



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLÁN

“Cinética de anticuerpos anti-antígenos de secreciones y excreciones de larvas de *Toxocara canis* en conejos infectados experimentalmente con tres diferentes ascaroideos.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

JOSÉ LUIS PARRAL SÁNCHEZ

ASESOR: Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán

COASESOR: Dr. Fernando Alba Hurtado



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLÁN

“Cinética de anticuerpos anti-antígenos de secreciones y excreciones de larvas de *Toxocara canis* en conejos infectados experimentalmente con tres diferentes ascaroideos.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

JOSÉ LUIS PARRAL SÁNCHEZ

ASESOR: Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán

COASESOR: Dr. Fernando Alba Hurtado



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
 UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
 ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
 PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
 Jefa del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos LA TESIS:

“CINÉTICA DE ANTICUERPOS ANTI-ANTÍGENOS DE SECRECIONES Y
 EXCRECIONES DE LARVAS DE TOXOCARA CANIS EN CONEJOS
 INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON TRES DIFERENTES ASCAROIDEOS”

Que presenta el pasante: José Luis Parral Sánchez
 Con número de cuenta: 08506952-1 para obtener el Título de: Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
 “POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
 Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de Diciembre de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	MVZ. Gloria Josefina Ortíz Gasca	
VOCAL	Dr. Guillermo Valdivia Anda	
SECRETARIO	Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán	
1er SUPLENTE	MVZ. Edna Maribel Legaspi Nuevo	
2do SUPLENTE	MVZ. Melitón Lara Rocha	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
 HHA/pm

DEDICATORIA

A ti mi Dios, por darme una segunda oportunidad y darle sentido a mi vida, mostrándome el camino para ser alguien en la vida y regresarlo a quien más lo necesite, hágase tu voluntad y no la mía.

A mi amada Esposa Nancy, porque siempre he contado contigo, por tu amor y comprensión porque hemos aprendido a amarnos y sujetarnos en los tiempos difíciles, gracias a ti he aprendido a ver la vida diferente, a soñar, a amar, a comprender que la vida se vive solo una vez, que hay que arriesgarse, que nada es imposible a pesar de que transcurriera el tiempo pero sobre todo, que nunca has perdido la fe en mí, en lo que era, en lo que soy, y en lo que seré, debo decir que eres y seguirás siendo mi mayor cómplice de mis locuras, y que está que se concluye, lleva tu marca , y decirte que he encontrado la paz y felicidad a tu lado te Amo.

A ti Madre, Catalina, tu amor es y será uno de los mejores regalos de mi vida, por siempre cuidarme protegerme, apoyarme por darme todo de ti tu vida misma, no hay manera de pagar todo lo que me has dado, más solo me queda pedir que Dios te bendiga porque eres la mejor madre del mundo, te debo a ti lo que soy, el que sea una persona realizada, feliz, porque sin ti no lo hubiese logrado.

A mi Padre Roberto, porque desde niño he contado contigo, por tu fuerza y tu ejemplo de vida, por tu amor, por ser mi padre.

A mi segunda madre Consuelo, por tu cariño que desde niño me profesas, tu calor, y comprensión por contar contigo siempre.

A mis madres ausentes, de manera física más no espiritual, Eloísa me enseñaste lo más maravilloso que es amar porque tú eras amor, Socorro por tus sabios consejos, porque siempre creíste en mí, por tu apoyo y amor. Alicia por tu paciencia y amor, gracias porque sé que siempre cuidan de mí y de toda nuestra familia.

A mis hijos: Jesús, Brenda, Mónica y Luis Rodrigo, por su comprensión, y apoyo incondicional, por su aliento en cada uno de mis pasos cuando pensaba que no podía lograrlo, por soportar las dificultades. Me siento privilegiado en ser su padre, son los mejores hijos.

A mis hermanos, Roberto, Daniel, Claudio, porque sin merecerlo siempre he pertenecido a sus vidas, cada uno de ustedes me motiva y son mi ejemplo de vida, por ser cada uno mi mayor orgullo. Porque nunca me he sentido solo gracias.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en la que me he desarrollado como, trabajador, alumno y ahora como profesionista, gracias por todo lo que me has dado.

Dr.- Marco Antonio Muñoz Guzmán y Dr. Fernando Alba Hurtado.

Gracias por aceptar ser mis asesor y coasesor de mi tesis. Es un privilegio para mí el pertenecer al grupo de estudiantes que estamos bajo su égida, por estar muy pendiente de su equipo y alumnos. Les agradezco, su tiempo, paciencia y sobre todo dedicación para un servidor.

Dr. Iván Pérez Luna, por su apoyo y orientación, al equipo de trabajo del Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES-Cuautitlán; Dr. Cesar Cuenca, Dr. Alejandro Buendía, Dra. Guadalupe, Dra. Lorena, gracias.

A los animales que durante toda la carrera me permitieron practicar, que son tan importantes en la investigación para mejorar, perfeccionar, descubrir. Gracias.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	I
1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
2.1.- Generalidades de <i>Toxocara canis</i>	2
2.2.- Ciclo biológico.....	2
2.3.- Epidemiología de la toxocariosis.....	4
2.4.-Toxocariosis en perros y otros hospedadores.....	5
2.5.- Toxocariosis en humanos.....	6
2.6.- Diagnóstico de la toxocariosis humana.....	8
2.7.- Antígenos de excreción-secreción de <i>T. canis</i> (AgESTc).....	9
2.8.- Dificultades en el diagnóstico de la toxocariosis.....	10
3. Justificación.....	12
4. Hipótesis.....	13
5. Objetivos.....	14
6. Materiales y Métodos.....	15
6.1.- Lugar de realización.....	15
6.2.- Animales experimentales.....	15
6.3 Obtención de los gusanos adultos de <i>T. canis</i> y <i>A. suum</i>	15

6.4.- Obtención de los gusanos adultos de <i>A. lumbricoides</i>	15
6.5.- Obtención y cultivo de huevos <i>T. canis</i> , <i>A. lumbricoides</i> y <i>A. suum</i>	16
6.6.- Diseño experimental.....	16
6.7.- Obtención de larvas de <i>T. canis</i>	17
6.8.- Obtención de AgESTc.....	17
6.9.- Desarrollo del ELISA.....	17
6.10.- Monitoreo de la infección.....	21
6.11.- Análisis estadístico.....	21
7. Resultados.....	22
8. Discusión.....	25
9. Conclusiones.....	28
10. Bibliografía.....	29
Apéndices.....	33
Apéndice 1 Reactivos para Bradford.....	33
Apéndice 2 Reactivos para la prueba de ELISA.....	33

I.- ABREVIATURAS.

Absorbancia.....	Abs
Ácido clorhídrico.....	HCl
Antígenos de excreción-secreción de <i>Toxocara canis</i>	AgESTc
Densidad óptica.....	D.O
Grados centígrados.....	°C
Inmunoensayo asociado a enzimas.....	ELISA
Inmunoglobulina E.....	IgE
Inmunoglobulina G.....	IgG
Interleucinas.....	IL
Kilodaltons.....	KDa
<i>Larva Migras Ocular</i>	LMO
<i>Larva Migrans Visceral</i>	LMV
Molar.....	M
Nanometros.....	nm
Posinoculación.....	p.i.
Potencial de hidrógeno.....	pH
Solución salina amortiguadora de fosfatos.....	PBS
Solución salina amortiguadora de fosfatos con tween 20.....	PBS-T

