadas y con la generación de anticuerpos hacia secuencias específicas de las mucinas, se ha establecido que MUC-1, MUC-2 y MUC-3 están presentes como un complejo de proteínas secretadas como TES-120 (Loukas *et al.*, 2000).

Dos mucinas más, MUC-4 y MUC-5 han sido ya clonadas (Loukas *et al.*, 2000), pero hasta ahora no hay datos que sugieran que estas moléculas sean secretadas por las larvas. En el caso de MUC-5, la liberación no parece probable ya que esta molécula tiene alto contenido de lisina y se sabe que TES-120 no incorpora lisina (Gems & Maizels, 1996).

## TES-400

TES-400 es un componente difuso de alto peso molecular, distinto en muchos aspectos a otros TES. A diferencia de las proteínas pequeñas, TES 400 no es detectado en la superficie de la larva por ninguna técnica de marcado; parece que esta molécula es predominantemente un carbohidrato, por datos de tinción en geles con ácido peryódico de Schiff, unión a lectinas y sensibilidad proteolítica (Meghji & Maizels, 1986).

TES-400 es resistente a la mayoría de las proteasas. TES-400 reacciona con anticuerpos policlonales hacia Tc.CTL-1, pero no con anticuerpos monoclonales Tcn-3 específicos de CTL-1 (Loukas *et al.*, 1999). Esto sugiere que TES-400 puede ser análogo a los proteoglicanos de mamífero tales como agrecan y brevicán, los cuales contienen dominios de lectina dentro de una estructura altamente glicosilada.

## VII. IMPLICACIONES INMUNOLÓGICAS

Los nematodos constituyen uno de los grupos de animales más numerosos y extendidos y sorprendentemente una alta proporción de especies conocidas se han adaptado a un estilo de vida parasitario (Malakhov, 1994).

Considerando que los nematodos parásitos están continuamente expuestos a los ataques inmunológicos de sus hospederos durante varios años, ellos deben de desarrollar mecanismos de inmunoevasión efectivos. De hecho, tanto mecanismos muy elaborados para evitar y bloquear mecanismos inmunes efectores, así como una modulación eficiente de los efectos del sistema inmunológico, han sido descritos en los últimos años (Maizels *et al.*, 1993).

En forma aparente, los nematodos parásitos actúan sobre el sistema inmunológico del hospedero a través de una variedad de moléculas inmunomoduladoras (Allen & MacDonald, 1998) que bloquean los mecanismos efectores incluyendo la red de citocinas. Los mecanismos de evasión empleados por la larva de *T. canis* y otros

incluyen: muda de componentes de la superficie de la cutícula (Maizels & Selkirk, 1988), liberación de enzimas antioxidantes (Soto, 1998), re-localización en los tejidos de sus hospederos (Kusama *et al.*, 1995), camuflaje con moléculas de origen del hospedero o expresión de moléculas similares a las del hospedero sobre su superficie (mimetismo molecular) e inmunomodulación (Soto, 1998).

## VIII. PROTEASAS

### a) Generalidades

Las proteasas (hidrolasas peptídicas) catalizan el rompimiento de enlaces amido en las proteínas y péptidos oligoméricos. Las proteasas se han identificado en sistemas biológicos desde los virus hasta los vertebrados. Mientras que los proyectos de secuenciación genómica se completan, ha quedado claro que las proteasas comprenden aproximadamente el 2% de todos los genes expresados en todos los organismos (Barret, 1980). Se ha estimado que una proteasa puede degradar millones de enlaces peptídicos por segundo.

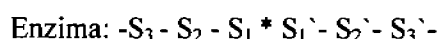
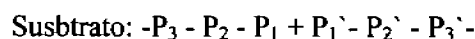
Las proteasas catalizan un gran cantidad de reacciones biológicas, las cuales incluyen el metabolismo protéico, reacciones inmunológicas, remodelación de los tejidos (McKerrow, 1989) y en casos particulares como en la coagulación sanguínea, fibrinolisis, el sistema del complemento y el procesamiento de precursores de hormonas por convertasas específicas (Neurath, 1999).

Las proteasas varían desde monómeros de 10 kDa hasta complejos multiméricos de algunos cientos de kDa. La catálisis puede ser iniciada ya sea dentro de la cadena polipeptídica (actividad de endoproteasas) o en la parte amino o carboxilo terminal (exoproteasa) (Sajid & McKerrow, 2002).

### b) Terminología de especificidad-subsitio

Las estructuras cristalográficas muestran que el sitio activo de una proteasa está comúnmente localizado en un surco sobre la superficie de la molécula entre dominios estructurales adyacentes y la especificidad del sustrato esta determinada por los sitios de unión arreglados a lo largo del surco en uno o en ambos lados del sitio catalítico que es responsable de la hidrólisis del enlace peptídico. De acuerdo con esto, la especificidad de una proteasa esta descrita por el uso de modelos conceptuales en donde cada subsitio específico es capaz de acomodar un lado de la cadena de un solo residuo de aminoácido.

Los sitios están enumerados desde el sitio catalítico,  $S_1, S_2 \dots S_n$  hacia el extremo amino terminal (N) del sustrato, y  $S_1', S_2' \dots S_n'$  hacia el extremo carboxilo terminal (C). Los aminoácidos se acomodan y son enumerados  $P_1, P_2 \dots P_n$  y  $P_1', P_2' \dots P_n'$ , respectivamente, como sigue:



Aquí, el sitio catalítico de la enzima está marcado como \*, y el enlace peptídico que está partido (el enlace de corte) está indicado por el símbolo + (NC-IUBMB, 1992).

### c) Tipo catalítico

Hartley (1960) fue el primero en señalar que las enzimas proteolíticas pueden ser agrupadas de acuerdo a su naturaleza química de su sitio catalítico. Hartley reconoció cuatro tipos distintos de sitios catalíticos, tipo serina, cisteína, aspártico y metalo (Barret, 1980). Recientemente, ha sido descubierto el grupo de las treonín-proteasas. Estos grupos contribuyen tanto a los sistemas actuales de nomenclatura y clasificación de las proteasas, como al sistema EC (Comité de Enzimas) y el sistema MEROPS.

### d) Clasificación y Mecanismo

#### i) Serín-proteasas

Esta son las proteasas más estudiadas tal vez de toda la enzimología. Las proteasas de tipo serina, incluyen dos distintas familias: las serín-proteasas de mamíferos (tripsina, quimotripsina y elastasa) y las serín-proteasas de bacterias (subtilisina). La familia de las serín-proteasas mejor caracterizada y fisiológicamente más versátil es la de los mamíferos. Este tipo de proteasas se han encontrado en eucariontes e incluye proteasas extracelulares como la tripsina, elastasa, trombina, proteasas involucradas en la cascada de la coagulación sanguínea y proteasas celulares. La mayoría de estas proteasas en las células de mamíferos se encuentran en gránulos

secretores como los gránulos azurófilos o en gránulos especializados. Algunas están involucradas en reacciones de procesamiento específico de proteínas y otras son proteasas generales que ejercen su acción cuando se secretan. La principal característica de los sitios activos de este tipo de proteasas es la triada catalítica Asp 102 –His 57 –Ser 195; la reacción de catálisis procede vía un intermediario tetrahédrico de transición durante los procesos de deacilación y acilación, involucrando una unión covalente de los substratos al residuo de serina (Beynon & Bond, 2001)

El diisopropilfosfofluoridato (DFP), históricamente uno de los inhibidores de proteasas más ampliamente utilizados, es un miembro de los organofosforados que inhibe irreversiblemente a las serín-proteasas. Otros inhibidores incluyen el fenilmetanosulfonilfluoruro (PMSF) y clorometilcetonas como TLCK (N-p-tosil-L-lisilclorometilcetona), TPCK (L-1-cloro-3-[4-tosilamido]4-fenil-2 butanona, tosil fenilalanin clorometilcetona) y la Leupeptina (Beynon & Bond, 2001).

## ii) Cisteín-proteasas

Las proteasas de tipo cisteína contienen un residuo de cisteína esencial, el cual está involucrado en la formación de un complejo covalente intermediario con el sustrato. La catálisis procede vía intermediario tiol-éster y es facilitado por los lados de la cadena adyacentes a la histidina 159 adyacente y al ácido aspártico 158 (Bond & Butler, 1987).

Las proteasas de este tipo incluyen varias catepsinas lisosomales de mamífero, las proteasas activadas por calcio (calpaínas) y las proteasas de plantas, papaína y actinidina (EC 3.4.22.2) que son los miembros más estudiados de la familia de las cisteín-proteasas. Las proteasas de este tipo se encuentran en varias superfamilias relacionadas evolutivamente, tres de las cuales están representadas por la proteasas de *Streptococcus*, la clostripaína de *Clostridium histolyticum* y por la papaína de *Carica papaya* (Bond & Butler, 1987).

La mayoría de las proteasas de este tipo, descritas en células de mamífero, se encuentran principalmente en el citosol o en lisosomas y ejercen su acción en estos compartimentos. Estas proteasas tienen actividad proteolítica poco específica y pueden estar involucradas en las etapas inicial o final de degradación extensiva de proteínas (Bond & Butler, 1987).

Los inhibidores específicos clásicos de las cisteín-proteasas están comprendidos en cinco categorías: los diazometanos (Z-Phe-Arg-CHN<sub>2</sub>), los epóxidos (E-64), las fluorometilcetonas (Z-Val-Ala-Asp-CH<sub>2</sub>F), las aciloximetil cetonas (Z-Phe-Ala-CH<sub>2</sub>OCOR) y los inhibidores naturales conocidos como cistatinas (Bond & Butler, 1987).

### iii) Aspártico-proteasas

Las aspártico proteasas incluyen a la penicilopepsina bacteriana, la pepsina de mamíferos, la renina y la quimosina y ciertas proteasas de hongos. Estas proteasas contienen en su sitio activo dos residuos de ácido aspártico involucrados en la catálisis protéica. En general, se considera que en el mecanismo de este tipo de enzimas está involucrada una catálisis de tipo ácido-base, ya que en el intervalo de pH activo (2-4) una molécula de ácido aspártico es ionizada y la otra moléculas es desionizada y no se dá la formación de un intermediario covalente enzima-substrato (McKerrow & Doenhoff, 1988).

En mamíferos, las pocas aspártico-proteasas que se han identificado en las células se encuentran asociadas a gránulos secretorios, membranas, endosomas o lisosomas. La principal enzima intracelular de este tipo es la catepsina D, que es una enzima lisosomal y la renina, que se encuentra en gránulos secretorios en el riñón. Las proteasas de algunos virus, incluyendo el VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana), también se encuentran dentro de este tipo de enzimas (McKerrow & Doenhoff, 1988).

Este tipo de enzimas, de manera general, son inhibidas específicamente por Pepstatina, un hexapéptido parecido a un compuesto secretado por especies de



*Streptomyces*, el cual en el estado de transición regenera sustratos normales, además por Epoxi-(p-nitrofenoxi)-propano y por compuestos diazoacetilo como el diazoacetil-norleucina-metil-éster (North, 1982).

### iiii) Metaloproteasas

Las enzimas de este tipo contienen en su sitio activo un ión metálico, el cual desempeña un papel clave en la unión al sustrato, ya que éste está unido a dos cadenas laterales de histidina y a un ácido glutámico. La molécula también tiene sitios de unión para calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ), y este ión es importante para estabilizar la unión más que para la actividad catalítica (Kester & Matthews, 1977).

Las metaloproteasas se encuentran ampliamente distribuidas en organismos procariontes y eucariontes, incluyen algunas enzimas de vertebrados como las colagenasas, carboxipeptidasas, aminopeptidasas y las elastasas de los macrófagos y *Pseudomonas*. Las metaloproteasas que se encuentran en las células de los mamíferos están asociadas al retículo endoplásmico, membrana plasmática, mitocondrias y citosol; son inhibidas por agentes quelantes como el EDTA (Ácido etilendiamino tetraacético), 1,10-fenotrolina y ovostatinas de huevo de gallina (McKerrow *et al.*, 1993).

Las cuatro clases de proteasas descritas actúan de manera óptima a determinados intervalos de pH; las aspártico proteasas a 2.5-4.5, las proteasas de cisteína: 5.5-7.5, las metaloproteasas y de tipo serina en un valor neutro y ligeramente alcalino (McKerrow *et al.*, 1993).

## IX. ACTIVIDAD DE PROTEASAS EN NEMATODOS Y SU RELACION CON LA PATOGENICIDAD

Los productos E/S y sus funciones en los nemátodos no siempre pueden ser distinguidas claramente. Poco se sabe acerca de los orígenes anatómicos de la mayoría

de los productos E/S, el mecanismo que utilizan para su transporte fuera de los gusanos, o de las funciones que estos tienen antes o después de su eliminación por el parásito. Aún si los materiales “secretados” son definidos estrictamente como aquellos que se originan en algún tipo de glándula o de una estructura especializada para la secreción, y exhiben algún tipo de función para permitir la adaptabilidad de los nematodos, existe una lista sustancial de moléculas de este tipo. Pocas de ellas han sido caracterizadas ampliamente. Desafortunadamente, las moléculas identificadas típicamente carecen de actividades biológicas bien definidas, mientras que las respuestas biológicas relevantes son causadas por moléculas de las cuales su estructura no ha sido aún bien determinada (Lee, 2002).

Los nematodos liberan enzimas y productos metabólicos (Miller, 1984) los cuales junto con el material cuticular (Philipp *et al.*, 1980) son llamados colectivamente antígenos de excreción-secreción (TES). La liberación de las enzimas proteolíticas (proteasas) por helmintos parásitos está bien documentada (Brand, 1973). Estas enzimas están implicadas en numerosos procesos tales como: la penetración a los tejidos del hospedero (Matthews, 1977), efectos anticoagulantes (Hotez & Cerami, 1983), digestión extracorporal (Brand, 1973) y el rompimiento proteolítico de las inmunoglobulinas (Auriault *et al.*, 1981). Las proteasas pueden también deteriorar los mecanismos de defensa del hospedero por la inactivación del complemento y de mediadores citotóxicos expresados por los leucocitos del hospedero (Leid, 1987).

Se acepta que las proteasas de los nematodos presentes en extractos crudos, así como en los productos de excreción-secreción, son enzimas implicadas en aspectos biológicos importantes para los parásitos (Polzer & Conradt, 1994). Por otra parte, se ha demostrado que estas moléculas son estado-específicas (McKerrow & Dohenhoff, 1988) y que el cambio en el patrón de las proteasas podría estar relacionado con el rompimiento de barreras tanto mecánicas como inmunológicas con las que el parásito se encuentra dentro del hospedero (Moczon & Wraniez, 1999).

Entre los nemátodos parásitos de los animales, un ejemplo ilustrativo es la liberación de una hialuronidasa por larvas de *Ancylostoma*. El mucopolisacárido

conocido como ácido hialurónico sirve como un importante mediador en las uniones células-células en la dermis de mamíferos, además de ser uno de los componentes del gel intersticial del tejido conectivo. Las larvas migratorias de *Ancylostoma* secretan una hialuronidasa la cual despolimeriza al ácido hialurónico y facilita el movimiento a través de la piel y una metaloproteasa que es capaz de degradar macromoléculas de tejido conectivo. Esta actividad es muy pronunciada en la larva de *A. braziliense*, el cual infecta a los humanos y a otros mamíferos principalmente por la invasión a través de la piel. Consistente con los altos niveles de hialuronidasa secretada por la larva, estas especies son capaces de migrar a través de capas profundas de la dermis y esto representa la mayoría de las veces el síndrome de larva migrans cutánea en humanos (Hotez *et al.*, 1992).

Las proteasas secretadas también facilitan la invasión de los hospederos vertebrados. Las larvas infestantes de *Strongyloides stercoralis* secretan una metaloproteasa con actividad en contra de algunas proteínas estructurales de la dermis, incluyendo la elastina (McKerrow *et al.*, 1990) La enzima es secretada por la larva L3 en cultivo y es alergénica en los humanos. Proteasas similares son encontradas en etapas infestantes en la mayoría de los otros nemátodos (Dubremetz & McKerrow, 1995).

Las proteasas secretadas por los nemátodos parásitos de los animales se ha sugerido, que inactivan componentes de la respuesta del hospedero además de predigerir los tejidos del hospedero con finalidad nutricional (Rifkin *et al.*, 1996). Una familia de 4 cisteín-proteasas secretadas por el adulto y L4 (pero no L3) de *Haemonchus contortus* degradan diversas proteínas del hospedero (Rhoads & Fetterer, 1995). Estas proteasas también rompen las cadenas pesadas de la IgG de oveja en la región de la bisagra, por lo que la inactivan. No es conocido si las proteasas tienen especificidades diferentes de sustrato, ni se conoce si la degradación de las IgG por estas proteasas tiene consecuencias funcionales para el establecimiento o el mantenimiento de la infestación. La inactivación del factor activador de las plaquetas (PAF) es un mecanismo alternativo de inmunomodulación. En la mayoría de los casos, la función de PAF en la fisiología de mamífero es la intervención en la respuesta inmunológica. Las etapas adultas del parásito intestinal *Nippostrongylus brasiliensis* mantenidas en cultivo secretan una

acetilhidrolasa que inactiva a PAF. Esta enzima es un heterodímero. No ha sido reportado cómo es secretada por *N. brasiliensis*, ni si enzimas similares son secretadas por otros nemátodos gastrointestinales. (Grigg *et al.*, 1996).