1.- RESUMEN

El propósito del trabajo fue comparar las cinéticas de anticuerpos séricos contra antígenos de secreciones y excreciones de larvas de *Toxocara canis*, en conejos infectados experimentalmente con *T. canis*, *Ascaris lumbricoides* o *Ascaris suum*. Se obtuvieron gusanos adultos de *T. canis*, *A. lumbricoides* y *A. suum*. A partir de hembras de cada especie, se obtuvieron huevos larvados y además se mantuvieron larvas de *T. canis* en cultivos para la obtención de antígenos de excreción-secreción (AgESTc). Se infectaron conejos machos de la raza Nueva Zelanda con 5000 huevos larvados de *T. canis* ($n = 35$), de *A. lumbricoides* ($n = 35$) o de *A. suum* ($n=35$), se dejó un grupo de animales no infectados como testigo ($n = 10$). En los días 1, 3, 5, 10, 20, 30 y 60 pos-inoculación (p.i.) se sacrificaron humanitariamente cinco conejos de cada grupo experimental y se obtuvo suero de estos animales. Por ELISA indirecta se determinaron las cinéticas de producción de anticuerpos contra AgESTc de cada grupo experimental. Los conejos infectados con *T. canis* mostraron un incremento significativo de sus niveles de anticuerpos contra AgESTc a partir del día 10 p.i. en comparación al día 1 p.i. ($p<0.05$), posteriormente sus niveles siguieron incrementando hasta el día 20 p.i. y se mantuvieron hasta el final del experimento. Los conejos infectados con *T. canis*, también mostraron niveles mayores ($p<0.05$) de anticuerpos contra AgESTc que los conejos infectados con *A. lumbricoides*, con *A. suum* y los conejos del grupo testigo. En los grupos de conejos infectados con *A. lumbricoides* y *A. suum*, solo se observó un incremento pobre de sus niveles de IgG anti-AgESTc al final del experimento, pero sin que se observaran diferencias significativas entre los niveles de anticuerpos contra AgESTc entre estos grupos y el grupo testigo ($p>0.05$). Los resultados de este estudio muestran que la reactividad cruzada entre *T. canis* y los otros ascaroideos estudiados en este modelo, es baja e indica la eficiencia de los AgESTc para el diagnóstico específico de la toxocariosis.

2.- INTRODUCCIÓN

2.1.- GENERALIDADES DE *Toxocara canis*

T. canis es un nematodo parásito perteneciente a la familia Ascaroidea. Los gusanos adultos se encuentran en el intestino delgado de perros, zorros y lobos. Sus fases larvianas pueden infectar a una gran variedad de hospederos paraténicos como son, roedores, rumiantes, aves y accidentalmente pueden infectar a los humanos. Presentan una coloración blanquecina o blanco lechosa, el macho mide de 4 a 10 cm por 2 a 2.5 mm de diámetro, en el extremo posterior termina curvado con dos pequeñas espículas. Las hembras miden 5-18 cm de largo por 2.5-3 mm de diámetro, el extremo posterior termina en forma recta con una punta roma. Ambos presentan 3 labios en el extremo anterior y dos prolongaciones laterales de la cutícula llamadas aletas cervicales que miden 2.5 por 0.2 mm dándoles una forma de punta de flecha. Los adultos de *T. canis*, tienen un promedio de vida aproximado de 4 meses, el perro expulsa a la mayoría a los seis meses de contraída la infección. Una hembra puede producir hasta 200,000 huevos al día, por lo que un solo hospedero con unos cuantos gusanos puede contaminar el ambiente diariamente con millones de huevos. (Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2011).

Las larvas pasivas de segundo estadio (L2), que se forma por muda de la L1 dentro del huevo, son la fase infectante del parásito. Presenta una longitud media de 404 μm (360-434 μm), con un diámetro a nivel del esófago de 18-21 μm . (Nichols, 1956). Los huevos son subsféricos, miden de 70 a 90 μm , son de color café y presentan 3 capas de las cuales, la más externa forma un cascarón grueso que presenta foseas en toda su superficie. (Alba-Hurtado, 1999; Quiroz, 2003).

2.2.- CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico de *T. canis* es complejo y varía dependiendo de la edad del hospedero definitivo y de la posible intervención de uno o varios hospederos paraténicos. El ciclo comienza con la eliminación de huevos de *T. canis* en la materia fecal de cachorros infectados que generalmente son menores de 12 semanas de edad. Estos huevos se dispersan en el ambiente, en condiciones óptimas de temperatura, humedad y oxígeno, se desarrolla la L2 dentro del huevo, esto ocurre aproximadamente a los 54 días a una temperatura de 12-18 °C y

en 14 días a 25-30 °C. El hospedero definitivo puede infectarse principalmente de tres formas diferentes: 1) por la ingestión de huevos larvados, 2) en forma vertical a través de la placenta o la leche o 3) por la ingestión de larvas enquistadas en tejidos de algún hospedero paraténico.

El ciclo biológico se puede cerrar en forma directa cuando un cachorro menor a 12 semanas de edad ingiere huevos larvados. En ellos las larvas eclosionan en el intestino delgado y penetran en la mucosa, pasan a la circulación sanguínea e inician una migración compleja denominada entero-hepato-cardio-pulmonar-entérica. Entre las 24-48 horas, llegan al hígado por vía porta, continúan por vena hepática, pasan a la vena cava caudal y de ahí por el lado derecho del corazón a la arteria pulmonar, las larvas rompen los capilares y los alvéolos para dirigirse a vías respiratorias altas, en los alvéolos pulmonares se realiza la muda de L2 a L3, al llegar a la faringe, son deglutidas continuando hacia el intestino delgado donde se realiza la cuarta muda, para después convertirse en adultos a los 28 días pos-infección. Los huevos se detectan en las heces de las cuatro a las cinco semanas y paulatinamente, cuando los cachorros crecen, se eliminan los gusanos adultos del intestino. (Quiroz, 2003; Pérez, 2008).

En los perros adultos ya no se desarrollan fases adultas en el intestino y cuando estos ingieren huevos del parásito, las larvas migrantes se enquistan en diferentes tejidos quedando en estado de hipobiosis. En las perras gestantes alrededor del día 40-42 de gestación, coincidente con el principio de la lactación, las larvas somáticas hipobióticas que puedan estar presentes en sus tejidos, se reactivan y movilizan hacia la placenta y glándula mamaria, probablemente debido a cambios hormonales asociados a la prolactina, cortisona y oxitocina y se produce de esta forma la infección intrauterina de los cachorros. En los fetos antes del parto, se produce una muda y las L3 continúan su desarrollo inmediatamente después del nacimiento, realizan una migración compleja y posterior a ello, maduran sexualmente en 3 o 4 semanas en el intestino del cachorro, produciendo infecciones perinatales y ocasionando que la perra se reinfecte con la materia fecal de sus cachorros debido a los hábitos de limpieza. En la perra lactante, la eliminación de larvas por calostro y leche se inicia inmediatamente después del parto, alcanza su nivel máximo en la segunda semana y luego decrece paulatinamente. Los cachorros continuamente se reinfectan con larvas a través de la ingestión de calostro y leche, este modo de infección no implica migración compleja, pues las larvas se desarrollan directamente hasta adultos en el intestino. Si los huevos larvados son ingeridos por algún hospedador paraténico, las larvas migran desde el intestino delgado hasta el corazón

desde donde se distribuyen principalmente al tejido muscular, cerebro, riñón, hígado y pulmones, permaneciendo en estado de hipobiosis por mucho tiempo. Si hay depredación de estos hospedadores paraténicos por un hospedador definitivo susceptible, las larvas hipobióticas son liberadas en el intestino delgado y evolucionan hasta la fase adulta directamente en el intestino sin que se lleve a cabo migración compleja. Esta es la única forma de infección en la que los perros adultos pueden transitoriamente, alojar gusanos adultos y eventualmente, eliminar huevos en la materia fecal.

2.3.- EPIDEMIOLOGÍA DE LA TOXOCARIOSIS

La distribución geográfica de la toxocariosis es cosmopolita con alta incidencia, patogenicidad e importancia como problema de salud pública. En México la incidencia de perros con toxocariosis es muy elevada y existen reportes de zonas en donde se pueden encontrar incidencias en cachorros menores a tres meses hasta del 100% (Alba-Hurtado, 1999). La principal fuente de infección en la naturaleza son los cachorros parasitados que contaminan con sus heces el suelo. Los cachorros portadores de fases adultas eliminan huevos del parásito por varios meses, las hembras adultas de *T. canis* producen hasta 200,000 huevos al día, por lo que un solo cachorro puede eliminar millones de huevos al día.