Algunos otros reportes incluyen la liberación de moléculas con actividad de proteasa por nematodos parásitos como *Ancylostoma caninum* y *Strongyloides stercoralis* (McKerrow *et al.*, 1990) los cuales secretan una metaloproteasa (Hotez *et al.*, 1985). La microfilaria de *Ochocerca lienalis* (Lackey *et al.*, 1989) y la cercaria de *Schistosoma mansoni* (McKerrow *et al.*, 1985) secretan una serín-proteasa.

Los adultos de *Schistosoma mansoni*, así como de *Fasciola hepatica* (Dalton & Heffernan, 1989) y *Haemonchus contortus* (Cox *et al.*, 1990) secretan proteasas del grupo tiol (cisteín-proteasas) las cuales incluyen a la hemoglobinasasa (Chappell & Dresden, 1986) y proteasas parecidas a la Catepsina B (Klinkert *et al.*, 1989). *Ancylostoma cantonensis* y *Ascaris suum* secretan aspartil proteasas (enzimas ácidas) ejemplificadas por las enzimas parecidas a la Catepsina D (Maki *et al.*, 1982).

Por su parte se ha observado que la larva de *Toxocara canis* secreta una serín-proteasa (Robertson *et al.*, 1989), la cual migra alrededor de 120 kDa en geles de sustrato, pero no ha sido posible hasta ahora asignarle esta actividad a una molécula en especial.

## X. IMPORTANCIA DEL FLUIDO PERIVITELINO

El fluido perivitelino que rodea a la larva no eclosionada contiene componentes que juegan roles importantes en el proceso de eclosión. Por ejemplo *C. elegans* secreta una metaloproteasa HCH-1 dentro del fluido perivitelino antes de la eclosión (Hishida *et al.*, 1996) y el papel de las enzimas en la eclosión parece ser central en este proceso de la mayoría de las especies de nematodos. Una electroforesis en gel de dos dimensiones del fluido perivitelino de *Ascaris suum* revela siete proteínas principales, una de las cuales fue identificada como una proteína de unión a ácidos grasos, As-p18

(Mei *et al.*, 1997). Estos autores sugieren que As-pl8 puede estar involucrada en secuestrar ácidos grasos tóxicos potenciales y sus productos de peroxidación que pueden acumularse alrededor de la larva no eclosionada, o pueda estar involucrada en mantener las características de permeabilidad de la capa lipídica.

La mayoría de los estudios sobre el fluido perivitelino se han concentrado en la función de los componentes de la trehalosa en la eclosión y supervivencia de los nematodos. La mayoría de la trehalosa en los huevos de los nematodos se encuentra en el fluido perivitelino; por ejemplo, el total del contenido de trehalosa contenida en los huevos de *Ascaris lumbricoides* y de *Nematodirus battus*, son del 50% y del 34% respectivamente. (Fairbairn & Passey, 1957; Ash & Atkinson, 1983). Cook & Bugg (1973), mostraron que los iones  $Ca^{2+}$  y la trehalosa llevan a cabo la estabilización de la membrana por entrecruzamiento de las moléculas de trehalosa con los iones  $Ca^{2+}$ . La trehalosa está involucrada en muchos aspectos de la fisiología de los nematodos (Behm, 1997) y está relacionada en la protección contra la desecación y congelamiento de las membranas biológicas reemplazando el agua normalmente asociada con las membranas (Crowe *et al.*, 1992). Como un constituyente del fluido perivitelino, se ha mostrado que la trehalosa contribuye a la protección contra la desecación de la larva no eclosionada de *Nematodirus battus* (Ash & Atkinson, 1983).

En el fluido perivitelino, la trehalosa provee un stress osmótico sobre la larva no eclosionada, lo cual causa una reducción en el contenido de agua de la larva. En este estado de hidratación incompleta, la presión hidrostática interna del nematodo parece que es insuficiente para antagonizar los músculos longitudinales y sostiene el movimiento continuo necesario para la eclosión. Por eso, la larva está quiescente y su supervivencia se ve aumentada, ya que por ejemplo, la utilización de la energía se ve minimizada. Después del estímulo de eclosión, los cambios en la permeabilidad de la cubierta del huevo permite la salida de la trehalosa fuera del huevo. Esto reduce la presión osmótica del fluido perivitelino y la larva no eclosionada es gradualmente expuesta a un nuevo ambiente dónde la presión osmótica reducida permite que el agua y la actividad metabólica de la larva aumenten permitiendo los movimientos continuos dentro del huevo (Ash & Atkinson, 1983).

## 2. JUSTIFICACIÓN

*Toxocara canis* es un nematodo parásito, comúnmente encontrado en los perros pero capaz de invadir una amplia variedad de hospederos, incluyendo a los humanos (Glickman & Schantz, 1981), causando lo que se conoce como síndrome de larva migrans visceral, larva migrans ocular (Perlingiero & Gyorgy, 1947) y recientemente la denominada Toxocariosis cerebral (Moreira-Silva *et al.*, 2004). Este parásito en su forma larvaria lleva a cabo una migración por los órganos del hospedero incluyendo al corazón, ojo, pulmón, riñón, músculo y cerebro. La larva de *T. canis* no posee estructuras (ganchos, dientes, garras, etc) que le permitan penetrar y migrar por los tejidos del hospedero, por lo que se piensa que la forma en que lo hace es, al menos en parte, por la acción de enzimas capaces de degradar proteínas del hospedero. Sin embargo existe muy poca información al respecto.

Robertson *et al.* (1989) reportaron que las larvas de *Toxocara canis* son capaces de secretar una serin-proteasa la cual migra alrededor de los 120 kDa en geles copolimerizados con gelatina. Otros autores han encontrado genes que codifican probablemente para otras proteasas, como es el caso de la catepsina L (Loukas *et al.*, 1998), una asparangil-endopeptidasa (Maizels *et al.*, 2000) y una catepsina Z (Falcone *et al.*, 2000). Sin embargo, ninguna de estas cisteín-proteasas ha sido encontrada en las secreciones de las larvas de *T. canis* y ningún gene que codifique para serin-proteasas ha sido identificado hasta ahora. Es posible que otras proteasas de este parásito que aun no se han caracterizado jueguen papeles importantes en la biología de las larvas.

En los trabajos reportados hasta el momento no se incluyen el efecto de las proteasas secretadas por *T. canis in vitro* sobre diferentes proteínas copolimerizadas en geles de poliacrilamida, lo cual podría tener importancia en cuanto al hecho de que las moléculas liberadas al medio tengan un repertorio y/o especificidad diferente de acuerdo al sustrato utilizado.

Debido a lo anterior, este trabajo se enfocó en detectar la actividad proteolítica de los TES sobre varios sustratos de naturaleza proteica (gelatina, albúmina, IgG de

cabra, laminina y fibronectina), además de detectar la actividad proteolítica contenida en el fluido perivitelino de huevos larvados, así como en extractos de larvas L<sub>2</sub> de *Toxocara canis*, con la finalidad de contribuir a explicar como migran dichas larvas en los tejidos de sus hospedadores.

### 3. HIPÓTESIS

Si no se ha demostrado la presencia de estructuras morfológicas en las larvas L<sub>2</sub> de *Toxocara canis* que puedan ser utilizadas para penetrar el tejido del hospedero, entonces deberán existir enzimas con actividad proteolítica que contribuyan a degradar el tejido y así facilitar la invasión.

### 4. OBJETIVOS

#### General

- Identificar las moléculas con actividad proteolítica que se localizan en el fluido perivitelino (PFP), en los productos de excreción-secreción (TES) y en el extracto de larvas (EL) de la L<sub>2</sub> de *Toxocara canis* y caracterizar parcialmente estas moléculas.

#### Particulares

- Mantener larvas L<sub>2</sub> de *Toxocara canis* en un medio de cultivo suplementado con glucosa.
- Detectar actividad proteolítica en el fluido perivitelino (PFP), extracto de larvas (EL) y de los productos liberados por la larva en el medio de cultivo (TES) mediante el uso de geles copolimerizados con gelatina a diferentes pH.
- Caracterización parcial de PFP, EL y TES empleando inhibidores específicos de tipo bajo diferentes pH.
- Determinar la actividad proteolítica de TES en geles SDS-PAGE copolimerizados con otros sustratos: laminina, fibronectina, albúmina e IgG de cabra a diferentes pH.



## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### a) Obtención y cultivo de huevos de *T. canis*

La obtención y cultivo de huevos de *T. canis* se realizó modificando el método descrito por Oshima en 1961 y De Savigny en 1975. Se colectaron gusanos adultos de *T. canis* a partir de necropsias realizadas a cachorros provenientes del centro antirrábico de Cuautilán y Tuftep, Estado de México. Una vez recolectados todos los gusanos de *T. canis*, las hembras se separaron y se les extrajo el útero por una incisión en la parte media del cuerpo liberando así los huevos. Estos huevos fueron colocados en solución salina fisiológica, se colaron para la eliminación de restos de úteros y membranas del parásito. Los huevos se concentraron por centrifugación (1500g por 15 minutos), desechando el sobrenadante con una pipeta Pasteur. El sedimento se resuspendió en una solución de formol al 2% (vol/vol) en agua, pasando esta solución a cajas Petri estériles y dejando el cultivo a 25 °C, de 20 a 30 días para lograr el desarrollo de la larva L<sub>2</sub>. Al término del proceso se verificó la viabilidad de los huevos mediante la observación al microscopio compuesto del movimiento larvario.

### b) Obtención y cultivo de larvas

La obtención de larvas se realizó siguiendo el método desarrollado por De Savigny en 1975 y modificado por Bowman y col en 1987. Una vez verificada la viabilidad de los huevos, se procedió a hacerles tres lavados por centrifugación y resuspensión en SSF al 0.15% p/vol esterilizada en autoclave. Posteriormente, bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar, se colocaron los huevos en una solución de hipoclorito de sodio al 50% (v/v) por 10 minutos a 37° C, se lavaron 5 veces con RPMI 1640 con 1% (p/vol) de glucosa. Los huevos lavados se sometieron a agitación en un agitador magnético por 5 minutos para producir la eclosión de las larvas. De la suspensión restante se separaron las larvas viables por el método de migración larvaria de Baerman. Para ello se utilizaron microaparatos de Baerman estériles elaborados de tubos de policarbonato de 50 ml. a los cuales en su interior se le colocó un dispositivo a manera de filtro preparado con 5 capas de papel de limpiar

lentes, colocándoles las larvas en la parte superior del filtro. Dentro del tubo se agregó medio de cultivo estéril hasta tocar el filtro por la parte inferior. Después de 24 horas de incubación a 37 °C en un incubador de CO<sub>2</sub> se colectaron del fondo del tubo de policarbonato las larvas viables, realizando una segunda colecta a las 48 horas. Las larvas recolectadas y resuspendidas en medio de cultivo RPMI 1640 fueron puestas en cajas de cultivo a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.

#### **c) Obtención del PFP (Productos del Fluido Perivitelino)**

Los PFP se obtuvieron a partir del medio en donde eclosionaron las larvas de *T. canis*. Una vez recolectadas las larvas y pasadas a medios de cultivo, el sobrenadante se filtró con unidades de filtración Millex® y se concentró con dispositivos AMICON® en condiciones de esterilidad, almacenándose a -20 °C hasta su uso. La concentración final de proteínas fue determinada por la técnica de microBradford (Bradford, 1976).

#### **d) Obtención de TES (Antígenos de Excreción-Secreción de *Toxocara canis*)**

El sobrenadante de las cajas de cultivo se recolectó por aspiración en condiciones de esterilidad, sedimentando a las larvas en un extremo de la caja por gravedad. Posteriormente se restituyó medio RPMI 1640 fresco a las cajas de cultivo. El medio de cultivo se reemplazó semanalmente (Maizels *et al.*, 1984). El sobrenadante se filtró con unidades de filtración Millex® y el sobrenadante se concentró con filtros AMICON® en condiciones de esterilidad, almacenándose a -20 °C hasta su uso. La concentración final de proteínas fue determinada por la técnica de microBradford (Bradford, 1976).

#### **e) Obtención de EL (Extracto de larvas)**

Los EL se obtuvieron a partir de larvas recién eclosionadas por el método se mencionado anteriormente. Se utilizaron 100,000 larvas de *Toxocara canis* previamente lavadas con PBS pH 7.4 a 500 g por 5 minutos. Estas fueron puestas en una solución de 0.25 M de sacarosa y Tritón X-100 al 0.25%. Las larvas fueron maceradas en frío con

un homogenizador de pistilo tipo Potter, durante 5 minutos a velocidad constante. El sobrenadante se filtró en unidades de filtración Millex<sup>®</sup>, concentrándose con filtros AMICON<sup>®</sup> en condiciones de esterilidad y almacenándose a -20 °C hasta su uso. La concentración final de proteínas fue determinada por la técnica de microBradford (Bradford, 1976).

#### **f) Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)**

Para la caracterización del perfil de proteínas de TES, EL, PFP de *Toxocara canis* se utilizaron geles de poliacrilamida al 10% con dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS) bajo condiciones reductoras. La separación de los componentes proteicos se llevó a cabo por el método descrito por Laemmli (1970). El equipo utilizado fue una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN III electrophoresis cell (Bio Rad, U.S.A.).

Los TES, EL y PFP fueron separados en geles de poliacrilamida de acuerdo al siguiente protocolo:

Para la preparación del gel separador al 10% para un gel de 1.5 mm de grosor se utilizó 30% de acrilamida, 0.8% de bisacrilamida, 3M de Tris-HCL, 0.8% de SDS y se ajustó el pH a 8.9. Cuando se trató de geles para proteasas se adicionó la gelatina a una concentración de 0.1% (p/v). Al final el TEMED se adicionó a una concentración de 0.05% y el persulfato de amonio (APS) a una concentración de 1.0%. La preparación del gel concentrador al 4% para un gel de 1.5 mm consistió en agregar acrilamida al 30%, bisacrilamida al 0.8%, 1M de Tris-HCL, 0.8% de SDS y se ajustó el pH a 6.8. Al final el TEMED se adicionó a una concentración de 0.05% y el persulfato de amonio (APS) a una concentración de 1.0%.

Los geles se prepararon en placas de vidrio con separadores de 1.5 mm de grosor. La solución amortiguadora de corrimiento utilizada consistió en: trizma base 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0.1% (p/v), a un pH de 8.3.

Para el corrimiento electrofórico, las muestras, estas se diluyeron 2:1 en una solución amortiguadora a pH 6.8 (trizma base 62.5 mM, SDS 2%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0.002%) y se ajustaron a 10 µg de proteína por carril, se les agregó por separado 5 µl de β-mercaptoetanol y se calentaron en baño María en ebullición durante 5 minutos. En cada corrimiento se incluyeron marcadores de peso molecular (MPM) preteñidos (Bio-Rad®). El corrimiento de las muestras fue a 90 V hasta que el frente del colorante migró al borde inferior del gel. Los PM de los TES, PFP y EL obtenidos fueron determinados por medio de una curva patrón, elaborada graficando el logaritmo del PM de los marcadores preteñidos contra su migración a través del gel expresada en centímetros (Bjerrum, 1988) en una Graficadora HP® 48-GX. Los MPM fueron: miosina 203 kDa; beta-galactosidasa 118 kDa; albúmina sérica bovina 86 kDa; ovoalbúmina 51 kDa; anhidrasa carbónica 34 kDa; inhibidor de la tripsina 29 kDa; lisozima 19 kDa y aprotinina 7.5 kDa.

**g) Caracterización de la actividad proteolítica en los PFP, PTES y EL de *Toxocara canis* empleando geles de poliacrilamida-SDS copolimerizados con gelatina**

La actividad proteolítica de PFP, PTES y EL se caracterizó empleando geles de poliacrilamida al 10% copolimerizados con gelatina al 0.1% (McKerrow *et al.*, 1985) en condiciones no reductoras (tratamiento similar al anterior, pero no se agregó β-mercaptoetanol y no se calentó la muestra). La electroforesis se realizó en cámaras de electroforesis Mini-Protean III (Bio Rad U.S.A) por 90 minutos a 140 Volts a 4°C. En este análisis se emplearon peines de 10 pozos de 1.5 mm de grosor, aplicándose en cada pozo 10 µg de proteína total en todos los casos. En cada corrimiento se incluyeron marcadores de peso molecular (MPM) preteñidos (Biorad®). Una vez transcurrido el tiempo de corrimiento, los geles se incubaron en 100 ml de Tritón X-100 al 2.5% (v/v) durante 1 hora, para remover el exceso de SDS. Posteriormente los geles de enjuagaron 3 veces con agua bidestilada para retirar el exceso de Tritón (Beynon & Bond, 2001).

Para detectar las actividades proteolíticas presentes en PFP, PTES y EL, los geles se incubaron en amortiguador de acetatos pH 5.5, fosfatos pH 7.6 ó amortiguador de glicina pH 9.0 durante 18-20 horas a 37°C y en agitación constante. Al término de este

periodo, se retiró el amortiguador y se le adicionó azul de Coomasie R-250 durante una hora en agitación constante y a 37°C, para posteriormente retirar el exceso de colorante y llevar a cabo la decoloración con una solución desteñidota (Ácido acético y metanol).

El peso molecular de PFP, PTES y EL obtenidos fueron determinados por medio de una curva patrón, elaborada graficando el logaritmo del peso molecular de los marcadores preteñidos, contra su migración a través del gel expresado en centímetros (Bjerrum, 1988) en una Graficadora HP® 48-GX.

Para determinar el tipo de proteasa presente, las muestras se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente con diferentes inhibidores de proteasas, incluyendo cisteín (2 µM de E-64), serín (0.1µM de Leupeptina), aspártico (0.1µM de Pepstatina A) y metalo-proteasas (1mM de EDTA). El proceso de los geles fue similar a los utilizados para medir actividad de proteasa. Se compararon las bandas con actividad de proteasas en geles con muestras sin inhibidores y geles con muestras con inhibidores, y dependiendo del inhibidor con el que las bandas no presentaran actividad, era el tipo de proteasa con el que se clasificó a la enzima.

**h) Identificación de la actividad proteolítica en los TES de *Toxocara canis* empleando geles de poliacrilamida-SDS copolimerizados con albúmina, fibronectina, laminina e IgG de cabra.**

La actividad proteolítica y su inhibición en TES también fue ensayado en geles de poliacrilamida al 10% copolimerizados con albúmina al 0.1%, fibronectina a 0.5 mg/gel , laminina a 0.5 mg/gel e IgG de cabra al 0.1%. Las condiciones electroforéticas y del tratamiento de los geles fueron las mismas que las mencionadas para medir la actividad proteolítica en geles con gelatina. Los geles copolimerizados con fibronectina y laminina, por ser glicoproteínas, fueron teñidos con Azul de Coomasie G-250.

## 6. RESULTADOS

Mediante un gel SDS-PAGE se determinó el peso molecular de los productos TES de la larva L<sub>2</sub> de *Toxocara canis* (Figura 8) obteniendo proteínas con los siguientes pesos moleculares: 400, 120, 70, 55, 45, 32, 26 y 24 kDa.

Las proteínas detectadas en geles SDS-PAGE de los productos del fluido perivitelino (PFP) se presentan en la figura 9. En ésta, se detectaron 4 bandas de los siguientes pesos moleculares: 55, 45, 40 y 38 kDa.

Las proteínas detectadas en geles SDS-PAGE de los extractos de las larvas 2 de *T. canis* se presentan en la figura 10. En estos corrimientos se detectaron 8 bandas de los siguientes pesos moleculares: 150, 74, 55, 47, 45, 37, 32 y 28 kDa.

Las bandas con actividad proteolítica de los TES sobre la gelatina se presenta en la figura 11. En esta figura se observa de una sola banda de 120 kDa con actividad proteolítica, no se observó ninguna variación en la actividad a ninguno de los pH utilizados (5.5, 7.6 y 9).

El efecto de diferentes inhibidores de proteasas sobre la actividad de los TES en gelatina se presenta en la figura 12. Se observa una inhibición total de la actividad proteolítica cuando se preincubó con Leupeptina (inhibidor de serín-proteasas), una inhibición parcial cuando se preincubó con Pepstatina A (inhibidor de aspartil-proteasas) y no se observó inhibición cuando se preincubó con E-64 (inhibidor de cisteín-proteasa) o EDTA (inhibidor de metalo-proteasas).

Las bandas con actividad proteolítica de los PFP sobre la gelatina se presenta en la figura 13. En esta figura se observan tres bandas de 91, 68 y 38 kDa con actividad proteolítica. La mayor actividad se presentó a pH 5.5, a pH 7.5 la actividad fue media y a pH de 9 la actividad fue baja. Así, el pH óptimo de actividad fue de 5.5.

El efecto de diferentes inhibidores de proteasas sobre los PFP se presenta en la figura 14. En ésta, podemos observar una inhibición total de la actividad proteolítica cuando se incubó con Pepstatina A. No se observó inhibición cuando se incubó con E-64, EDTA o Leupeptina.

Las bandas con actividad proteolítica de los extractos de larvas 2 de *T. canis* sobre la gelatina se presenta en la figura 15. En esta figura se observan dos bandas 61 y 69 kDa con actividad proteolítica. La actividad proteolítica de las bandas fue más intensa a pH 7.5.

El efecto de diferentes inhibidores de proteasas sobre los extracto de larvas 2 de *T. canis* se presenta en la figura 16. En ésta, se observa una inhibición total de la actividad proteolítica cuando se incubó con Leupeptina y no se observó inhibición cuando se incubó con Pepstatina A, E-64 o EDTA.

Las bandas con actividad proteolítica de los TES sobre la laminina se presenta en la figura 17. El número de bandas con actividad proteolíticas varió dependiendo del pH. Sólo se detectó una banda de 81 kDa cuando los geles se incubaron a pH 5.5 y 7.5, cuando los geles se incubaron a pH 9.0 se detectaron 4 bandas de 81, 46, 34, y 32 kDa respectivamente.

El efecto de diferentes inhibidores de proteasas sobre la actividad de los TES en laminina se presenta en la figura 18. En esta, podemos observar una inhibición total de la actividad proteolítica cuando se incubó con Leupeptina, no se observó inhibición cuando se incubó con E-64, EDTA o con Pepstatina A.

Las bandas con actividad proteolítica de los TES sobre la fibronectina se presenta en la figura 19. El número de bandas con actividad proteolíticas varió dependiendo del pH. Solo se detecto una banda de 81 kDa cuando los geles se incubaron a pH 5.5 y 7.5, cuando los geles se incubaron a pH 9.0 se detectaron 3 bandas de 81, 46, y 32 kDa respectivamente.

El efecto de diferentes inhibidores de proteasas sobre la actividad de los TES en fibronectina se presenta en la figura 20. En esta, podemos observar una inhibición total de la actividad proteolítica cuando se incubó con Leupeptina, no se observó inhibición cuando se incubó con E-64, EDTA o con Pepstatina A.

Las bandas con actividad proteolítica de los TES sobre la albúmina se presentan en la figura 21. En esta figura se observa de una sola banda de 120 kDa con actividad proteolítica, no se observó ninguna variación en la actividad a ninguno de los pH utilizados (5.5, 7.6 y 9).

El efecto de diferentes inhibidores de proteasas sobre la actividad de los TES en albúmina se presenta en la figura 22. En esta, podemos observar una inhibición total de la actividad proteolítica cuando se incubó con Leupeptina, no se observó inhibición cuando se incubó con E-64, EDTA o con Pepstatina A.

Las bandas con actividad proteolítica de los TES sobre la IgG de cabra se presentan en la figura 23. En esta figura se observa de una sola banda de 120 kDa con actividad proteolítica, con mayor actividad a pH de 7.6.

El efecto de diferentes inhibidores de proteasas sobre la actividad de los TES en IgG de cabra se presenta en la figura 24. En esta, podemos observar una inhibición total de la actividad proteolítica cuando se incubó con Leupeptina, no se observó inhibición cuando se incubó con E-64, EDTA o con Pepstatina A.

Finalmente se elaboraron tablas comparativas de los productos de las larvas de *T. canis* (Cuadro 4) influenciados tanto por los sustratos copolimerizados en los geles SDS-PAGE como por los pHs a los cuales fueron incubados (Cuadro 5 y 6)



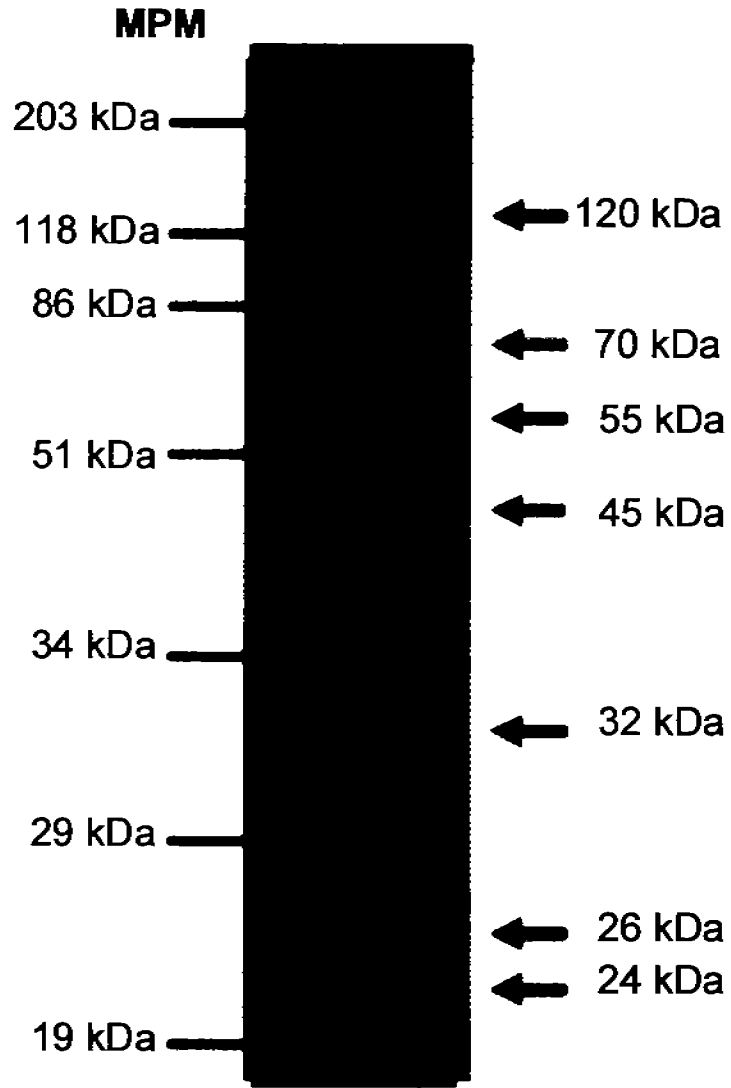


Fig. 8. Corrimiento electroforético del sobrenadante de cultivo (TES) de larvas L<sub>2</sub> de *T. canis*. En este análisis se utilizaron 10 µg de proteína total y se separaron en geles SDS-PAGE al 10% bajo condiciones reductoras. La altura donde corrieron los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda de la figura.

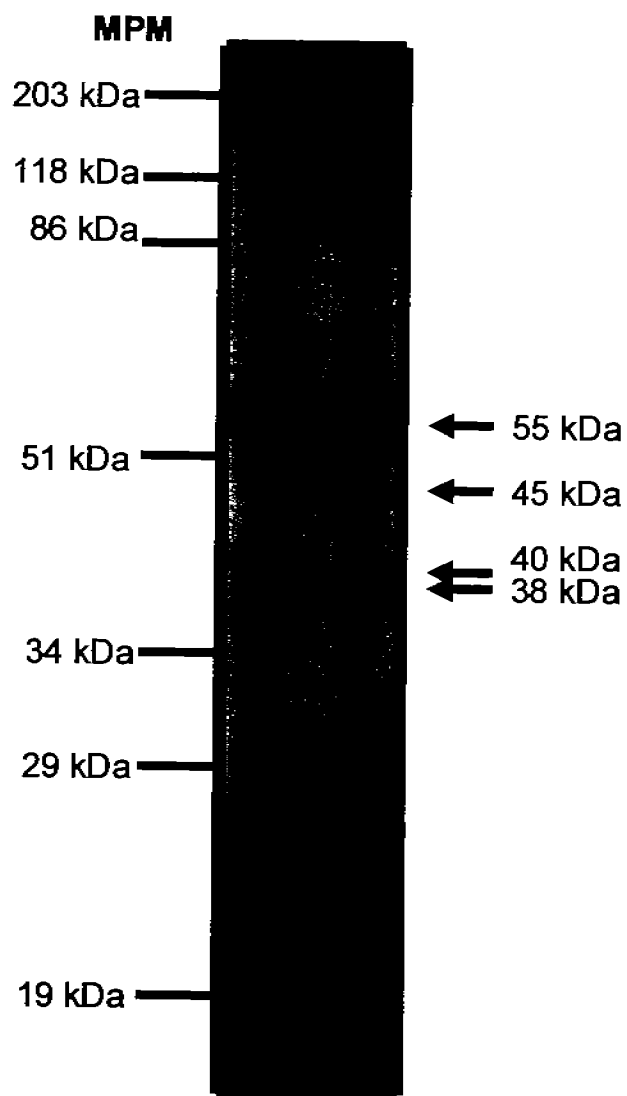


Fig. 9. Corrimiento electroforético de los productos del fluido perivitelino (PFP) de los huevos larvados de *T. canis*. En este análisis se utilizaron 10  $\mu$ g de proteína total y se separaron en geles SDS-PAGE al 10% bajo condiciones reductoras. La altura a la que corrieron los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda de la figura.

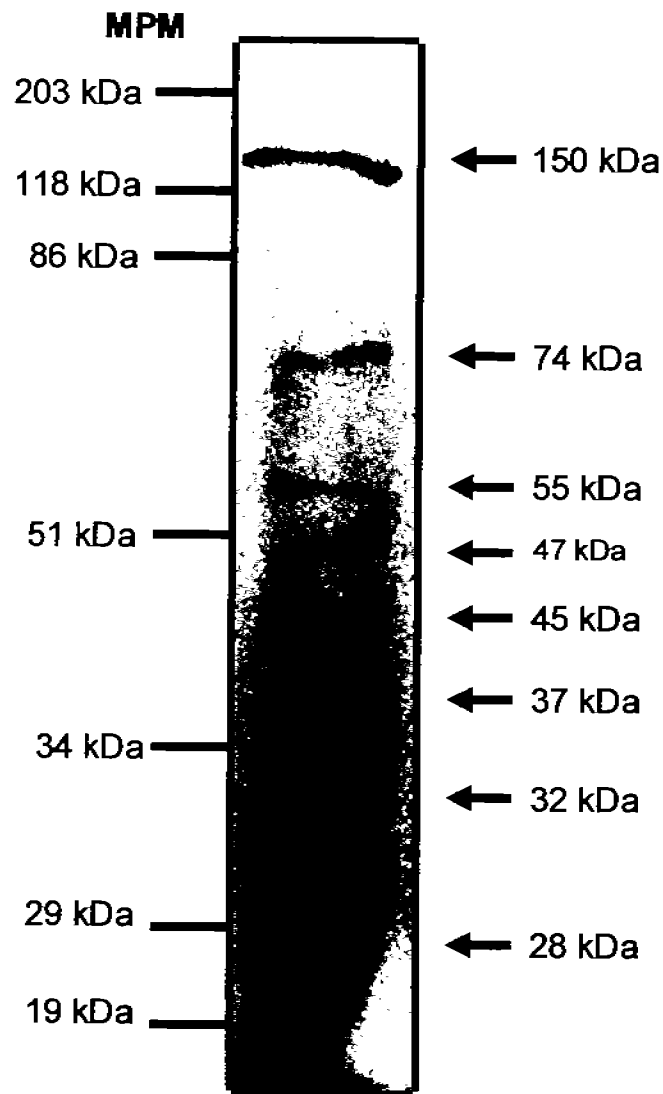


Fig. 10. Corrimiento electroforético del extracto de larvas (EL) L<sub>2</sub> de *T. canis*. En este análisis se utilizaron 10 µg de proteína total y se separaron en geles SDS-PAGE al 10% bajo condiciones reductoras. La altura a la que corrieron los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda de la figura.

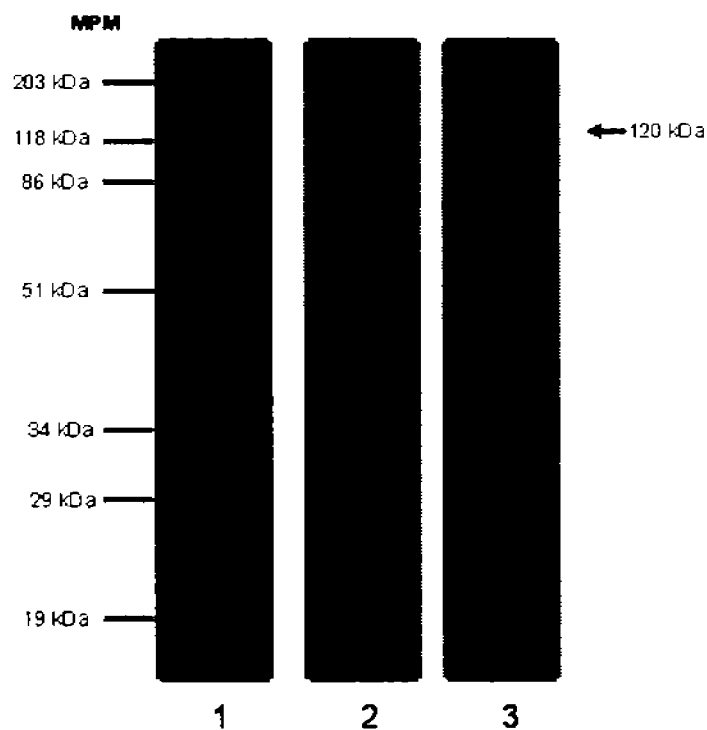


Fig. 11. Detección de la actividad proteolítica de los TES en geles de SDS-PAGE al 10% copolimerizado con gelatina al 0.1%. Se utilizaron 10  $\mu$ g de proteína por carril y se incubaron a diferentes pH. En el carril 1 se utilizó un amortiguador de acetatos con un pH 5.5, en el carril 2 un amortiguador de fosfatos con pH 7.6 y en el carril 3 un amortiguador de glicina a pH 9.0. La altura a la que corrieron los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda de la figura.