Los perros caseros, que frecuentemente son sometidos a desparasitación, mantienen cargas parasitarias bajas o controladas cuando menos en forma parcial y generalmente tienen poco impacto en la transmisión del parásito, sin embargo, las perras de la calle o caseras que no son desparasitadas, pueden mantener el ciclo de vida del parásito, debido a la transmisión vertical por placenta y calostro, lo que significa el nacimiento de cachorros parasitados potencialmente eliminadores de huevos infectivos a los 15 días de nacidos. La ingestión de hospederos paraténicos en los que se encuentran larvas somáticas infectivas, es una forma de infección para perros adultos en la que transitoriamente pueden eliminar huevos al ambiente, sin embargo la importancia de éstos como fuente de infección es baja.

Cuando los huevos están protegidos de la luz solar directa y de la desecación, los huevos se desarrollan hasta alcanzar la fase infectante en unas tres semanas y persisten en el suelo durante muchos meses, acumulándose en el entorno. De este modo, el suelo de las zonas en donde defecan los perros con toxocariosis se considera una fuente de infección constante.

Además, debido a la acción de las lluvias, es posible que los huevos se transporten a lugares distantes y alcancen grandes concentraciones sobre todo en áreas bajas del terreno. Los hospederos paraténicos generalmente se infectan al ingerir huevos larvados acumulados en los alimentos y agua contaminados.

Los huevos de *T. canis* que son eliminados al ambiente son muy resistentes a la mayoría de los desinfectantes comunes como el formaldehído y el cloro, por lo que la mejor forma de eliminarlos de casas y patios es en forma mecánica con agua y jabón. Por la dificultad de limpiar pisos de tierra o arena en jardines, lo mejor es utilizar calendarios de desparasitación estrictos en los perros que se encuentran en estos lugares (Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2011).

Los huevos pueden ser ingeridos por otros perros o por una serie de hospederos paraténicos como roedores, reptiles, aves, rumiantes, équidos, cerdos y otros. La infección puede también presentarse de manera accidental en el humano, siendo una de las principales enfermedades zoonóticas transmitidas por los perros. En los hospedadores paraténicos y en el humano, las larvas ingeridas no maduran pero si migran a diferentes órganos desarrollando un síndrome denominado *Larva Migrans* (Soulsby, 1986; Alba, 1999; Quiroz, 2003).

La infección humana se da principalmente en niños y ha sido asociada a diferentes factores como son la convivencia con cachorros parasitados, la actividad frecuente en parques públicos o jardines altamente contaminados y algunos hábitos como la geofagia (pica). La ingestión de huevos también puede ocurrir mediante vegetales y otros alimentos contaminados. En algunos países donde es común la ingestión de carne y vísceras crudas, también se dan casos de infección a través del consumo de animales con larvas enquistadas en sus tejidos. (Morales, 1999; Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2011).

2.4.- TOXOCARIOSIS EN PERROS Y OTROS HOSPEDADORES.

La presencia de gusanos adultos en el intestino de los cachorros puede tener diferentes repercusiones. Cuando la carga parasitaria es reducida la enfermedad puede ser subclínica, afectando moderadamente en el estado nutricional sin que se presenten otros signos clínicos. Cuando la carga es numerosa, puede causar serios trastornos que ponen en riesgo la vida del animal, debido principalmente al desplazamiento de las fases larvarias por los diferentes

órganos o bien, al establecimiento en el intestino delgado de grandes cantidades de gusanos adultos. (Martínez, 2005)

Los cachorros pueden presentar vómito, diarrea mucoide, deshidratación, abdomen distendido y dolor abdominal agudo. En cuadros crónicos puede haber desnutrición, pérdida de peso, pelo hirsuto, diarreas intermitentes, y en ocasiones convulsiones debido a la presencia de larvas migrantes en el cerebro. (Quiroz, 2003). También debido a la migración larvaria se pueden presentar signos clínicos respiratorios como tos y descargas nasales que pueden desaparecer después de tres semanas.

La acción mecánica por obstrucción la ejercen las fases adultas del parásito y puede ser una condición grave para los cachorros. Se interfiere con el paso del alimento alterando la digestión y absorción, algunos gusanos pueden invadir el conducto colédoco y los canales biliares y producir estasis biliar provocando mala digestión. También se produce una acción expoliatriz selectiva, el parásito utiliza grandes cantidades de vitamina C y nutrientes de naturaleza proteica, lípidos y carbohidratos provocando desnutrición. (Quiroz, 2003).

En los hospedadores paraténicos y accidentales como el humano, la migración larvaria tiene un efecto traumático sobre los órganos y tejidos por los cuales estas larvas transitan, principalmente se afectan el hígado, pulmón, riñón, músculo y cerebro. La presencia de la larva produce ruptura de capilares y alveolos en pulmones, acción expoliatriz hematófaga, histófaga y de líquidos tisulares, acción mecánica por obstrucción de vasos capilares sanguíneos y linfáticos, y un efecto proinflamatorio dado principalmente por los antígenos de excreción-secreción de la larva de *T. canis* (AgESTc). La presencia de los AgESTc en los tejidos, favorece una respuesta tisular caracterizada por la formación de granulomas con infiltrado eosinofílico que además contiene neutrófilos, linfocitos, histiocitos epiteloideos y células gigantes. (Quiroz, 2003).

2.5.- TOXOCARIOSIS EN HUMANOS

Existen principalmente dos cuadros clínicos comunes causados por la infección en humanos, el Síndrome de *Larva Migrans Visceral* (LMV) y el Síndrome de *Larva Migrans Ocular* (LMO). Otras formas clínicas descritas son la toxocariosis cerebral o neurotoxocariosis y la toxocariosis encubierta (Roldán y col., 2010).

El síndrome de LMV se presenta principalmente en niños de uno a cuatro años de edad con historial de pica, por lo general geofagia. (Soulsby, 1986; Alonso y col., 2004). Es una forma grave y sistémica de toxocariosis que se caracteriza por alta eosinofilia (síndrome hipereosinofílico), hepato-esplenomegalia, fiebre, afectación pulmonar, hipergamaglobulinemia y elevación de la isohemaglutininas anti-A y anti-B. Estas últimas se elevan porque las larvas de *T. canis* contienen antígenos de superficie que estimulan la producción de estas (Roldán y col., 2010). Los casos de LMV, suelen ser poco frecuentes y se producen casi exclusivamente en niños pequeños. Entre las posibles consecuencias de una eosinofilia prolongada está: la fibrosis pulmonar y la miocarditis eosinofílica. Otras manifestaciones pueden ser artralgias, vasculitis, prurito, urticaria eosinofílica y efusión pericárdica (Morales, 1999; Roldán y col., 2010). El síndrome hipereosinofílico se define como la elevación excesiva en la cuenta de eosinófilos la cual puede llevar a daño orgánico. En algunos casos se han descrito cuentas de leucocitos de 30 000 a 100 000/mm³ y con 50 a 90% de eosinófilos.(Alba-Hurtado, 1999).

El síndrome de larva Migrans Ocular (LMO), fue descrito por Wilder quien en 1950 observó larvas de *T. canis* en 24 de 46 pseudoglomas en ojos, que habían sido extraídos por endoftalmitis y presunto retinoblastoma. En 1951 Duguid describe 28 casos de lesiones retínicas granulomatosas centrales parecidos a retinoblastoma que obligó a la enucleación oftálmica, sin embargo el examen posterior solo reveló la presencia de larvas de *T. canis*. (Morales, 1999; Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2011). La invasión de las larvas a las estructuras del ojo produce lesiones de gravedad con pérdida de visión, generalmente unilateral. En la fase aguda aparecen endoftalmitis y uveítis, y en la crónica granulomas del polo posterior con fibrosis, en la mayoría de casos, hay ausencia de otros signos o síntomas. (Magnaval; 2001; López y col., 2005).