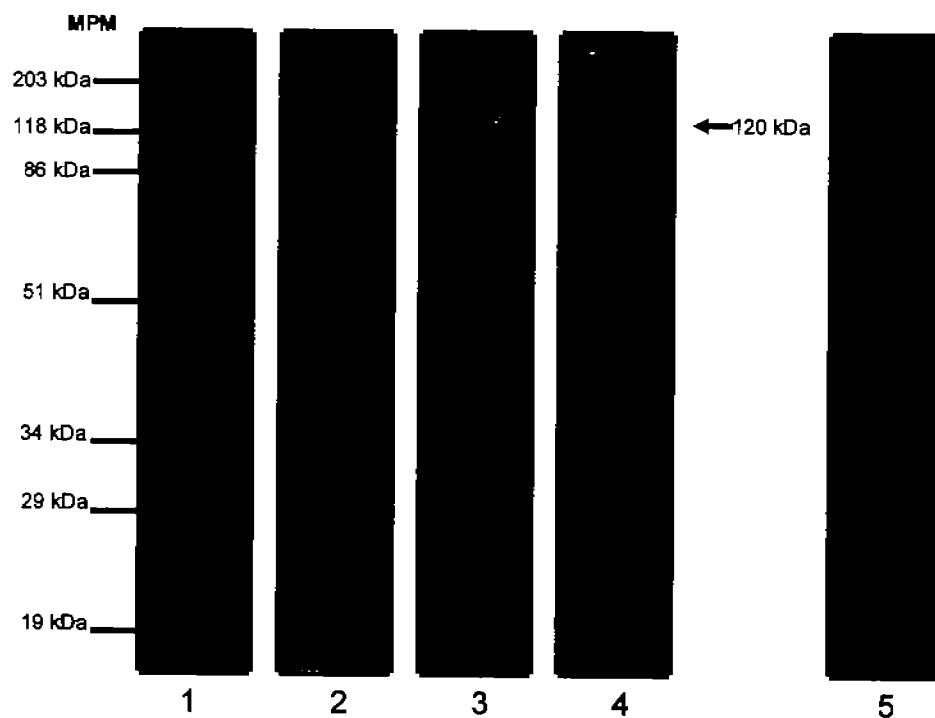


Fig. 12. Inhibición de la actividad proteolítica de los TES producida por su incubación durante 30 minutos a 37°C con diferentes inhibidores de proteasas. La actividad proteolítica se detectó en geles SDS-PAGE al 10% copolimerizados con gelatina al 0.1% en un amortiguador de fosfatos pH 7.6. El carril 1 es un corrimiento de TES sin inhibidores (testigo). En el carril 2 los TES fueron incubados con E-64, en el carril 3 con Pepstatina A, en el carril 4 con EDTA y en el carril 5 con Leupeptina. La altura a la que corrieron los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda de la figura.

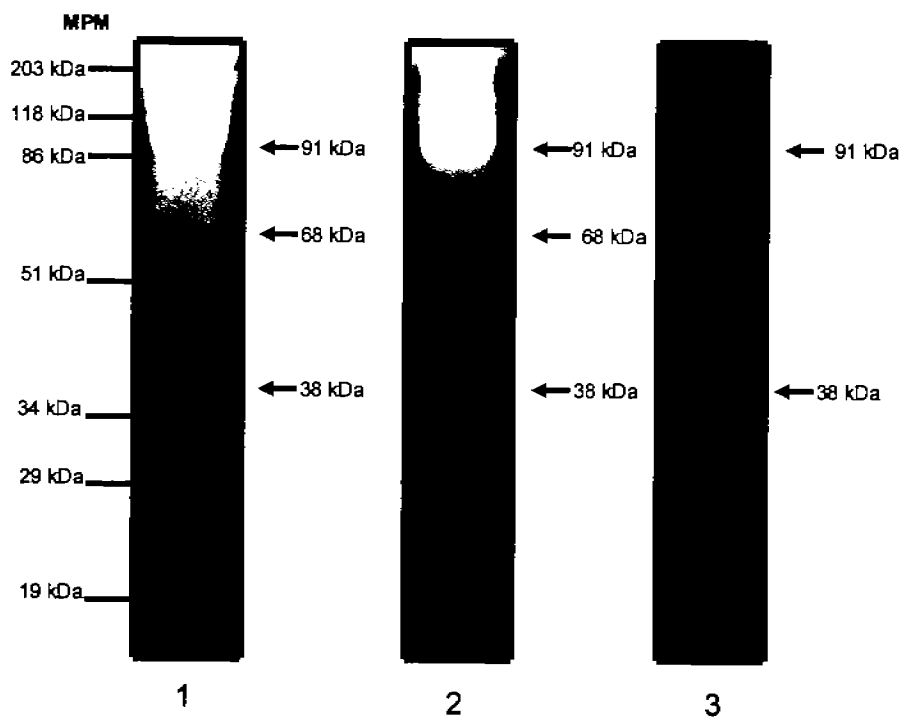


Fig. 13. Detección de la actividad proteolítica de los productos de fluido perivitelino (PFP) en geles de SDS-PAGE al 10% copolimerizado con gelatina al 0.1%. Se utilizaron 10  $\mu$ g de proteína por carril y se revelaron con soluciones amortiguadoras a diferentes pHs. En el carril 1 se utilizó un amortiguadoras de acetatos con un pH 5.5, en el carril 2 un amortiguador de fosfatos con pH 7.6 y en el carril 3 un amortiguador de glicina a pH 9.0. La altura a la que corrieron los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda de la figura.

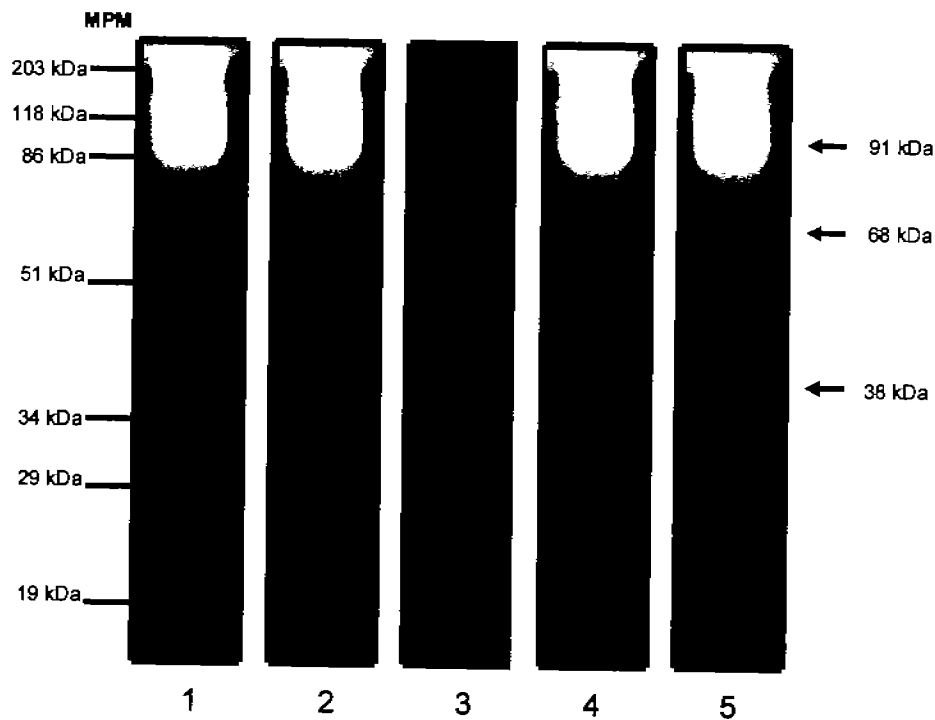


Fig. 14. Inhibición de la actividad proteolítica de los productos de fluido perivitelino (PFP) de huevos larvados de *T. canis* producida por su incubación durante 30 minutos a 37°C con diferentes inhibidores de proteasas. La actividad proteolítica se detectó en geles SDS-PAGE al 10% copolimerizados con gelatina al 0.1% en un buffer de fosfatos pH 7.6. El carril 1 es un corrimiento de TES sin inhibidores (testigo). En el carril 2 los PFP fueron preincubados con E-64, en el carril 3 con Pepstatina A, en el carril 4 con EDTA y en el carril 5 con Leupeptina. La altura a la que corrieron los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda de la figura.

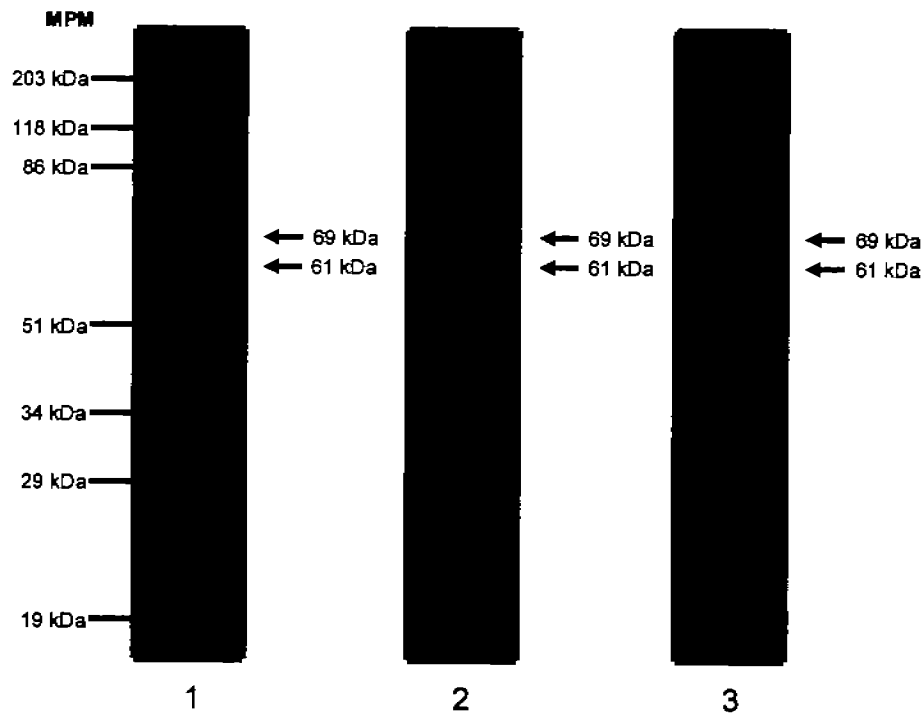


Fig. 15. Detección de la actividad proteolítica de un extracto de larvas 2 de *T. canis* en geles de SDS-PAGE al 10% copolimerizado con gelatina al 0.1%. Se utilizaron 10  $\mu\text{g}$  de proteína por carril y se revelaron con a diferentes pH. En el carril 1 se utilizó un amortiguador de acetatos con un pH 5.5, en el carril 2 un amortiguador de fosfatos con pH 7.6 y en el carril 3 un amortiguador de glicina a pH 9.0. La altura a la que corrieron los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda de la figura.



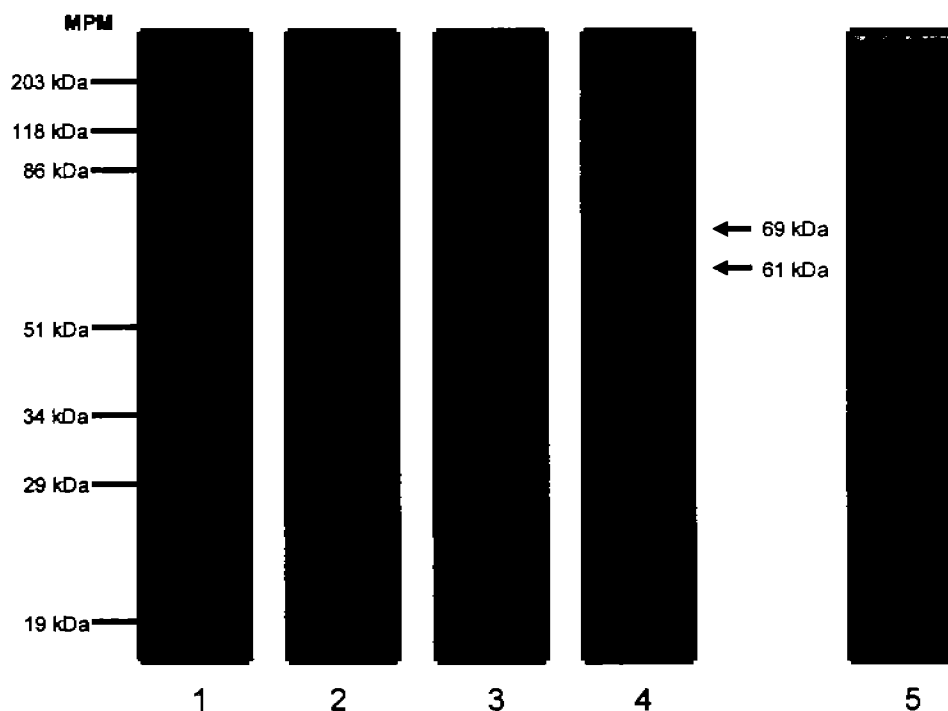


Fig. 16. Inhibición de la actividad proteolítica del extracto de larvas 2 de *T. canis* producida por su incubación durante 30 minutos a 37°C con diferentes inhibidores de proteasas. La actividad proteolítica se detectó en geles SDS-PAGE al 10% copolimerizados con gelatina al 0.1% en un amortiguador de fosfatos pH 7.5. El carril 1 es un corrimiento de extracto de larvas 2 de *T. canis* sin inhibidores (testigo). En el carril 2 los extractos de larvas de *T. canis* fueron incubados con E-64, en el carril 3 con Pepstatina A, en el carril 4 con EDTA y en el carril 5 con Leupeptina. . La altura a la que corrieron los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda de la figura.

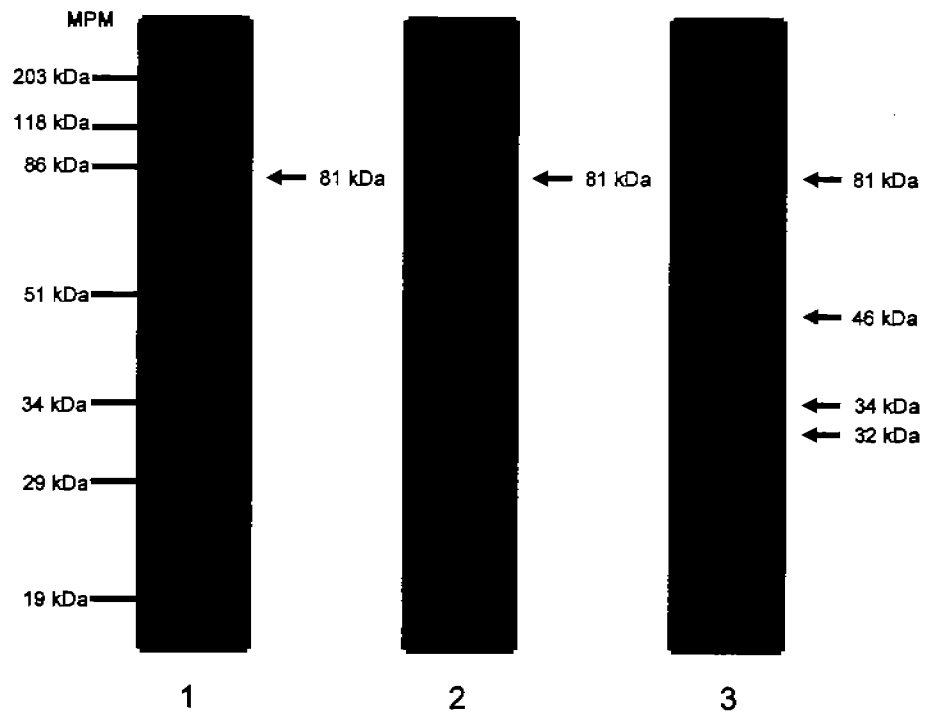


Fig. 17. Detección de la actividad proteolítica de TES en geles de SDS-PAGE al 10% copolimerizado con laminina (0.5 mg/gel). Se utilizaron 10  $\mu$ g de proteína por carril y se incubaron a diferentes pH. En el carril 1 se utilizó un amortiguador de acetatos con un pH de 5.5, en el carril 2 un amortiguador de fosfatos con pH 7.6 y en el carril 3 un amortiguador de glicina a pH 9.0. La altura a la que corrieron los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda de la figura.

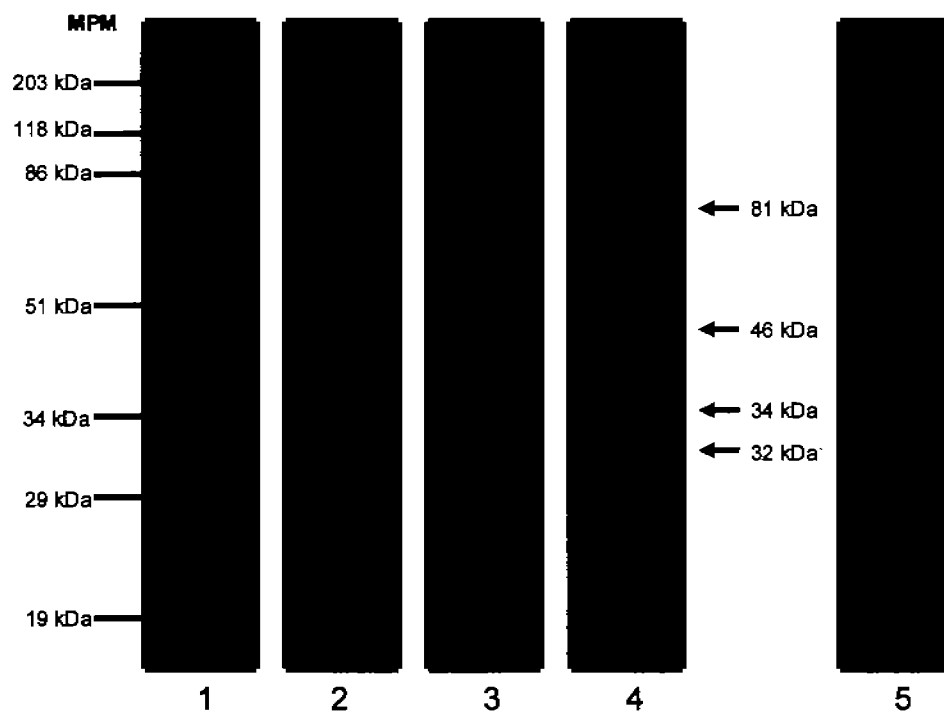


Fig. 18. Inhibición de la actividad proteolítica de TES producida por su incubación durante 30 minutos a 37°C con diferentes inhibidores de proteasas. La actividad proteolítica se detectó en geles SDS-PAGE al 10% copolimerizados con laminina (0.5 mg/gel) en un amortiguador de glicina a pH 9.0. El carril 1 es un corrimiento de TES sin inhibidores (testigo). En el carril 2 los TES fueron incubados con E-64, en el carril 3 con Pepstatina A, en el carril 4 con EDTA y en el carril 5 con Leupeptina. La altura a la que corrieron los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda de la figura.

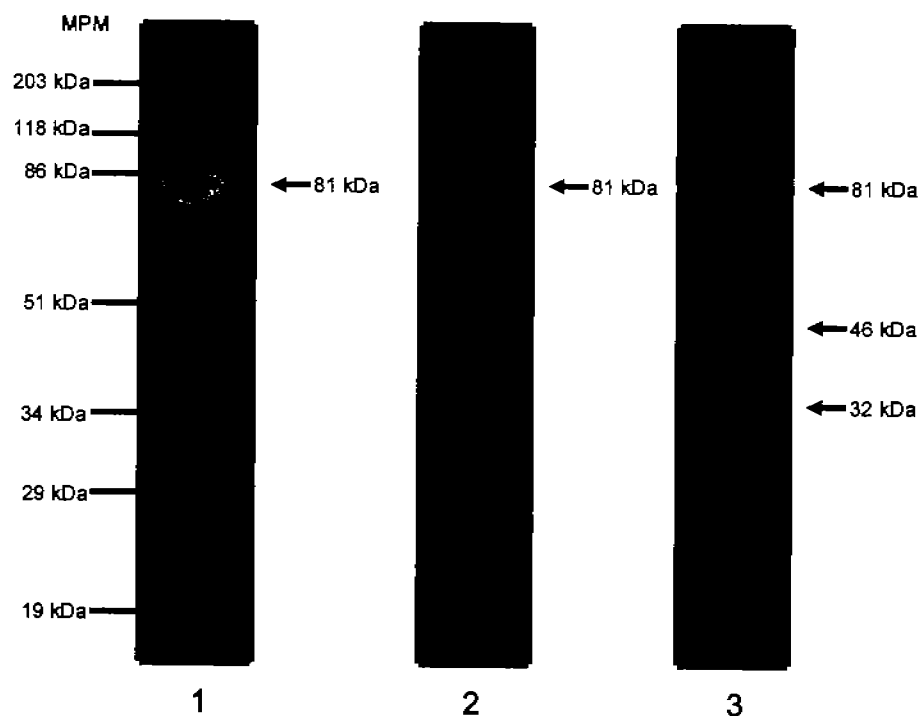


Fig. 19. Detección de la actividad proteolítica de TES en geles de SDS-PAGE al 10% copolimerizado con fibronectina (0.5 mg/gel). Se utilizaron 10  $\mu$ g de proteína por carril y se incubaron a diferentes pH. En el carril 1 se utilizó un amortiguador de acetatos con un pH de 5.5, en el carril 2 un amortiguador de fosfatos con pH 7.6 y en el carril 3 un amortiguador de glicina a pH 9.0. La altura a la que corrieron los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda de la figura.

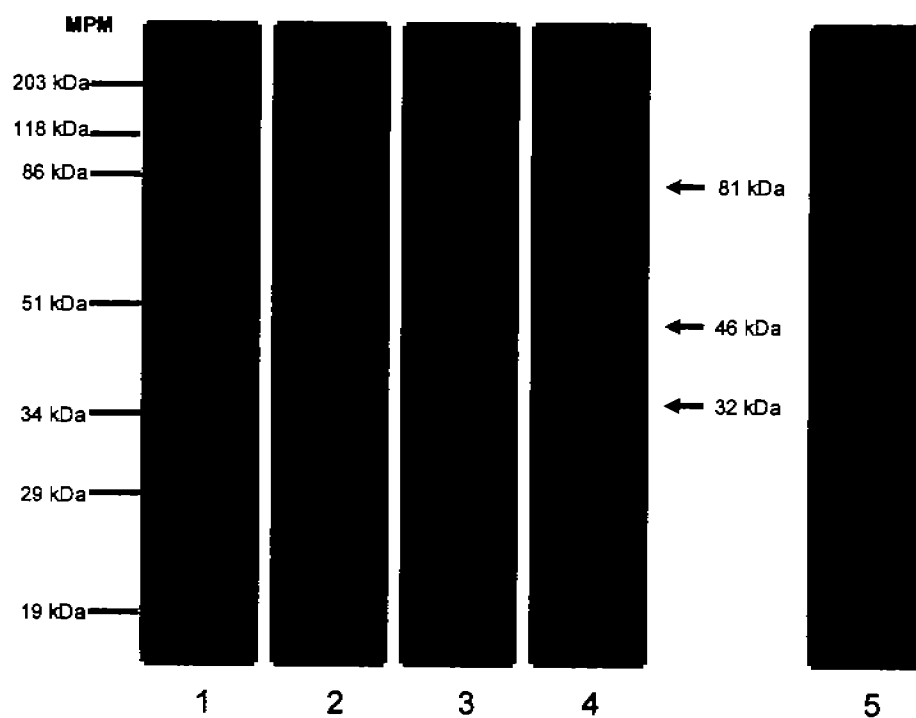


Fig. 20. Inhibición de la actividad proteolítica de TES producida por su incubación durante 30 minutos a 37°C con diferentes inhibidores de proteasas. La actividad proteolítica se detectó en geles SDS-PAGE al 10% copolimerizados con fibronectina (0.5 mg/gel) en un amortiguador de glicina a pH 9.0. El carril 1 es un corrimiento de TES sin inhibidores (testigo). En el carril 2 los TES fueron incubados con E-64, en el carril 3 con Pepstatina A, en el carril 4 con EDTA y en el carril 5 con Leupeptina. La altura a la que corrieron los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda de la figura.

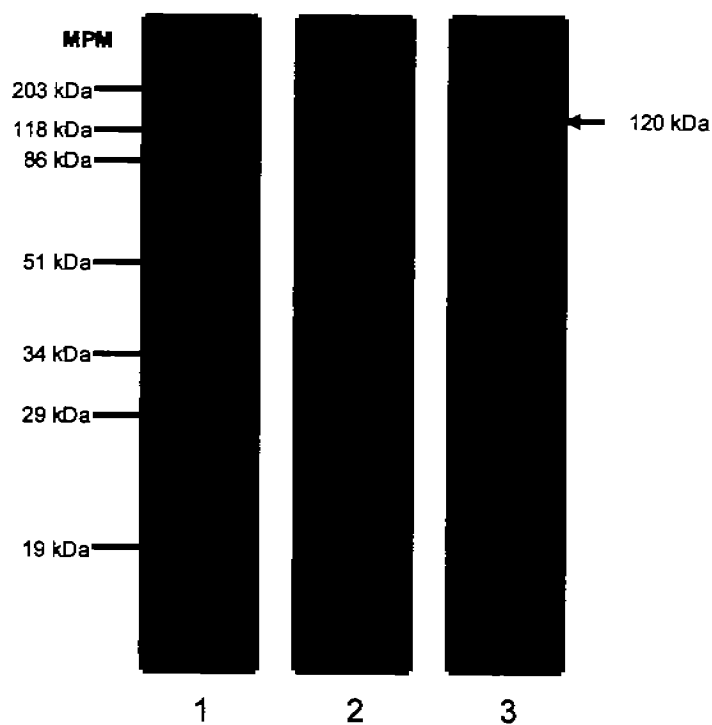


Fig. 21. Detección de la actividad proteolítica de los TES en geles de SDS-PAGE al 10% copolimerizado con albúmina al 0.1%. Se utilizaron 10  $\mu$ g de proteína por carril y se incubaron a diferentes pHs. En el carril 1 se utilizó un amortiguador de acetatos con un pH 5.5, en el carril 2 un amortiguador de fosfatos con pH 7.6 y en el carril 3 un amortiguador de glicina a pH 9.0. La altura a la que corrieron los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda de la figura.

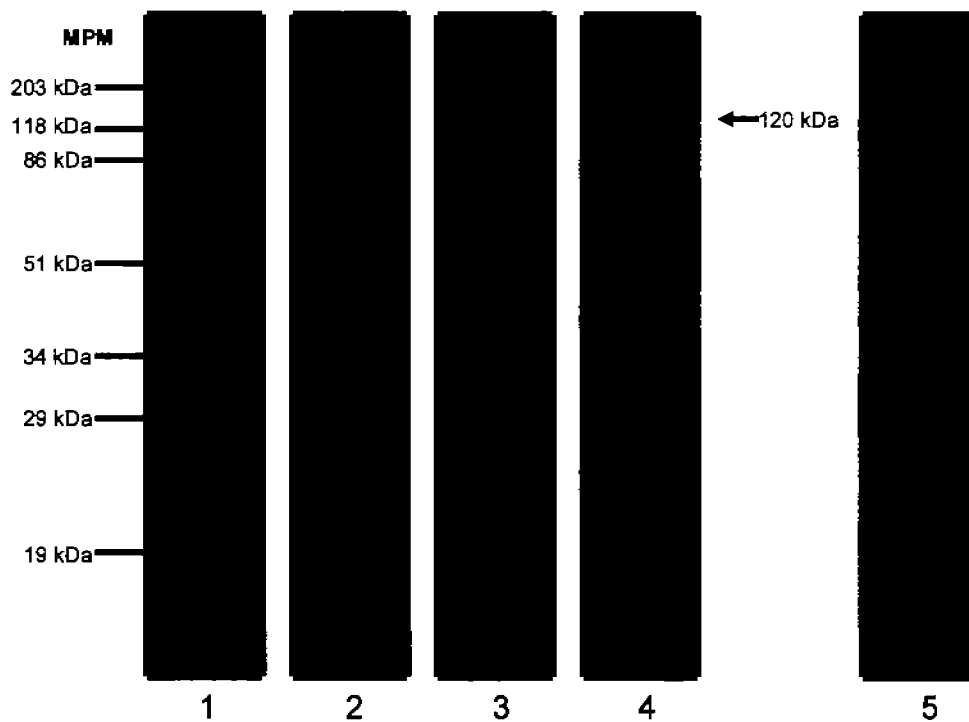


Fig. 22. Inhibición de la actividad proteolítica de TES producida por su incubación durante 30 minutos a 37°C con diferentes inhibidores de proteasas. La actividad proteolítica se detectó en geles SDS-PAGE al 10% copolimerizados con albúmina (0.1%) en un amortiguador de glicina a pH 9.0. El carril 1 es un corrimiento de TES sin inhibidores (testigo). En el carril 2 los TES fueron incubados con E-64, en el carril 3 con Pepstatina A, en el carril 4 con EDTA y en el carril 5 con Leupeptina. La altura a la que corrieron los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda de la figura.

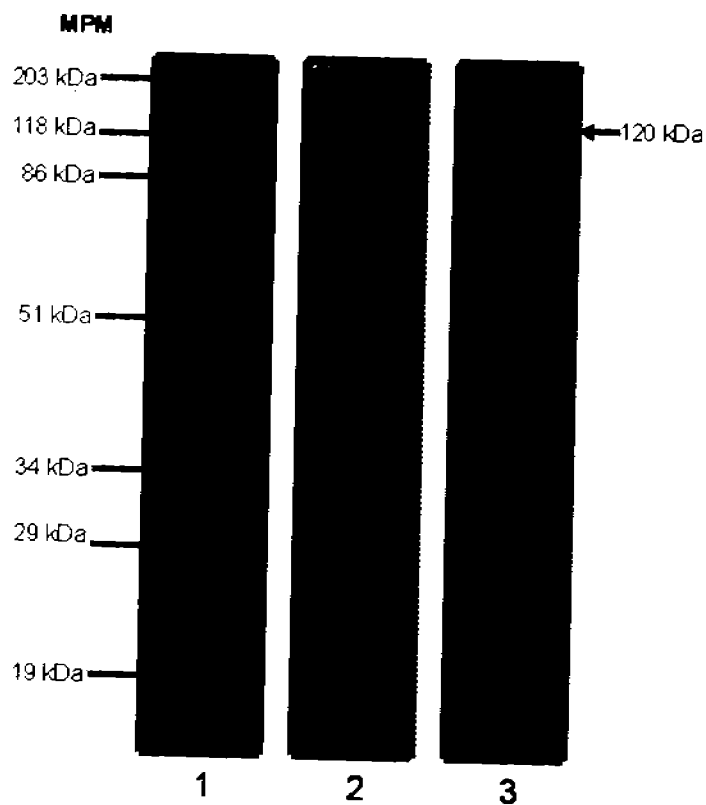


Fig. 23. Detección de la actividad proteolítica de los TES en geles de SDS-PAGE al 10% copolimerizado con IgG de cabra al 0.1%. Se utilizaron 10  $\mu$ g de proteína por carril y se incubaron a diferentes pHs. En el carril 1 se utilizó un amortiguador de acetatos con un pH de 5.5, en el carril 2 un amortiguador de fosfatos con pH 7.6 y en el carril 3 un amortiguador de glicina a pH 9.0. La altura a la que corrieron los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda de la figura.



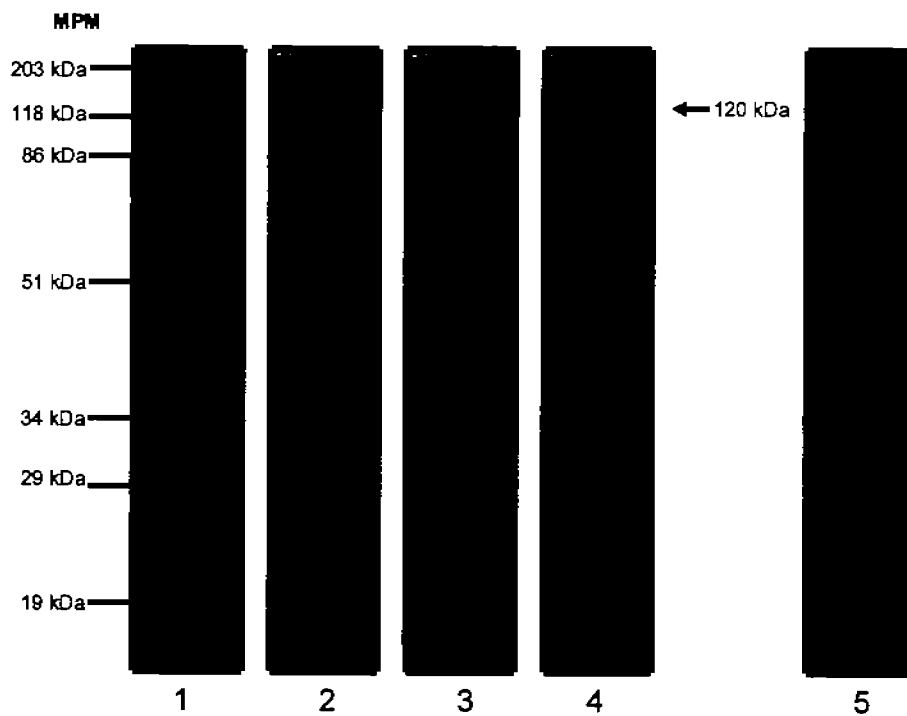


Fig. 24. Inhibición de la actividad proteolítica de TES producida por su incubación durante 30 minutos a 37°C con diferentes inhibidores de proteasas. La actividad proteolítica se detectó en geles SDS-PAGE al 10% copolimerizados con IgG de cabra (0.1 %) en un amortiguador de glicina a pH 7.6. El carril 1 es un corrimiento de TES sin inhibidores (testigo). En el carril 2 los TES fueron preincubados con E-64, en el carril 3 con Pepstatina A, en el carril 4 con EDTA y en el carril 5 con Leupeptina. . La altura a la que corrieron los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda de la figura.