Las diferencias en el patrón de LMV y LMO son evidentes. La infección por *T. canis* raramente resulta en enfermedad ocular y sistémica al mismo tiempo; estas diferencias clínicas y epidemiológicas entre LMV y LMO pueden estar relacionadas con la dosis ingerida en el organismo. Algunas personas con LMO son de edad avanzada y no tienen historia de geofagia o exposición a cachorros, con este hecho puede suponerse que la carga larval es relativamente pequeña en contraste con pacientes que ingieren tierra y que presentan LMV; quienes pueden albergar en su hígado hasta 300 larvas por gramo de tejido.(Morales, 1999).

2.6.- DIAGNÓSTICO DE LA TOXOCARIOSIS HUMANA

Los signos clínicos y resultados asociados con LMV y LMO son inespecíficos y pueden reflejar una variedad de causas de infección. Como las larvas de *T. canis* no completan su ciclo vital en humanos nunca se pueden encontrar huevos en las heces y, por lo tanto, no se puede hacer un diagnóstico por medio de exámenes coproparasitológicos, además, a pesar que algunos tejidos como el hígado pueden contener numerosas larvas, la biopsia puede no tener éxito o estar contraindicada. Por consiguiente en la práctica, el diagnóstico depende de los resultados, clínicos y de la detección de anticuerpos específicos contra *T. canis* en el suero o en el líquido ocular.

Actualmente, se deben conjuntar hasta cinco datos clínicos para diagnosticar una toxocariosis sintomática: las características de la historia del paciente como la geofagia y exposición a los perros, los signos y síntomas clínicos encontrados, la presencia de eosinofilia, niveles incrementados de IgE total y una inmunoserología positiva, (Roldán y col., 2010). Los niveles totales de globulina tienden a ser elevados y los de albúmina más bajos, este hecho ocasiona que las proporciones de albumina globulina sean significativamente bajas.

Para el inmunodiagnóstico se han empleado múltiples pruebas que incluyen fijación de complemento, precipitación larval, inmunodifusión, hemoaglutinación indirecta, Inmunofluorescencia, y radioinmunoensayo. Estas pruebas varían en sensibilidad y especificidad, principalmente por diferencias en el estado del antígeno parasitario empleado (adulto o larva, somáticos o de excreción-secreción), la definición del título diagnóstico y las modificaciones en las técnicas del laboratorio (Morales, 1999).

La prueba de ELISA ha sido desarrollada y estandarizada principalmente para la detección de anticuerpos IgG anti-*Toxocara* con una sensibilidad que varía entre el 80 y el 100% y una especificidad del 90 al 95%. Estos valores pueden variar según la región geográfica donde se realice la prueba, en países tropicales donde existen zonas endémicas de otras helmintiasis y problemas de poliparasitismo, las reacciones cruzadas suelen ser frecuentes y, por lo tanto, se obtienen falsos positivos en los resultados (Magnaval y col., 2001; Finsterer y col., 2007).

La técnica de Western Blot se utiliza para el inmunodiagnóstico confirmativo. Esta técnica supera las pruebas utilizadas convencionalmente en cuanto a sensibilidad y especificidad y a

demás permite la realización de estudios seroepidemiológicos en las diferentes regiones donde esta parasitosis es un problema de salud pública.(Morales, 1999).

Esta prueba fracciona o divide los componentes de los AgESTc de acuerdo con su peso molecular, y fácilmente puede identificarse que los componentes de bajo peso molecular resultan ser más específicos para confirmar el serodiagnóstico de la toxocariosis.

2.7.- ANTÍGENOS DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN DE *Toxocara canis* (Ag-ESTc)

Las larvas de *T. canis* son capaces de producir y secretar AgESTc, estos son una serie de glicoproteínas altamente antigénicas. De Savigny (1975), desarrolló un método que con algunas modificaciones se sigue usando en la actualidad para la obtención de los AgESTc. Diferentes autores han descrito modificaciones de estos medios de cultivo y han descrito diferentes antígenos de estos sobrenadantes. (Maizels y col., 1984; Bowman y col., 1988).

En estudios utilizando anticuerpos monoclonales, se ha determinado que los dos sitios principales donde se producen los AgESTc, son las glándulas esofágicas y una larga rama de células columnares secretoras que desembocan a un poro excretor en el exterior de la larva, por la naturaleza de estos órganos dentro de la larva, se ha propuesto que en estos lugares se producen estos AgEST (Page y col., 1992).

Los AgESTc son depositados temporalmente en la superficie cuticular de la larva pero su unión con la misma es muy fácil de romper, lo cual favorece la inmunoevasión. Los AgESTc reaccionan con los anticuerpos y las células de la respuesta inmune del hospedero, pero al ocurrir la interacción, éstos se desprenden de la cutícula y evitan que la respuesta se produzca en la superficie del parásito. Los AgESTc también son capaces de neutralizar algunos de los compuestos del complemento y a los anticuerpos IgG. Activan inespecíficamente a los linfocitos B, induciendo producción policlonal de anticuerpos IgG e IgE. También inducen la activación de macrófagos para producir interleucinas I (IL-1), que a su vez estimulan a linfocitos B y a los eosinófilos. La activación inespecífica produce grandes cantidades de anticuerpos inespecíficos y por lo tanto distraen la respuesta inmune. (Meghji and Maizels; 1986).

El análisis de los AgEST en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y por Western Blot ha demostrado que estos antígenos son una mezcla compleja de glicoproteínas. Badley y col. (1987), detectaron 15 bandas proteicas en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata.

Las bandas fueron numeradas en orden decreciente de acuerdo al peso molecular (PM) y determinaron que las más abundantes son las bandas de 76, 78 y 88 kDa seguidas por las bandas de 29 y 34 kDa. Pese a lo anterior, la mayoría de los autores están de acuerdo en que los Ag-EST más abundantes en los sobrenadantes de los cultivos larvarios son 32, 55, 70, 120 y 400 kDa de peso molecular (Maizels, 1984; Meghji y col., 1986; Badley y col., 1987).

Los AgEST son glicoproteínas que presentan principalmente dos azúcares importantes la N-acetilgalactosamina y la galactosa, en menor abundancia otros como arabinol, manosa, N-acetilglucosamida, glucosa, fucosa y xilosa (Meghji and Maizels, 1986).

Estos carbohidratos están presentes en diferentes proporciones en algunos o todos los AgESTc forman epítomos que se encuentran ligados al complejo proteico del antígeno de manera fuerte o débil. Se han determinado ocho epítomos diferentes por medio de anticuerpos monoclonales, indicando que la respuesta inmunológica esta principalmente dirigida hacia los complejos glicosilados de la molécula (Maizels y col., 1987). Entre las secreciones de las larvas en cultivo se han detectado además de glicoproteínas, algunos lípidos, pero contra estos no se monta una respuesta inmunológica y no se han determinado cual es su papel biológico.

2.8.- DIFICULTADES EN EL DIAGNÓSTICO DE LA TOXOCARIOSIS

En varios estudios se ha demostrado que los AgESTc pueden cruzar antigénicamente con antígenos de otros helmintos como: *Ascaris suum*, *Ascaris lumbricoides*, *Anisakis simplex*, *Taenia solium*, *Strongyloides sp*; *Fasciola hepatica*, el metacestodo de *Echinococcus granulosus* (quiste hidatídico), *Toxascaris leonina*, *Schistosoma sp.* y *Oncocerca sp.* La fracción de bajo peso molecular presenta mayor especificidad hacia *Toxocara canis* (Magnaval y col; 2001; Perteguer y col., 2003; Zeballos-Lescano y col., 2012).