### CUADRO 4

Muestra	PESO MOLECULAR DE LAS BANDAS (kDa)														
	400	150	120	74	70	55	47	45	40	38	37	32	28	26	24
TES	✓		✓		✓	✓		✓				✓		✓	✓
PFP						✓		✓	✓	✓					
EL		✓		✓		✓	✓	✓			✓	✓	✓		

Tabla. 4 Comparación de las proteínas detectadas en SDS-PAGE al 10% en condiciones reductoras en diferentes productos de larvas de *Toxocara canis* (TES, PFP y EL).

### CUADRO 5

Substrato	pH		
	5.5	7.5	9.0
Gelatina	120 kDa	120 kDa	120 kDa
Laminina	81 kDa	81 kDa	81, 46, 34 y 32 kDa
Fibronectina	81 kDa	81 kDa	81, 46 y 32 kDa
Albúmina	120 kDa	120 kDa	120 kDa
IgG de cabra	120 kDa	120 kDa	120 kDa

Tabla. 5 Efecto del pH sobre las bandas con actividad proteolítica de TES en diferentes proteínas copolimerizadas a geles SDS-PAGE.

### CUADRO 6

Muestra	pH		
	5.5	7.5	9.0
TES	120 kDa	120 kDa	120 kDa
PFP	91, 66 38 kDa	91, 66 y 38 kDa	91 y 38 kDa
EL	69 y 61 kDa	69 y 61 kDa	69 y 61 kDa

Tabla. 6.- Efecto del pH sobre las bandas con actividad proteolítica de diferentes productos de larvas de *Toxocara canis* en gelatina copolimerizada a geles SDS-PAGE.

## 7. DISCUSIÓN

Las enzimas proteolíticas están recibiendo cada vez más atención como moléculas importantes en muchos procesos biológicos. Se menciona que estas enzimas están involucradas en procesos tales como penetración de los tejidos del hospedero, nutrición, actividad anticoagulante y evasión de la respuesta inmune (McKerrow, 1989). Otras funciones de las proteasas, las cuales no están directamente asociadas con la relación hospedero-parásito pero sí son importantes en términos de la supervivencia del parásito, son la eclosión, mudas de los componentes de la cutícula y el desarrollo parasitario (Rogers & Brooks, 1978).

Las larvas de *Toxocara canis* migran por diversos órganos del hospedero, sin embargo no poseen estructuras (ganchos, garras, dientes) que le permitan migrar a través de los mismos, por lo que se piensa que las enzimas proteolíticas secretadas por las larvas estén involucradas en este proceso de migración. No se conoce mucho sobre la actividad de estas enzimas en los procesos de migración larvaria de *Toxocara canis*, siendo Robertson *et al.* (1989), el único grupo en describir previamente la participación de una enzima de 120 kDa como la responsable de degradar varias proteínas de matriz extracelular. Si bien esta enzima probablemente juegue un papel importante en la migración, es difícil creer que es la única involucrada en una migración tan compleja como la de este parásito, por lo que en este trabajo se trató de identificar y caracterizar parcialmente otras enzimas producidas *in vitro*.

La forma usual de determinar la presencia de enzimas proteolíticas es detectar su efecto sobre algún sustrato. Por lo anterior, en el presente estudio se utilizaron diferentes sustratos proteicos copolimerizados a los geles SDS-PAGE con la finalidad de evaluar el efecto de las posibles enzimas sobre proteínas empleadas y con esto tener una idea de su posible efecto en el hospedero.

El análisis de los TES en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y por Western blot ha demostrado que estos antígenos son una mezcla compleja de compuestos proteicos. Existen TES que han sido caracterizados por la mayoría de los autores, sin

embargo, existen otros que sólo han sido detectados por algunos autores. Lo anterior podría deberse a los diferentes medios en los que se cultivaron las larvas y a las técnicas que se utilizaron para la detección de los antígenos. En el presente estudio los TES fueron obtenidos *in vitro* como originalmente fue descrito por De Savigny (1975). Las bandas proteicas detectadas en geles SDS-PAGE en este trabajo tuvieron un peso molecular de 400, 120, 70, 55, 45, 32, 26 y 24 kDa (figura 9). Esto coincide parcialmente con lo encontrado con otros autores que han demostrado que las bandas más abundantes en los sobrenadantes de cultivos de larvas son las de 32, 55, 70, 120 y 400 kDa (Maizels *et al.*, 1984 ; Meghji & Maizels, 1986 ; Badley *et al.*, 1987). Con lo anterior se demuestra que los sobrenadantes en los que se detectó actividad enzimática son similares a los típicamente descritos para este parásito.

Varios autores han sugerido que el uso de la gelatina como sustrato en los geles SDS-PAGE *in vitro* podría evaluar el proceso de degradación de la colágena presente en las laminas basales y tejido conjuntivo *in vivo*. Aunque otros autores señalan que esto podría ser un artefacto de laboratorio, puesto que la desnaturalización de la colágena en la gelatina permite a las enzimas secretadas acceder a los enlaces peptídicos susceptibles que normalmente no están disponibles (Brown *et al.*, 1999). Sin embargo, muchos autores no están de acuerdo con esta hipótesis y han utilizado a la gelatina para evaluar proteasas (Healer *et al.*, 1991; MacLennan *et al.*, 1997; Todorova, 2000), por lo que se utilizó en este trabajo.

La detección de la actividad enzimática de los TES sobre la gelatina demostró la presencia de una enzima de aproximadamente 120 kDa de PM (figura 12) que se puede inhibir totalmente con Leupeptina por lo que es una serín-proteasa. Este resultado coincide con lo reportado por Robertson *et al.*, (1989) quien encontró una serín-proteasa del mismo PM que tenía actividad sobre gelatina, por lo que probablemente se trate de la misma enzima.

El corrimiento de los TES en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina mostró un barrido de alto peso molecular (Figura 13) que Robertson *et al.*, (1989) sugieren que son formas agregadas, cuya actividad aumenta con el

almacenamiento, pero no se analizó su naturaleza. Los resultados del presente estudio muestran que estos aglomerados pueden ser inhibidos con Leupeptina y Pepstatina A por lo que probablemente se trate de otra enzima que tiene un doble sitio catalítico y podría ser una enzima de las llamadas proteasas quimeras (Tang *et al.*, 2003) o que sea una serín-proteasa, que cuando se oligomeriza tiene una reactividad cruzada para varios inhibidores (Powers & Harper, 1986).

Además de *T. canis*, otros nematodos producen enzimas que pueden ser detectadas en geles copolimerizados con gelatina, por ejemplo: la larva L<sub>3</sub> de *Nippostrongylus brasiliensis* produce metaloproteasas de 51, 58, 79, 150 y 250 kDa. (Healer *et al.*, 1991), la larva L<sub>4</sub> de *Trichostrongylus vitrinus* produce serín y metaloproteasas de 205, 102, 66, 59, 53 kDa (MacIennan *et al.*, 1997), la larva L<sub>3</sub> de *Ancylostoma caninum* produce metalo-proteasas de 50 y 90 kDa (Hawdon *et al.*, 1995) y la larva L<sub>1</sub> de *Trichinella spiralis* secreta serín-proteasas de 25 (un doblete), 35, 40 y 55 kDa (Todorova, 2000).

La actividad proteolítica de los TES sobre laminina fue dependiente del pH. Los geles copolimerizados con laminina se incubaron a pH 5.5 y 7.5 y sólo se observó una banda de 81 kDa con actividad proteolítica. Cuando los mismos geles se incubaron a pH de 9 se observaron 4 bandas de 81, 46, 34 y 32 kDa que presentaron actividad proteolítica. Los TES mostraron la misma actividad proteolítica frente a la fibronectina, con la diferencia que a pH 9 no se observó actividad de la banda de 34 kDa. Todas las enzimas que se detectaron con efecto sobre laminina y fibronectina fueron inhibidas con Leupeptina, por lo que son consideradas como serín-proteasas (Carrell & Travis, 1985).

La actividad proteolítica de los TES sobre la fibronectina y laminina no han sido reportadas en la literatura. Una proteína de 32 kDa fue reportada por Loukas *et al.* (1999), pero se reportó con actividad de lectina tipo C. Robertson *et al.* (1989) reportaron una banda proteolítica de 32 kDa que solamente se encontró en condiciones especiales de tratamientos de los TES (TES fraccionados con cromatografía líquida de proteínas).

La laminina y fibronectina son dos glicoproteínas que forman parte de la matriz extracelular. La degradación de éstas por las serín-proteasas presentes en los TES, sugieren que estas últimas probablemente participen en el proceso de penetración-migración de *T. canis* en los tejidos del hospedero. El efecto de degradación de la laminina y fibronectina se ha observado en las secreciones producidas por otros nematodos. Por ejemplo, las cercarias de *Schistosoma mansoni* producen una serín-proteasa (McKerrow et al., 1985), así como las larvas de *Necator americanus* (Brown et al., 1999), *Haemonchus contortus* (Karanu et al., 1993) y *Ancylostoma caninum* (Harrap et al., 1996) producen aspartil-proteasas con actividad sobre laminina y fibronectina, que probablemente también les sirven en el proceso de migración somática.

La actividad proteolítica de los TES sobre la albúmina y las IgGs de cabra fue similar a la actividad de los TES sobre la gelatina. En éstos, se encontró una banda de 120 kDa que se podía inhibir con Leupeptina por lo que es una serín-proteasa. Probablemente se trata de la misma enzima que tiene actividad sobre diferentes substratos.

El papel biológico de estas proteasas probablemente está dirigido por un lado a la nutrición del parásito y por otro a su migración. La degradación de las IgGs por los TES probablemente contribuya a la inmunoevasión del parásito, como ha sido sugerido que ocurre en las larvas recién nacidas de *Trichinella spiralis* (Matsumoto et al., 1984).

Se ha propuesto que algunos nematodos utilizan enzimas para facilitar la eclosión de las larvas (Rogers, 1978), por lo que en el presente trabajo se evaluó la actividad proteolítica del fluido perivitelino (PFP) para determinar si existen enzimas durante el proceso de la eclosión de las larvas de *T. canis*. En los PFP obtenidos de la eclosión de las larvas se detectaron tres bandas con actividad proteolítica sobre la gelatina copolimerizada. El PM de estas bandas fue de 91, 68 y 38 kDa y a pH 5.5 (figura 14) se observó la mayor actividad proteolítica. Las enzimas del PFP se



inhibieron con Pepstatina A (figura 15) por lo que se trata de aspartil proteasas (Birk, 1976).

Las enzimas detectadas en los PFP (aspartil-proteasas de 91, 68 y 38 kDa) son diferentes a las detectadas en los TES (serín-proteasa de 120 kDa). Lo anterior puede explicarse si se considera que probablemente tienen funciones diferentes. Los PFP se encuentran dentro de los huevos y se liberan durante la eclosión por lo que muy probablemente ayudan a ésta. Lo anterior se refuerza por el hecho de que dentro del hospedador, la eclosión se realiza en el estómago que tiene un pH ácido y la mayor actividad detectada de estas enzimas fue a pH 5.5 que esta más cercano al pH gástrico.

En el filtrado del macerado de las larvas de *T. canis* (EL) considerado extracto de larvas (EL), se detectaron dos bandas con actividad proteolítica sobre gelatina copolimerizada. La actividad enzimática fue mayor a pH 7.5 y el PM fue de 69 y 61 kDa, dicha actividad se inhibió con Leupeptina por lo que son serín-proteasas (Carrell & Travis, 1985). La cantidad de estas enzimas es muy baja, puesto que no se pudo detectar actividad cuando se maceraron 10 000 larvas y esta ocurrió después de macerar 100 000 larvas de *T. canis*. En los EL no se pudo detectar la banda de 120 kDa observada en los TES, lo que sugiere que la enzima de 120 kDa, se produce a través de una síntesis y secreción larvaria. La función de las enzimas detectadas en el EL no se estudió en este trabajo, pero posiblemente participen en los procesos fisiológicos internos de las larvas como la digestión de proteínas a nivel intestinal como han sido detectadas en otros nematodos (Smith *et al.*, 1997). Además, no se observaron en los sobrenadantes de las larvas. Otra posibilidad es que las enzimas detectadas polimericen cuando salen de la larva y forman la banda de 120 kDa con actividad de proteasa que se detecta en los TES, esto solo se podría comprobar con el uso de anticuerpos monoclonales contra la enzima de 120 kDa y analizar su posible cruce antigénico con las bandas detectadas en los EL.

Uno de los factores que se ensayó en este trabajo fue el uso del pH como indicador en la función de la proteasa sobre el sustrato. Varios reportes en la literatura muestran que el pH es fundamental para el funcionamiento de la proteasa. En este

trabajo el pH no alteró la actividad proteolítica de los TES sobre la gelatina, albúmina e IgG de cabra pero sí sobre laminana y fibronectina en donde el pH que determinó mayor actividad fue el de 9.0. En el PFP el pH con mayor actividad fue de 5.5 y en EL de 7.5. Esta diferencia en la actividad enzimática a distintos pH probablemente ayude a controlar su actividad en los microambientes del parásito.

No obstante lo anterior, no siempre el pH óptimo de una enzima es el pH del microambiente de los sitios de acceso hacia y dentro del hospedero. Por ejemplo, la proteasa de la cercaria de *Schistosoma mansoni*, la cual penetra la piel intacta, tiene un pH óptimo de 9.0 (McKerrow, et al., 1989), la larva de *Trichinella spiralis* secreta una proteasa la cual tiene un pH óptimo de 7.5 (Todorova, 2000), la larva de *Trichostrongylus columbriformis* secreta una enzima que tiene un pH óptimo de 8.0, mientras que la proteasa de la larva de *Haemonchus contortus* tiene un pH óptimo de 7.5 (Hadas & Stankiewicz, 1997). Posiblemente, estos pH de óptima actividad y el lugar de asentamiento de estos parásitos tengan implicaciones adaptativas, los parásitos podrían utilizar estas enzimas de manera regulada influenciadas por el ambiente para aumentar o disminuir actividad y de esta manera por un lado le permita sobrevivir al parásito y por el otro lado le cause el menor daño posible al hospedero.

El presente trabajo permitió detectar enzimas secretadas por larvas de *T. canis* que no se habían reportado hasta el momento y que tienen actividad sobre laminina (81, 46, 34 y 32 kDa) y fibronectina (81, 46 y 32 kDa), además se detectó que la enzima de 120 kDa puede utilizar como sustrato además de la gelatina, a la albúmina e IgGs de cabra. También se detectaron por primera vez tres bandas con actividad enzimática sobre gelatina (91, 68 y 38 kDa) en el fluido perivitelino (PFP) de los huevos de *T. canis*. Por último se detectaron dos nuevas bandas con actividad proteolítica sobre gelatina (69 y 61 kDa) en los extractos de las larvas (EL) de *T. canis*.

A manera de perspectiva, se puede plantear que en trabajos futuros se podrían encaminar a detectar otras proteasas que tengan actividad sobre otros sustratos proteicos de interés como la hemoglobina, entactina, elastina y otras proteínas de unión celular. Además, probablemente se tendrá que optar por un modelo mejorado que permita

simular con mayor aproximación a lo que a lo que podría estar pasando *in vivo*, por ejemplo, ensayos de interacción de las larvas con monocapas celulares o cultivos de tejidos e inmunocitoquímica para buscar las proteasas en el paso de las larvas.

## 8. CONCLUSIONES

- Los TES presentaron una serín-proteasa de 120 kDa con actividad proteolítica en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina y albumina. La actividad de la enzima no presentó variación en la actividad a ninguno de los pH utilizados (5.5, 7.6 y 9.0).
- La serín-proteasa de 120 kDa demostró actividad sobre IgG de cabra, con mayor actividad a pH de 7.6
- Los PFP presentaron 3 aspartil-proteasas de 91, 68 y 38 kDa con actividad sobre geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina. Estas enzimas tuvieron mayor actividad a pH 5.5.
- El EL presentó dos serín-proteasas de 61 y 69 kDa con actividad sobre geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina. Estas enzimas tuvieron mayor actividad a pH 7.6.
- Los TES presentaron 4 serín-proteasas de 81, 46, 34 y 32 kDa con actividad sobre geles de poliacrilamida copolimerizados con laminina. La mayor actividad de estas enzimas se observó a pH 9.
- Los TES presentaron 3 serín-proteasas de 81, 46 y 32 kDa con actividad sobre geles de poliacrilamida copolimerizados con fibronectina. La mayor actividad de estas enzimas se observó a pH 9.

## 9. BIBLOGRAFÍA

- Anaruma, F.F., Chieffi, P. y Correa, C.R. Human toxocariasis: a seroepidemiological survey in the municipality of Campinas (SP), Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.*2002;44(6):303-307
- Allen, J.E. & MacDonald, A.S. Profound suppression of cellular proliferation mediated by the secretions of nematodes. *Parasite Immunol.*1998;20:241-247.
- Angulo, R., Aguila, C. & Guillen, J.L. Contaminación de suelos de parques públicos por *Toxocara canis*. *Rev. Iber. Parasitol.* Vol. Extraordinario.1985;165-171.
- Arandas, R.A. Contamination of the soil in parks and and gardens of Lisbon by eggs of *Toxocara canis* and other helminthes. *Ann. Esc. Sup. Med. Vet.*1980; 22:152-162
- Aranjo, P. Observacoes pertinentes as primeiras ecdisis de larvas de *Ascaris lumbricoides*, *A. suum* and *Toxocara canis*. *Rev Inst. Med. Trop. S. Paulo.*1972;14:83-90
- Ash, C.P.J. & Atkinson, H.J. *Nematodirus battus*: permeability changes, calcium binding, and phosphorylation of the eggshell during hatching. *Exp. Parasitol.*1983; 58:27-40
- Auriault, C., Quassi, M.A., Torpier, G., Eisen, H. & Capros, A. PRoteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor of *Schistosoma mansonii* schistosomula. *Parasite Immunol.*1981;3:33-34
- Badley, J.E., Grieve, R.B., Bowman, D.D., Glickman, L.T. & Jockey, J.H. Analysis of *Toxocara canis* larval excretory-secretory antigens: physicochemical characterization and antibody resognition. *J. Parasitol.*1987;73:593-600
- Bardón, I.M. Contribución a la biología e inmunología de *Toxocara canis*. (tesis de doctorado). Madrid, España: Universidad Complutense. Facultad de Farmacia. Departamento de Parasitología. 1992.
- Barret, A.J. In Protein degradation in health and disease. Ciba Foundation Symposium 75 (ed. Evered, D. & Whelan, J.) p.1 *Excerpta Medica*, Amsterdam. 1980
- Beautyman, W., Beaver, P.C., Buckley, J.J.C. & Wolf, A.L. Review of a case previously reported as showing an ascarid larva in the brain. *J. Pathol. Bacteriol.*1966; 91:271-273
- Beynon, R.J. & Bond, J.S. Proteolytic enzymes. A practical approach. 2<sup>da</sup> ed. Oxford University Press. 2001
- Beaver, P.C. Zoonoses with particular referente to parasites of veterinary importante, in *Biology of Parasites*, Soulsby, E.J.L. Ed. Academic Press, New York. 1966

- Beaver, P.C., Jung, R.C. & Cupp, E.W. *Parasitología Clínica*. 2ª Ed. Salvat. 1986
- Beaver, P.C., Snyder, C.H., Carrera, G.M., Dent, J.H. & Lafferty, J.W. Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. *Paediatrics*.1952;9:7-19
- Becroft, D.M.O. Infection by the dogroundworm *Toxocara canis* and fatal myocarditis. *N.Z. Med J*.1964;63:729
- Behm, C.A. The role of trehalose in the physiology of the nematodes. *Int. J. Parasitol*.1997; 27:215-219
- Birk, Y. Protease inhibitors. *Methods Enzymol*.1976; 45:701-703
- Bjerrum, O.J. Handbook of immunoblotting of proteins. Vol. I y II. Ed. CRC. PRESS. Florida, USA. 1988
- Bond, J. S. & Butler, P.E. Intracellular proteases. *Ann. Rev.Biochem*.1987;56:333
- Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*.1976;72:248
- Brand, T von. Proteases. In: Biochemistry of Parasites. pp.268-275. Academic Press. New York. 1973
- Brown, A., Girod, N., Billet, E.E. & Pritchard, D.I. *Necator americanus* (human hookworm). Aspartyl proteinases and digestion of skin macromolecules durin skin penetration. *Am. J. Trop. Med. Hyg*.1999;60 (5):840-847
- Burke, T.M. y Roberson, E.L. Prenatal and lactational transmission of *Toxocara canis* and *Ancylostoma caninum*: experimental infection of the bitch before pregnancy. *Int. J. Parasitol*.1985;15(1):71-75
- Burren, C.H. Experimental toxocariasis. I. Some observations on the histopathology of the migration of *Toxocara canis* larvae in the mouse. *Z. Parasitenkde*.1968;30:152
- Byres, B. & Kimura, S.J. Uveitis alter death of a larva in the vitreous cavity. *Am. J. Ophthal*.1974;77:63-66
- Capron, M & Capron, A. Immunoglobulin E and effector cells in schistosomiasis. *Science*.1994;264:1876-1877
- Carrel, R & Travis, J.  $\alpha_1$ -Antitrypsin and the serpins: variation and countervariation. *Trends Biochem Sci*.1985;10:20-24
- Chappell, C.L. & Dresden, M.H. *Schistosoma mansoni*: proteinase activity of "hemoglobinase" from the digestive tract of adult worms. *Exp. Parasitol*.1986;61:160-167.

- Chieffi, P.P. & Muller, E.E. Prevalencia de parasitismo por *Toxocara canis* em case e presence de ovos de *Toxocara* gr no solo de localidades públicas de zona urbana do municipio de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. *Rev. Saúde. Publ. S. Paolo.*1976; 10:367-372
- Chieffi, P.P & Muller, E.E. Estudo da variacao mensal na contaminacao do solo por ovos de *Toxocara sp.* (Nematodo, Ascaroidea), na zona urbana do municipio de Londrina, Estado de Paraná, Brasil. *Rev. Iber. Adolfo Lutz.*1978;38(1):13-16
- Cook, W.J. & Bugg, C.E. Calcium interaction with D-glucans: crystal structure of  $\alpha,\alpha$ -trehalose-calcium bromide monohydrate. *Carb. Res.*1973;31:265-275
- Cordero del Campillo, M., Rojo, F.A., Martínez, A.R., Sánchez, M.C., Hernández, S., Navarrete, I., Diez, P., Quiroz, H. y Carvahlo, M. *Parasitología veterinaria*. Editorial Mac Graw Hill Interamericana.1999
- Cox, G.N., Pratt, D., Hageman, R. & Boisvenue, R.J. Molecular cloning and primary sequence of a cystein protease expressed by *Haemonchus contortus* adult worms. *Mol. Biochem. Parasitol.*1990;41:25-34
- Critchley, E.M.R., Vakil, S.D., Hutchinson, D.N. & Taylor, P. *Toxoplasma, Toxocara* and epilepsy. *Epilepsia.*1982;23:315
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A. & Crowe, L.M. Anhydrobiosis. *Ann. Rev. Physiol.*1992; 54:579-599
- Dada, B.J.O. y Lindsquist, W.D. Studies on flotation techniques for the recovery of helmintho eggs from soil and the prevalence of eggs of *Toxocara spp.* in some Kansas public places. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*1979;174(11):1208-1210
- Dalton, J.P. & Heffernan, M. Thiol proteases released *in vitro* by *Fasciola hepatica*. *Mol. Biochem. Parasitol.*1989;35:161-166
- Davidyants, V.A. y Chobanyan, A.G. Some aspects of the epizootiology and epidemiology of toxocariosis. *Med. Parazitol. Trop. Med.* 1981:83-84
- De Savigny, D.H. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of Toxocara ES antigen for use in serodiagnosis test for visceral larva migrans. *J. Parasitol.*1975;61:781-782
- De Savigny, D.H., Voller, A. & Woodruff, A.W. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *J. Clin. Pathol.*1979;32:284-288
- Dent, J.H., Nichols, R.L. & Beaver, P.C. Visceral larva migrans with a case report. *Am. J. Pathol.*1956;32:77-80
- Despommier, D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology and molecular aspects. *Clin. Microbiol Rev.*2003;16(2):265-272

- Dodge, J.S. *Toxocara canis*: The risks of infection. *New Zealand Med. J.*1980;651:24-26
- Douglas, J.R. y Baker, N.R. The chronology of experimental intrauterine infection with *Toxocara canis* (Werner, 1782) in the dog. *J. Parasitol.*1959;45:S43-S44
- Dubremetz, J. F. & McKerrow, J.H. Invasion mechanisms. J. J. Marr, & M. Müller, eds. *Biochem. Mol. Parasitology* 307. Academic Press, San Diego, CA. 1995.
- Dunsmore, J.D., Thompson, R.C..A. & Bates, I.A. The accumulation of *Toxocara canis* larvae in the brain of mice. *Int. J. Parasitol.*1983;13:517
- Duwell, D. Toxocariosis in humans and veterinary medicine and how to prevent it. *Helminthologia.*1983;20:277-286
- Eguia-Aguilar. Análisis ecológico de comunidades de helmintos intestinales de perros obtenidos en centros de control canino del DF., México. Memorias del XIII Congreso Nacional de Parasitología. Zacatecas, Zac.1998
- Fairbairn, D. & Passey, R.F. Occurrence and distribution of trehalose and glycogen in the eggs and tissues of *Ascaris lumbricoides*. *Exp. Parasitol.*1957;6:566-574
- Falcone, F., Tetteh, K.K.A., Hunt, P., Blaxter, M.L. Loukas, A.C. & Maizels, R.M. The new subfamily of cathepsin Z-like protease genes includes Tc-cpz-1, a cysteine protease gene expressed in *Toxocara canis* adults and infective larvae. *Exp. Parasitol.*2000; 94:201-203
- Fashuyi, S.A. Diagnostic of gastro-intestinal helminths of dogs in Lagos area using the Kato-Katz technique. *Bull. Ann. Health. Prod. Afr.*1981;29(4):333-335
- Fernández, P.A., Martínez, B.I., Gutiérrez, Q.M. & Vázquez, T.O. Serología para detección de helmintos extraintestinales en niños con alteraciones neurológicas. *Rev. Mex. Patol. Clin.*1999;46(4):217-221
- Garbus, G. [www.vorupdyrehospital.dk/laboratorie.htm](http://www.vorupdyrehospital.dk/laboratorie.htm).2003
- Gems, D., Ferguson, C.J. & Robertson. An abundant trans-spliced mRNA from *Toxocara canis* infective larvae encodes a 26-kDa protein with homology to phosphatidylethanolamine-binding proteins. *J. Biol. Chem.*1995;270(31):18517-18522
- Gems, D. & Maizels, R.M. An abundantly expressed mucin-like protein from *Toxocara canis* infective larvae: the precursor of the larval surface coat glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*1996;93:1665-1670
- Genchi, C., Di Sacco, B., Gatti, S., Sangalli, G. y Scaglia, M. Epidemiology of human toxocariasis in northern Italy. *Parassitologia.*1990;32:313-319



Ghadirian, E., Viens, P., Stroykowski, H. & Dubrevil, F. Epidemiología de la toxocariosis en el área de Montreal. Prevalencia de *Toxocara* y otros helmintos en perros y tierra. *Can. J. Public. Health*.1976;67(6):495-498

Ghafoor, S.Y.A., Smith, H.V., Lee, W.R., Quinn, R. & Girdwood, R.W.A. Experimental ocular toxocariasis: a mouse model. *Brit. J. Ophthalmol*.1984;68:89-96

Girdwood, R., Smith, H., Bruce, R. & Quinn, R. Human *Toxocara* infection in west of Scotland. *Lancet*. Junio.1978;17:1318

Gillespie, S.H. & Pearsons, R.D. Principles and Practice of Clinical Parasitology. Ed. Wiley Johon. Inglaterra. 2001

Glickman, L.T., Magnaval, J.F. & Domanski, L.M. Visceral larva migrans in French adults: a new disease syndrome? *Am. J. Epidemiol*.1987;125(6):1019-1034

Glickman, L.T. & Schantz, P.M. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidemiol Rev*.1981;3:230-250

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

Glickman, L.T. & Summers, B.A. Experimental *Toxocara canis* infection in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Am. J. Vet. Res*.1983;44:2347

Grigg, M.E., Gounaris, K. & Selkirk, M.E. Characterization of a platelet-activating factor acetylhidrolase secreted by the nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Biochem. J*.1996;317:541-547

Gunaseelan, L., Ramadass, P. & Raghavan, R. Serological diagnosis of *Toxocara canis* infection in children. *Indian. Vet. J*.1986;63:828-832

Gutiérrez, Q.M., Martínez, B.I., Alonso, G.T. & Fernández, P.A.M. Reactividad serológica a cinco antígenos de parásitos en adolescentes escolares. *Rev. Mex. Patol. Clin*.2000;47(1):32-37

Hadas, E. & Stankiewicz, M. Proteolytic enzymes of infective larvae and adults of *Trichostrongylus columbiformis* and *Haemonchus contortus*. *Parasitol. Res*.1997; 83:47-51

Harrap, S.A., Prociv, P. & Brindley, P.J. ACASP, A gene encoding a cathepsin D-like protease from the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Biochem. Biophys. Res. Comm*.1996;227:294-302

Hartley, B.S. *Annu. Rev. Biochem.* 29:1960:45

Healer, J., Ashall, F. & Maizels, R.M. Characterisation of proteolytic enzymes from larval and adult hookworm *Ancylostoma caninum*. *Parasitology*.1991;103:305

- Hermann, N., Glickman, L.T. & Schantz, P.M. Seroprevalence of zoonotic toxocariasis in the United States. *Am. J. Epidemiol.*1985;122:890-896
- Hermanowska-Szapkowicz, T., Kondrusik, M., Swierzbinska, R., Zajkowska, J. & Pancewicz, S. Incidence of antibody detection against *Toxocara canis* and clinical symptoms in inhabitants of North-Eastern Poland. *Pol. Merkuriusz. Lek.*2001;57:168-170
- Higashikawa, H. Shikoku Acta Med., 17:1961:1. Abastract: *Trop. Dis. Bull.*1960; 57:155
- Hill, I.R., Denham, D.A. & Scholtz, C.L. *Toxocara canis* larvae in the brain of a British child. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*1985;79:351-354
- Hishida, R., Ishihara, T., Kondo, K. & Katsura, I. *hch-1*, a gene required for normal hatching and normal direction of a neuroblast in *C. elegans*, encodes a protein related to TOLLOID and BMP-1. *The EMBO J.*1996;18:4111-4122
- Holland, C.V. Epidemiology of toxocariasis in Ireland: human, animal and experimental aspects. In Hojland, C.V. (ed) *Modern Perspectives on Zoonoses*. Dublin: Royal Irish Academy. 1997
- Hotez, P.J., Narasimhan, S., Haggerty, J., Milstone, L.B., Bhopale, V., Schad, G.A. & Richards, F.F. Hyaluronidase from infective *Ancylostoma hookworm* larvae and its possible function as a virulence factor in tissue invasion and in cutaneous larvae migrans. *Infection and Immunity.*1992;60:1018-1023
- Hotez, P.J. & Pritchard, D.I. Hookworm infection. *Sci. Am.*1995;6:42-48
- Hotez, P.J., Trang, N.L., McKErrow, J.H. & Cerami, A. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the adult hookworm *Ancylostoma caninum*. *J. Biol. Chem.*1985;260:7343-7348
- Josephs, D.S., Bhinder, P. & Thompson, A.R. The prevalence of *Toxocara* infection in a child population. *Public Health.*1981;95:273-275
- Karanu, F.N., Rurangirwa, F.R., McGuire, T.C. & Jasmer, D.P. *Haemonchus contortus*: identification of proteases with diverse characteristics in adult worm excretory-secretory products. *Exp. Parasitol.*1993;77:362-371
- Kayes, S.G. & Oaks, J.A. Effect of inoculum size and length of the infection on the distribution of *Toxocara canis* larvae in mouse. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*1976;25:573
- Kester, W.R. & Matthews, B.W. Crystallographic study of the binding of dipeptide inhibitors to thermolysin: implications for the catalytic mechanisms. *Biochemistry.*1977; 16:2506

- Khalil, H.N. Toxocariasis in Egypt. *J. Egypt. Pub. Health. Ass.* 1977; 52(5):330-343
- Kondo, K., Akao, N., Konishi, Y., Yoshimura, H. & Hirose, H. Immuno-electron microscopic observation of excretory cell of *Toxocara canis* larva. *Jap. J. Parasitol.* 1987;36(3):81-84
- Klinkert, M.Q., Felleisen, R., Link, G., Ruppel, A. & Beck, E. Primary structures of Sm31/32 diagnostic proteins of *Schistosoma mansoni* and their identification as proteases. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1989;33:113-122
- Koutz, F.R., Groves, H.F. y Scothorn, M.W. The prenatal migration of *Toxocara canis* larvae and their relationship to infection in pregnant bitches and in pups. *Am. J. vet. Res.* 1996; 27:789-795
- Kunkel, D. [www.visualsunlimited.com/.../vu285/vu285860.html](http://www.visualsunlimited.com/.../vu285/vu285860.html). 2002
- Kusama, Y., Takamoto, M., Kasahara, T., Takatsu, K., Nariuchi, H. & Sugane, K. Mechanisms of eosinophilia in BALB *c-nu*/+ and congenitally athymic BALB *c-nu*/nu mice infected with *Toxocara canis*. *Immunology.* 1995;84:461
- Lackey, A., James, E.R., Sankari, A.A., Resnik, S.D., Brown, M., Bianco, A.E. & McKerrow, J. Extracellular proteinases of *Onchocerca*. *Exp. Parasitol.* 1989;68:176-185
- Lamina, J. Toxocariasis: an important zoonosis in Germany? *Tierärztl Umschau.* 1986; 41:872-878
- Lee, D.L. The Biology of nematodes. Taylor and Francis. 2002.
- Lee, J.I., Lee, C.G. & Kim, O.N. Demonstration of helminthes eggs and larvae in the soil of public places in the Kwangju area, Korea. *Korean J. Vet. Res.* 1982;22(2):253-258
- Leid, R.W. Parasite defence mechanisms for evasion of host attack, a review. *Vet. Parasitol.* 1987; 25:147-162
- Levine, H. Nematode parasites of domestic animal of man. 2<sup>a</sup> Ed. Burgess. P.C. Minneapolis, USA. 1980
- Lewis, J.W. y Maizels, R.M. (eds). *Toxocara* and toxocariasis. *Clin., Epidemiol. Mol. Persp.* Institute of Biology. London. 1993
- Ljungstrom, I. & Van Knapen, F. An epidemiological and serological study of *Toxocara canis* infection in Sweden. *Scan J. Infect. Dis.* 1989;21(1):87-93
- Loukas, A.C., Hintz, M., Linder, D., Mullin, N.P., Parkinson, J., Tetteh, K.K.A. & Maizels, R.M. A family of secreted mucins from the parasitic nematode *Toxocara canis* bear diverse mucin domains but share similar flanking six-cysteine (SXC) repeat motifs. *J. Biol. Chem.* 2000