En diversos trabajos se ha demostrado la presencia de reacciones cruzadas que dificultan el reconocimiento de la toxocariosis a nivel clínico y experimental. Magnaval y col. (1992), reportaron en Francia una alta incidencia de reconocimiento cruzado de AgESTc por pacientes

con diversas helmintiasis como anisakiosis, fasciolosis e hidatidosis, lo cual afectó la sensibilidad de la prueba y no hizo posible asegurar el diagnóstico. En otro estudio realizado por Camargo y col. (1992), se detectaron resultados falsos positivos a AgESTc en pacientes con enfermedad de Chagas, esquistosomosis y malaria al ser evaluados con una prueba de ELISA para la confirmación del diagnóstico de toxocariosis. Por su parte Perteguer y col. (2003), demostraron una fuerte reacción cruzada en las pruebas de ELISA entre pacientes con LMV y pacientes con urticaria recidivante aguda producida por *Anisakis simplex*.

Por otro lado se han realizado estudios de reactividad cruzada entre *T. canis* y otros parásitos en modelos experimentales. Zevallos-Lescano y col. (2012), reportaron que en grupos de ratones infectados con diferentes parásitos como: *T. canis*, *A. suum*, *Taenia crassiceps*, *Schistosoma mansoni*, *Strongyloides venezuelensis* y *Toxoplasma gondii*, solo se registraron reacciones cruzadas entre los ratones infectados con *T. canis* y *A. suum*. Por otra parte Cuéllar y col. (1993), no encontraron reacciones cruzadas en ratones inoculados con huevos larvados o con extracto crudo de *T. leonina* cuando fueron evaluados por ELISA buscando reactividad contra AgESTc, de manera similar, no encontraron reactividad cruzada en ratones infectados con *A. suum* contra AgESTc, sin embargo si encontraron reactividad cruzada en todos los casos cuando se probó con antígenos somáticos de *T. canis*.

3.- JUSTIFICACIÓN.

Toxocara canis es uno de los nematodos que se ha encontrado con mayor frecuencia en los perros de México y muchos otros países, afecta principalmente a cachorros y ocasionalmente a perros adultos. Este parásito se transmite al hombre por la ingestión de los huevos larvados de *T. canis* provenientes de materia fecal de perros. Debido a la estrecha convivencia entre los niños con sus cachorros, existe una alta probabilidad de infección, por lo que se ha considerado un problema de salud pública en muchos países del mundo.

Los hospedadores paraténicos incluyendo al humano, solo alojan estadios larvarios de *T. canis* en sus tejidos, por lo que no eliminan fases evolutivas del parásito en la materia fecal, en consecuencia, no es posible el diagnóstico coproparasitológico. La forma habitual para el diagnóstico de la toxocariosis humana, es la acumulación de datos clínicos y la detección de anticuerpos específicos contra el parásito, sin embargo se ha demostrado que los antígenos de *T. canis* cruzan antigénicamente con los de otros ascaroideos. (Cuéllar y col., 1993; Zeballos-Lescano y col., 2012). A la fecha, son muy pocos los estudios de reactividad cruzada entre *T. canis* y *A. lumbricoides* el cual es un parásito común en México, Los datos que existen indican una probable reacción cruzada entre ellos que no ha sido evaluada en un modelo experimental en conejos. Por lo anterior, en este trabajo se determinaron y compararon las cinéticas de producción de anticuerpos contra AgESTc en conejos infectados con *T. canis*, *A. lumbricoides* y *A. suum* a fin de conocer la especificidad de los AgESTc en este modelo.

4.- HIPÓTESIS

“Si los antígenos de secreciones y excreciones de larvas de *T. canis* son específicos del parásito, entonces la cinética de anticuerpos contra estos antígenos, producida en conejos infectados con *T. canis*, será diferente a la que pueda ser producida por conejos infectados experimentalmente con otros ascaroideos”.

5.- OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Comparar, las cinéticas de anticuerpos séricos anti-antígenos de secreciones y excreciones de larvas de *T. canis*, producidos por conejos infectados experimentalmente con *T. canis*, *A. lumbricoides* y *A. summ.*

5.2 Objetivos particulares

- 1.- Infectar experimentalmente grupos de conejos con larvas de *T. canis*, *A. lumbricoides* y *A. suum*.
- 2.- Obtener antígenos de secreciones y excreciones de larvas de *T. canis*.
- 3.- Medir en diferentes periodos los niveles de anticuerpos contra AgESTc en los conejos infectados con diferentes ascaroideos.
- 4.- Comparar las cinéticas de producción de anticuerpos contra AgESTc de los conejos infectados con *T. canis* y los conejos infectados con otros ascaroideos.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.- LUGAR DE REALIZACIÓN

La investigación se desarrollo en el laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES-Cuautitlán, UNAM, campo 4, en el municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México. Los conejos fueron alojados en el área de corrales de Posgrado de la misma Facultad.

6.2.- ANIMALES EXPERIMENTALES

Se utilizaron 115 conejos machos de la raza Nueva Zelanda de 45 días de edad con un peso promedio de 2 kg. Antes del experimento los animales fueron adaptados a las condiciones experimentales y se mantuvieron en observación durante una semana. Cada conejo se colocó en una jaula individual de aproximadamente 1 X 0.6 m con comedero de tolva y bebedero automático, el área de alojamiento se acondicionó con cortinas de plástico y se monitoreó diariamente la temperatura y humedad con un termómetro ambiental. Los animales se mantuvieron con alimento balanceado comercial a razón del 4% del peso vivo y agua *ad libitum*.

6.3.- OBTENCIÓN DE LOS GUSANOS ADULTOS DE *Toxocara canis* y *Ascaris suum*.

En el caso de *T. canis*, se realizaron necropsias a 30 cachorros sacrificados en el antirrábico de Cuautitlán de Romero Rubio. El intestino delgado fue incidido y fueron recolectados gusanos adultos de *T. canis*. En el caso de *A. suum*, estos fueron obtenidos a partir de la inspección sanitaria de cerdos del Rastro de Tlalnepantla, Estado de México. Los gusanos obtenidos en cada caso se depositaron en un recipiente limpio y se lavaron varias veces con agua, y se colocaron en solución salina fisiológica para su transporte en refrigeración al laboratorio en donde fueron identificados y guardados hasta su utilización.

6.4.- OBTENCIÓN DE LOS GUSANOS ADULTOS DE *Ascaris lumbricoides*.

Los gusanos adultos de *A. lumbricoides* se obtuvieron en una zona endémica localizada en Teziutlán Puebla. Se localizaron a través del sistema de Salud comunitaria, niños con diagnóstico coproparasitológico de ascariasis, los cuáles, previo consentimiento de los padres, fueron desparasitados con piperazina. La totalidad de la materia fecal de cada niño fue recolectada las siguientes 24 horas. Se realizó una técnica macroscópica directa de cada

muestra y los gusanos adultos encontrados fueron lavados con agua, identificados y mantenidos en solución salina fisiológica en refrigeración para su transporte al laboratorio.

6.5.- OBTENCIÓN Y CULTIVO DE HUEVOS DE *T. canis*, *A. lumbricoides* y *A. suum*.

La obtención y cultivo de los huevos de ascaroideos se realizó modificando el método de Ohima, (1969). Se procesaron por separado hembras de cada especie en una caja de Petri con solución salina, se realizó una incisión en el tercio superior para obtener los úteros y posteriormente estos fueron incididos para obtener los huevos. Los restos de los parásitos fueron eliminados con un colador fino, los huevos fueron lavados y resuspendidos en una solución de formol al 2% e incubados a temperatura ambiente durante 28 días. La embrionación de los huevos fue monitoreada a partir de los 20 días.

6.6.- DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron 115 conejos divididos en tres grupos experimentales de 35 conejos cada uno y un grupo testigo de 10 conejos. Cada grupo experimental fue inoculado por sondeo esofágico con 5000 huevos larvados de *T. canis*, *A. lumbricoides* o *A. suum*. El grupo testigo solo recibió solución salina fisiológica. En los días 1, 3, 5, 10, 20, 30 y 60 pos-inoculación (p.i.) se sacrificaron humanitariamente cinco conejos de cada grupo experimental y se obtuvo por punción intracardiaca sangre sin anticoagulante, cada tubo fue identificado y posteriormente centrifugado para la obtención del suero. Para monitorear la infección, de los animales del día 3 p.i. se tomaron muestras de pulmón e hígado y se realizaron digestiones artificiales para la búsqueda de larvas, además se observaron las lesiones macroscópicas en los órganos más afectados. Cinco conejos del grupo testigo fueron sacrificados los días 1 y 60 del experimento. Por otro lado se obtuvieron AgESTc a partir del cultivo de larvas de la especie. Las cinéticas de producción de anticuerpos contra AgESTc de cada grupo experimental se determinaron a través de una ELISA indirecta.

6.7.-OBTENCIÓN DE LARVAS DE *T. canis*.

Se realizó siguiendo el método desarrollado por De Savigny, (1975) y modificado por Muñoz-Guzmán, (2010). Una vez larvados previa verificación de su viabilidad, los huevos de *T. canis* fueron lavados tres veces en solución salina fisiológica por medio de ciclos de centrifugación y resuspensión. Posteriormente se resuspendieron en una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 10 minutos y se lavaron 5 veces con medio de cultivo RPMI-

1640 bufereado con HEPES (pH de 7.2) con 1 % de Glucosa con L-Glutamina, Penicilina-Estreptomicina 100 U/ μ g/ml y Amfotericina 2.5 μ g/ml. Para producir la eclosión de los huevos, se sometieron a agitación con una mosca magnética por 25 minutos. La suspensión de larvas resultante se colocó en aparatos de Baermann estériles y se mantuvieron en una estufa con CO₂ al 5% a 37 °C por 24 horas. Las larvas recolectadas de los aparatos de Baermann fueron lavadas y resuspendidas en medio RPMI- 1640 y puestas en cajas de cultivo de 15 ml a una concentración de 10³ larvas/ml. Se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad por varias semanas.

6.8.- OBTENCIÓN DE AgESTc

El medio de cultivo de las cajas donde se mantuvieron las larvas de *T. canis* se colectó semanalmente en condiciones estériles dentro de una campana de flujo laminar, sedimentando primero a las larvas en un extremo de la caja por gravedad. Posteriormente, se restituyó con medio fresco a las cajas. El medio de cultivo de varias semanas con los AgESTc fue concentrado 100 veces con tubos de ultrafiltración Amicon con un poro de exclusión de 10 kD (Badley y col., 1987; Muñoz-Guzmán, 2010) haciendo varios ciclos de centrifugación de 5 minutos. La concentración proteica de los AgESTc fue determinada por el método de Bradford, (1976). La formulación del reactivo utilizado para esta prueba se encuentra en el apéndice 1.

6.9.- DESARROLLO DEL ELISA

La técnica de ELISA se realizó de acuerdo con el método descrito por Coligan y col. (1994), con modificaciones hechas por Muñoz-Guzmán y col. (2010). Todos los reactivos para esta prueba se encuentran descritos en el apéndice 2. Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos (Maxishorp, Nunc Labs.) las cuales fueron sensibilizadas con 50 μ l de AgESTc (1 μ g/ml) en buffer de carbonato-bicarbonato (pH 9.6) por 24 horas a 4°C. La sensibilización de la placa con el antígeno fue alternada como se muestra en la figura 1.

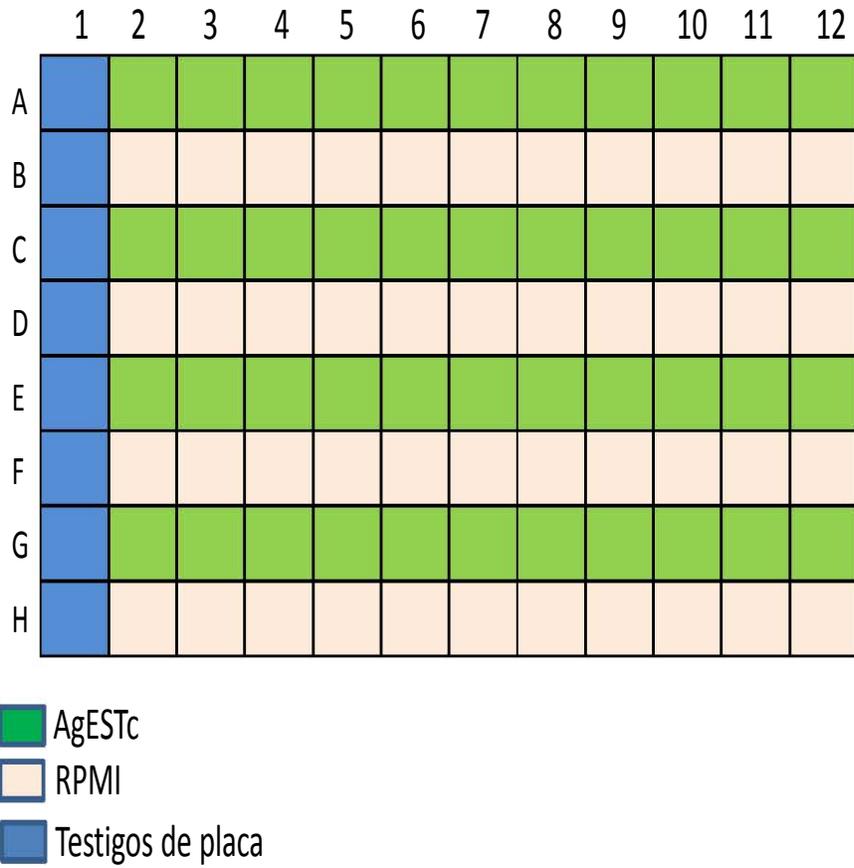


Figura1. Esquema de sensibilización de las placas de ELISA con el AgESTc.

Posteriormente las placas fueron lavadas tres veces con PBS por cinco minutos y una vez con agua destilada. El bloqueo de los sitios inespecíficos de las placas fue hecho con 150 µl de una solución al 3% de albúmina sérica bovina y 150 µl de buffer de carbonato-bicarbonato por 24 horas a 4 °C. Las placas se lavaron con PBS y tween 20 al 0.1% (PBS-T) por 5 minutos y una vez con agua destilada. Se colocaron por duplicado 50 µl de los sueros problema a una dilución de 1:100 y la placa se incubó a 37°C por dos horas. Concluido este tiempo se realizaron lavados con PBS-T y agua destilada para posteriormente agregar a los pozos 50 µl de un conjugado peroxidado anti-IgG (goat anti-rabbit IgG HRP, 403005, Sigma Labs.) a una dilución de 1:10,000. Nuevamente las placas se incubaron a 37°C por una hora. Después de realizar lavados con PBS-T y agua, las placas se revelaron con 100µl de solución desarrolladora de color (OPD 0.05%, y peróxido de hidrógeno 0.001% en solución reguladora de citratos), por 10 minutos en obscuridad y posteriormente la reacción fue detenida con 50 µl de ácido orto-fosfórico al 6%. Las placas se agitaron por 25 segundos y se leyeron a una longitud de 492 nm en un lector de ELISA Multiskan ASCENT. (Figura 2). En todos los sueros se probaron por duplicado pozos sin AgESTc, el valor en D.O. resultado de estos pozos fue sustraído al resultado de los pozos probados con el mismo suero en presencia de AgESTc para restar la reacción inespecífica (Muñoz-Guzmán y col., 2010). Los datos de todos los sueros fueron promediados y transformados a valores de porcentaje de absorbancia (%Abs) tomando como referencia un *pool* de todos los sueros de los conejos infectados con *T. canis* del día 60 p.i. mediante la siguiente fórmula (Álvarez-Guerrero y col., 2011).