Loukas, A. & Maizels, R.M. Helminth C-type lectins and host-parasite interactions. *Parasitology Today*.1999;16:333-339

Lynch, N.R., Eddy, K., Hodgen, A.N., López, R.I. & Turner, K.J. Seroprevalence of *Toxocara canis* infection in tropical Venezuela. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*1988; 82:275-281

MacIennan K., Gallagher, M.P. & Knox, D. Stage-specific Serine and metallo-proteinase Release by Adult and Larval *Trichostrongylus vitrimus*. *Int. J. Parasitol.*1997; 27(9):1031-1036

Maganaval, J.F., Glickman, L.T., Dorchie, P. & Morassin, B. Highlights of human toxocariasis. *Kor. J. Parasitol.*2001;39(1):1-11

Magnaaval, J.F., Michault, A., Calon, N. & Charlet, J.P. Epidemiology of human toxocariasis in La Reunión. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*1994;88:531-533

Maizels, R.M., de Savigny, D. & Ogilvie, B.M. Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. *Parasite Immunol.*1984;6:23-37

Maizels, R.M., Gems, D.H. & Page, A.P. Synthesis and secretion of TES antigens from *Toxocara canis* infective larvae. In: Lewis, J.W. and Maizels, R.M. (eds) *Toxocara and Toxocariasis: Clinical, Epidemiological and Molecular Perspective*. Institute of Biology, London. 1993:141-150

Maizels, R.M. & Robertson B.D. *Toxocara canis*: Secreted glycoconjugate antigens in immunobiology and immunodiagnosis. In Englund PT, Sher A (eds). *Parasitic nematodes -Antigens. Membranes and Genes*. London: Taylor and Francis. 1991:91-115

Maizels, R.M. & Selkirk, M.E. Immunobiology of nematode antigens. In Kennedy M.W. (ed). *The Biology of Parasitism*. New York: Alan R. Liss.1988:285-308

Maizels, R.M., Tetteh, K.A. y Loukas, A. *Toxocara canis*: genes expressed by the arrested infective larval stage of a parasitic nematode. *Int. J. Parasitol.*2000; 30:495-508

Maki, J., Furuhashi, A. & Yanagisawa, T. The activity of acid proteases hydrolysing haemoglobin in parasitic helminths with special reference to interspecific and intraspecific distribution. *Parasitology*.1982;84:137-147

Malakhov, V.V. Nematodes. Smithsonian Institution Press, Washington/London. 1994

Marron, J.A. y Schroeder, R.J. Survey of *Toxocara canis* infection rate in impounded dog in Los Angeles country. *J. Am. Vet. Med. Ass.*1978;172(6):713

Martínez, B.I., Fernández, P.A., Vázquez, T.O. & Gutierrez, C.M. Frecuencia de helmintos en perros del Distrito Federal. Memorias del XIII Congreso Nacional de Parasitología, Zacatecas, Zac. 1998

Martínez, B.I., Gutiérrez, Q.M., Fernández, P.A., Pérez, L.M., Vázquez, T.O. & García, Y.Y. Reactividad serológica a un antígeno de *Toxocara canis* en una población escolar. *Rev. Mex. Patol. Clin.* 1997;44(2):85-89

Matsumoto, K., Yakamoto, T., Kamata, R. & Maheda, H. Pathogenesis of serratial infection: activation of Hageman factor-prekallikrein cascades and serratia protease. *J. Biochem.* 1984;96:739

Matsumura, K. y Endo, R. Investigation of antibodies against *Toxocara canis* in naturally infected puppies. *Bak. Hyg. I. Abt. Orig.* 1982;253:139-143

Matthews, B.E. The passage of larval helminths through tissue barriers. In: Parasite invasion. *Symposium of the British Society for Parasitology*. Blackwell Scientific, Oxford. 1977;15:93-119

McKerrow, J.H. Parasite proteinases. *Exp. Parasitol.* 1989;68:111-115

McKerrow, J.H., Brindley, P., Brown, M., Gam, A.A., Staunton, C & Neva, F.A. *Strongyloides stercoralis*: Identification of a protease that facilitates penetration of skin by the infective larvae. *Exp. Parasitol.* 1990;70:134-143

McKerrow, J.H. & Doenhoff, M.J. Schistosome proteases. *Parasitol Today*. 1988;4:334

McKerrow, J.H., Jones, P., Sage, H. & Pino-Heiss, S. Proteinases from the invasive larvae of the trematode parasite *Schistosoma mansoni* degrade connective tissue and basement membrane macromolecules. *Biochem. J.* 1985;231:47-51

McKerrow, J.H., Pino-Heiss, S., Lindquist, R. & Werb, Z. Purification and Characterisation of an Elastolytic Proteinase secreted by cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 1985;260(6):3703-3707

McKerrow, J.H., Rosenthal, P., Sun, E. & Bouvier, J. The proteases and pathogenicity of a parasitic protozoa. *Ann. Rev. Microbiol.* 1993;47:821

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

Mei, B., Kennedy, M.W., Beauchamp, J. & Komuniecki, R. Secretion of a novel, developmentally regulated fatty acid-binding protein into the perivitelline fluid of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. *J. Biol. Chem.* 1997;272:9933-9941

Miller, H.R.P. The protective mucosal response against gastro-intestinal nematodes in ruminants and laboratory animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1984;6:167-259

- Moczon, T. & Wranicz, M. *Trichinella spiralis*: proteinases in the larvae. *Parasitol. Res.* 1999;85:47-58
- Moreira-Silva, S.F., Rodrigues, M.G., Pimenta, J.L., Gomez, C.P., Freire, L.H. & Pereira F.E.L. Toxocariosis of the central nervous system: with report of two cases. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2004;37(2):169-174
- Moyle, M., Foster, D.L., McGrath, D.E., Brown, S.M., Laroche, Y., De Meutter, J., Stanssens, P., Bogowitz, C.A., Fried, V.A., Ely, J.A., Soule, H.R. & Vlasuk, G.P. A hookworm glycoprotein that inhibits neutrophil function is a ligand of the integrin CD11b/CD18. *J. Biol. Chem.* 1994;269:10008-10015
- Mustoe, T. *Toxocara canis*. A Review. Stage 3. Biological Imaging. Independent studies. <http://vertigo.derby.ac.uk/BiologicalImaging/Shows/fys99/tm/toxocara%20canis.pdf>. 1999
- Nadler, S.A. Phylogeny of some ascaridoid nematodes, inferred from comparison of 18S and 28S rRNA sequences. *Mol Biol Evol.* 1992;9:932-44
- NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) *Enzyme nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes*. Academic Press, Orlando. 1992
- Neurath, H. Proteolytic enzymes, past and future. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999;96:10962-10963
- Nicholas, W.L., Stewart, A.C. & Walker, J.C. Toxocariasis: a serological survey of blood donors in the Australian Capital territory. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1986; 80:217-221
- Nichols, R.L. The etiology of visceral larva migrans. I-Diagnostic morphology of infective second-stage *Toxocara canis* larvae. *J. Parasitol.* 1956;42(4):349-362
- North, M.J. Comparative biochemistry of the proteinases of eukariotes microorganism. *Microbiol Rev.* 1982;46:308
- Oshima, T. Standardization of techniques for infecting mice with *Toxocara canis* and observation on normal migration routes of the larva. *J. Parasitol.* 1961;47:652-656
- Overgaauw, P.A.M. Aspects of *Toxocara* epidemiology: Toxocarosis in Dogs and Cats. *Crit. Rev. Microbiol.* 1997;23(3):233-251
- Page, A.P., Rudin, W., Fluri, E., Blaxter, M.L. & Maizels, R.M. *Toxocara canis*. A labile antigenic surface coat overlying the cuticle of infective larvae. *Exp. Parasitol.* 1992;75:72-86

- Park, H.Y., Lee, S., HUH, S., Kong, Y. & Magnaval, J.F. A seroepidemiological survey for toxocariasis in apparently healthy residents in Gangwon-do, Korea. *Korean J Parasitol.*2002;40(3):113-117
- Perlingiero, J.G. & Gyorgy, P. Chronic eosinophilia: report of case with necrosis of liver, pulmonary infiltrations, anemia and ascaris infections. *Am. J. Dis. Childhood.*1947; 73:34
- Philipp, M., Parkhouse, R.M.E. & Ogilvie, B.M. Changing proteins on the surface of a parasitic nematode. *Nature.*1980;287:538-440
- Polzer, M. & Conradt, V. Identification and partial characterization of the proteases from different developmental stages of *Schistocephalus solidus* (Cestoda: Pseudophyllidea). *Int. J. Parasitol.*1994;24:967-973
- Powers, J.C. & Harper, J.W. In *Proteinase inhibitors.* (ed. Barrett, A.J. and Salvensen, G. *Elselvier Science Publ., Amsterdam.*1986
- Quiroz, R. *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos.* Ed Limusa. 2003
- Radman, N.E., Archelli, S.M., Fonrouge, R.D., Guardias, M. & Linzitto, O.R. Human toxocariasis. It's seroprevalence in the city of La Plata. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* Rio de Janeiro.2000;95(3):281-285
- Rhoads, M.L. & Fetterer, R.H. Developmentally regulated secretion of cathepsin L-like cysteine proteases by *Haemonchus contortus*. *J. Parasitol.*1995;81:505-512
- Rifkin, M., Seow, H.F., Jackson, D., Brown, L. & Wood, P. Defense against the immune barrage: helminth survival strategies. *Immunol. Cell. Biol.*1996;74:564-574
- Robertson, B.D., Bianco, A.E., McKerrow, J.H. & Maizels, R.M. Proteolytic enzymes secreted by the larvae of the nematode *Toxocara canis*. *Exp. Parasitol.*1989; 69:30-36
- Rogers, W.P. The inhibitory action of insect juvenile hormone of the hatching of the nematode egg. *Comp. Biochem. Physiol.*1978;61:187-190
- Rogers, W.P. & Brooks, F. Leucine aminopeptidase and exsheathing activity in preparation from *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.*1978;8:449-452
- Rovedo, E., Jörg, M.E., Barros, J.C. & Taraducci, S. Toxocariasis (Larva Migrans Visceral). Un caso de la forma clínica encubierta y revisión del tema. Hospital materno infantil del Mar de Plata. 1992
- Sajid, M. & McKerrow, J.H. Cysteine proteasas of parasitic organisms. *Mol. Biochem Parasitol.*2002;120:1-21

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

Schmidt, G.D. & Roberts, L.S. *Fundamentos de Parasitología*. Comp. Ed. Continental. México. 1984

Schochet, S.S. Human *Toxocara canis* encephalopathy in a case of visceral larva migrans. *Neurology*. 1967; 17:227

Schwartz, B. Effects of secretion of certain parasitic nematodes on coagulation of the blood. *J. Parasitol.* 1921; 7:144-150

Shields, E.S. Ocular toxocariasis. A review. *Sury Ophthalmol.* 1984; 28:362-379

Shore, G.L. *Diagnostic Medical Parasitology*. Ed. ASM Press. Estados Unidos. 2001

Simon, M.F. y Conde, G.L. Datos epidemiológicos sobre la toxocariosis y larva visceral emigrante en la provincia de Salamanca. V Cong. Nac. Parasitol. Salamanca, Septiembre: 1987:237-238

Smith, T.S., Graham, M., Munn, E.A., Newton, S.E., Knox, D.P. & Coadwell, W.J. Cloning and characterization of a microsomal aminopeptidase from the intestine of the nematode *Haemonchus contortus*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1997; 1338:295-306

Smith, P.H. & Greer, C.H. Unusual presentation of ocular *Toxocara* infestation. *Brit. J. Ophthalmol.* 1971; 55:317-320

Snow, K.R., Ball, S.J. & Benick, J.A. Prevalence of *Toxocara* species eggs in the soil of five east London parks. *Vet. Rec.* 1987; 120(3):66-67

Snyder, C. H. Visceral Larva Migrans – 10 years experience. *Pediatrics*. 1961; 28:85

Soto, C.M.L. Inmunología de la infección por helmintos. *Rev. Esp. Alergol. Immunol. Clin.* 1998; 13(6):297-313

Sprent, J.F.A. Observations on the development of *Toxocara canis* (Werner, 1782) in the dog. *Parasitology*. 1958; 48:184-209

Soulsby, E.J.L. *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. 7ª Edición. Nueva Editorial Interamericana S.A de C.V. México, DF. 1987:150-151

Stirewalt, M.A. Chemical biology of secretions of larval helmintos. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1963; 113:36-53

Stone, W.M. & Girardeau, M.H. Transmammary passage of infectious stage nematode larvae. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 1967; 62:252-253



- Sugane, K. & Oshima, T. Purification and characterization of excretory and secretory antigen of *Toxocara canis* larvae. *Immunology*.1983;50:113-120
- Tang, B., Narasawa, S., Kitaoka, M., Marie-Claire, C & Hayashi K. General function of N-terminal propeptide on assisting protein folding and inhibiting catalytic activity based on observations with a chimeric thermolysin-like protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*2003;301(4):1093-1098
- Taylor, M.R.H. & Holland C.V. *Toxocariasis. Principles and Practice of Clinical Parasitology.* Trinity College. Dublin, Ireland. 2001
- Tetteh, K.K.A., Loukas, A., Tripp, C. & Maizels, R.M. Identification of abundantly-expressed novel and conserved genes from infective stage larvae of *Toxocara canis* by an expressed sequence tag strategy. *Infect. Immun.*1999;67:4771-4779
- Thompson, D., Bundy, D., Cooper, E. & Schantz, P. Epidemiological characteristics of *Toxocara canis* zoonotic infection of children in a Caribbean community. *Bull. WHO.*1986;64(2):283-290
- Todorova, V.K. Proteolytic enzymes secreted by larval stage of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Folia Parasitologica.*2000;47:141-145
- Tomimura, T., Yokota, M. & Takiguchi, H. Experimental visceral larva migrans in monkeys. *Jpn. J. Vet. Sci.*1976;38:533
- Tolan, R.W., Konop, R., Barton, L.L., Raunch, D. & Steele, R. *Toxocariasis. Med. J.*2001;3:2-5
- Uga, S., Matsumura, T., Aoki, W. & Kataoka, N. Prevalence of *Toxocara* species eggs in the sand pits of public parks in Hyogo Prefecture, Japan. *Jpn. J. Parasitol.*1989; 38(5):280-284
- Umar, S., Rabbani, A., Mian, M.J., Afzal, M. y Saeed, K. Efficacy of levamisole, mebendazole and pyrantel pamoate against natural infection of *Toxocara canis* in dogs. *Pakistan. Vet. J.*1986;6(3):127-128
- Vanparijs, O., Hermans, L. y Flaes, L. Helminth and protozoan parasites in dogs and cats in Belgium. *Vet. Parasitol.*1991;38(1):67-73
- Vegni Talluri, M., Paggi, L., Orecchia, P. & Dallai, R. Fine structure of bucal cavity and esophagus in *Toxocara canis* (Nematode, Ascarididae) infective larvae. *J. Ult. Mol. Struct. Res.*1986;97:144-157
- Wang, C., Huang, C.Y., Chan, P.H., Preston, P. & Chau, P.Y. Transverse myelitis associated with larva migrans. Finding of a larva in cerebrospinal fluid. *Lancet.*1983; I:423

Watzke, R.C., Oaks, J.A. & Folk, J.C. *Toxocara canis* infection of the eye. Correlation of clinical observation with developing pathology in the primate model. *Arch. Ophthalmol.* 1984;102:102

Webster, G.A. On prenatal infection and the migration of *Toxocara canis* Werner 1782 in dogs. *Can J. Zool.* 1958;36:435-440

Weis, W.I., Taylor, M.E. & Drickamer, K. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol. Rev.* 1998;163:19-34

Winkel, K.D., Saw, T.H. & Prociv, P. Risk of parasitic infections from sandpits. *Med. J. Aust.* 1990;153:503