$$\% \text{ Abs} = \frac{(\text{DO del suero problema}) (100)}{\text{DO del control positivo}}$$

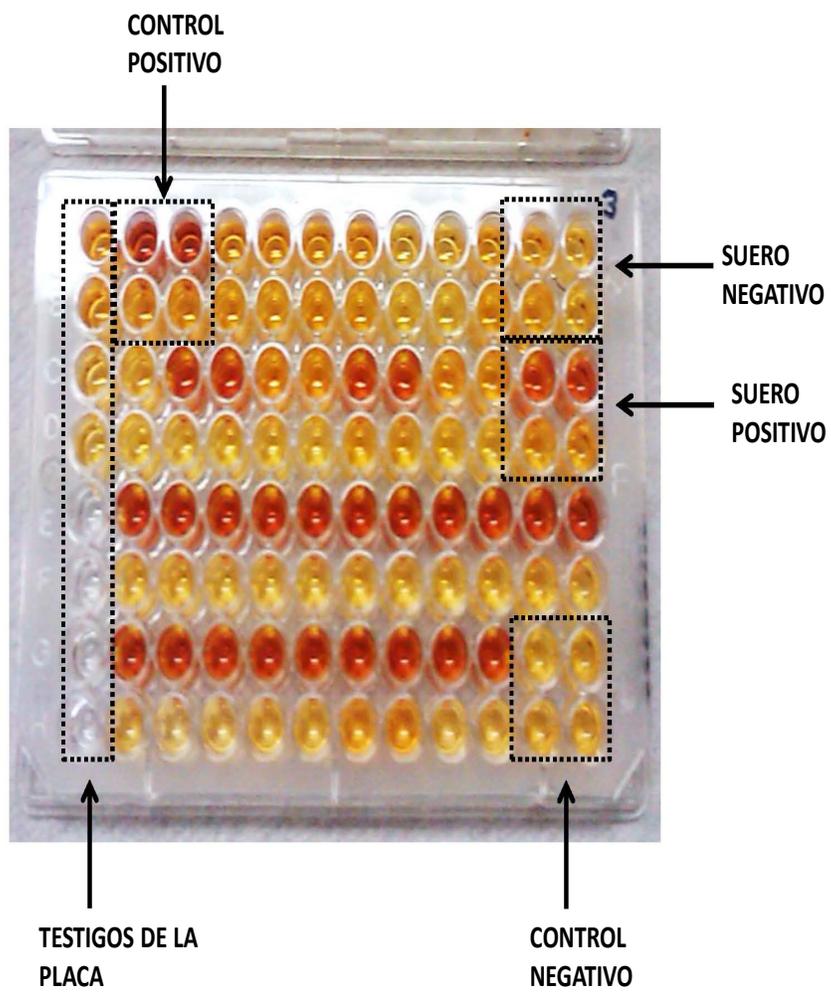


Figura 2.- Distribución de los testigos de la prueba, controles positivo y negativo y sueros problema, en una placa de ELISA para AgESTc.

6.10.- MONITOREO DE LA INFECCIÓN

Las muestras de hígado y pulmón colectadas de los conejos del día 3 p.i. fueron seccionadas finamente y colocados en un tubo de ensaye con una solución de pepsina al 1% en HCl al 1% (pH 1.7) durante 24 horas, posteriormente los digeridos fueron observados al microscopio para la detección de larvas. A la necropsia se inspeccionaron los órganos abdominales de todos los conejos para la búsqueda de lesiones macroscópicas.

6.11.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos de %Abs de todos los grupos fueron transformados con la fórmula $\log(n+100)$ para estabilizar la varianza. Los datos fueron analizados por ANDEVA para muestras repetidas utilizando un análisis *post-hoc* de Bonferroni, con nivel de confianza del 95% para establecer las diferencias entre medias. Se utilizó el software Statistica for Windows ver. 7.0.

7.- RESULTADOS

OBTENCIÓN DE AgESTc

Se obtuvieron un total de cinco cajas, cada una con 10 ml de medio de cultivo con una concentración de larvas de *T. canis* de 10^3 larvas/ml. De estas cajas se obtuvo sobrenadante por 12 semanas que después de ser concentrado, resultaron finalmente 10 ml de AgESTc con una concentración de proteína de 60 µg/ml.

CINÉTICA DE ANTICUERPOS CONTRA AgESTc EN CONEJOS INFECTADOS CON DIFERENTES ASCAROIDEOS.

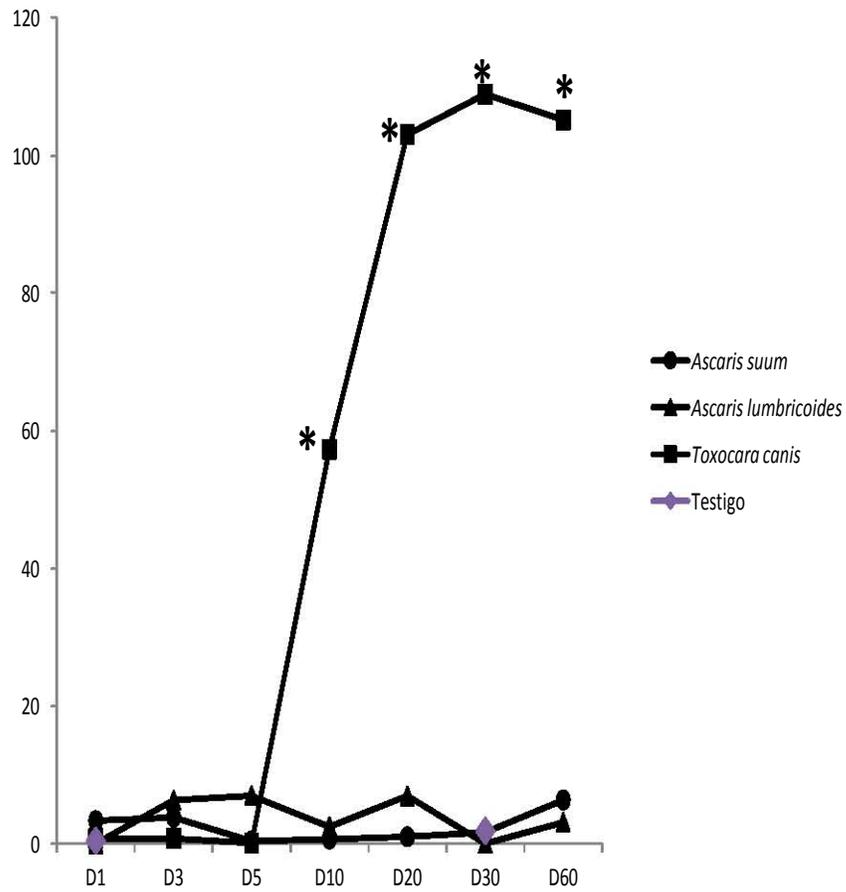
Las cinéticas de producción de anticuerpos contra AgESTc producidos por la infección experimental con *T. canis*, *A. lumbricoides* y *A. suum* en conejos, se presenta en la Figura 3.

Los conejos infectados con *T. canis* mostraron un incremento significativo de sus niveles de anticuerpos (medidos como %Abs) contra AgESTc a partir del día 10 p.i. en comparación al día 1 p.i. ($p < 0.05$). Posteriormente en estos mismos animales, los niveles siguieron incrementando y fueron diferentes ($p < 0.05$) a los del día 10 p.i. desde el día 20 p.i. hasta el día 60 p.i. (final del experimento). Los conejos infectados con *T. canis*, también mostraron mayores ($p < 0.05$) niveles de anticuerpos contra AgESTc que los conejos del grupo testigo, así como los conejos infectados con *A. lumbricoides* y los conejos infectados con *A. suum*. Esto se observó a partir del día 10 p.i. y hasta el final del experimento.

En los grupos de conejos infectados con *A. lumbricoides* y *A. suum*, solo se observaron incrementos no significativos de sus niveles de anticuerpos al final del experimento en relación al día 1 p.i. ($p > 0.05$). No se observaron diferencias significativas entre los niveles de anticuerpos contra AgESTc entre estos grupos y el grupo testigo ($p > 0.05$).

MONITOREO DE LA INFECCIÓN

Las muestras de pulmón e hígado de todos los conejos infectados con los tres ascaroideos, fueron positivas a la presencia de larvas en la digestión artificial. Las lesiones en los conejos infectados fueron observadas a partir del día 10 p.i. hasta el día 60 p.i. Las lesiones más evidentes fueron petequias, equimosis y sufusiones en pulmón e hígado y fueron más evidentes en el día 20 p.i. en los conejos infectados con *T. canis* (figura 4).



* Diferencia significativa con el resto de los grupos ($p < 0.05$)

Figura 3.- Cinéticas de producción de anticuerpos contra AgESTc de conejos infectados experimentalmente con *T. canis*, *A. lumbricoides*, *A. suum*, y conejos no infectados (testigos).

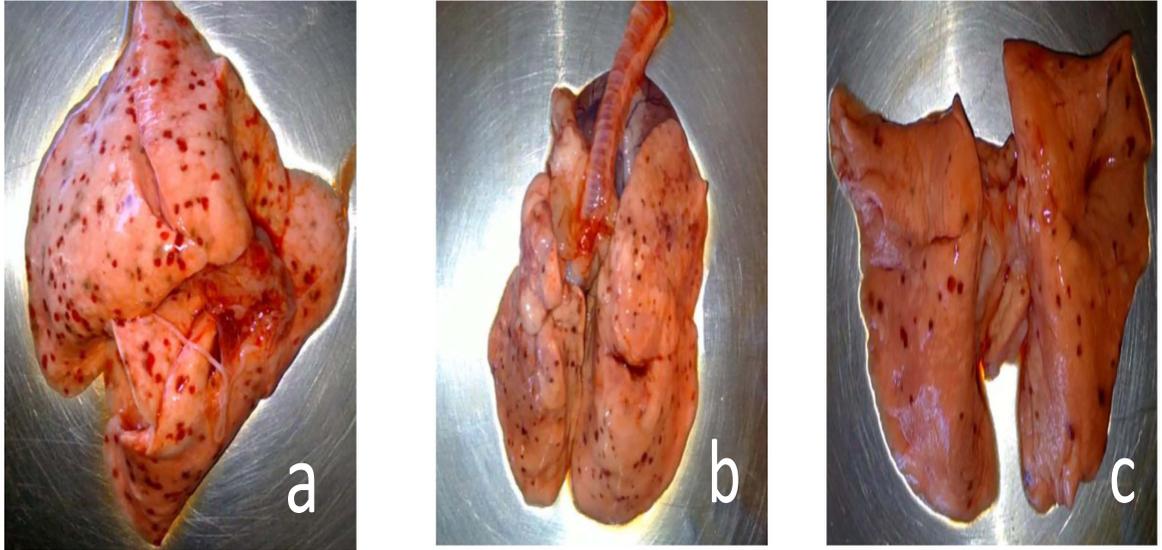


Figura 4.- Lesiones encontradas a los 20 días p.i. a la necropsia en pulmones de conejos infectados (a) *T. canis* (b) *A. lumbricoides* (c) *A. suum*.

8.- DISCUSIÓN

Para el estudio de la toxocariosis se han utilizado diferentes modelos experimentales como son primates (Watzke y col., 1983), ratones (Abo-Shehada and Herbert, 1984), cerdos (Sommerfelt y col., 2006), jerbos (Alba-Hurtado, 2000 y 1999) y conejos. Estos últimos han mostrado ser un buen modelo para el estudio de la toxocariosis ocular y sistémica además de que la respuesta inmune es fuerte y puede ser evaluada repetidamente, tanto a nivel sistémico como a nivel intraocular (Akiyama y col., 2010; Ishida y col., 2003). Los resultados encontrados en este trabajo mostraron que los conejos fueron susceptibles a la infección por los tres ascaroideos y que presentaron una buena respuesta por anticuerpos a nivel sistémico lo que confirma las ventajas de este modelo.

Las larvas de *T. canis* migran por diferentes tejidos de sus hospedadores, durante esta migración se monta una respuesta inmunológica contra sus antígenos, principalmente, los de secreción-excreción, estos antígenos han sido obtenidos *in vitro* por diferentes autores y se han utilizado para el desarrollo de pruebas de diagnóstico. Los AgESTc obtenidos en este trabajo tuvieron una concentración de 60 µg/ml, otros autores como De Savigny (1975), reportó una concentración proteica de sus AgESTc de aproximadamente 2 µg/ml mientras que Smith y col. (1982), reportaron una concentración de AgESTc de 200 µg/ml. Estas diferencias en las concentraciones proteicas de los AgESTc pueden ser debidas a que en los trabajos citados, se utilizaron diferentes medios de cultivo y diferentes cantidades totales de larvas en cultivo, además de que en los trabajos anteriores se concentró por medio de membranas de diálisis mientras que en el presente trabajo se utilizó un sistema Amicón de centrifugación a través de membranas de nitrocelulosa que optimiza el proceso.

En diferentes especies, la infección por *T. canis* produce una respuesta por anticuerpos principalmente de la clase IgG e IgE contra los AgESTc. En este trabajo, los conejos infectados con *T. canis* mostraron en su cinética de producción de anticuerpos, una elevación significativa de sus niveles de IgG a partir del día 10 p.i. (57 %Abs), posteriormente estos niveles siguieron aumentando hasta el día 20 p.i. (>100 %Abs) y se mantuvieron elevados durante todo el experimento. El pico de producción de IgG anti-AgESTc se observó el día 30 p.i. En otros estudios se han hecho observaciones similares. Morales y col. (2002), observaron

un incremento significativo de IgG anti-AgESTc entre el día 10 y 15 p.i. en conejos infectados con 5000 huevos larvados de *T. canis*, estabilizándose estos niveles el día 60 p.i. Akiyama y col. (2010), observaron también un incremento significativo de anticuerpos de la clase IgM e IgE anti-AgESTc en la segunda semana de infección en conejos infectados con *T. canis*. De la misma forma, Robertson y col. (1988), reportaron el incremento de inmunoglobulinas anti-AgESTc a partir del día 14 p.i. en conejos infectados con *T. canis*.

Todas las anteriores observaciones demuestran que la respuesta humoral montada hacia las larvas es fuertemente dirigida hacia sus AgESTc y que es posible hacer, bajo estas condiciones experimentales, una detección temprana de la infección, sin embargo, en infecciones naturales generalmente las cargas infectivas ingeridas pudieran ser menores (<5000 huevos larvados), por lo que es posible que en pacientes con cargas infectivas bajas esto no sea aplicable.

Se considera que los AgESTc tienen una mayor especificidad que los antígenos somáticos o totales (Magnaval y col., Roldán y col., 2010). Sin embargo, aun los AgESTc, presentan problemas de reacción cruzada con otros helmintos comunes de otros géneros como *Anisakis*, *Taenia* o *Ascaris* (Zeballos-Lescano y col., 2012). En el presente estudio, no se observó una reactividad cruzada significativa a los AgESTc en los conejos infectados con *A. lumbricoides* o con *A. suum*, aunque si se observó un aumento ($p>0.05$) de sus niveles de anticuerpos anti-AgESTc al final del experimento con respecto al inicio de la infección. Lo anterior sugiere que las larvas de *A. lumbricoides* y de *A. suum* no producen en sus antígenos de excreción-secreción demasiados epítomos compartidos con *T. canis* que puedan desencadenar una reacción evidente contra los AgESTc.

Los resultados encontrados por otros autores a este respecto, son contradictorios. Por un lado Cuéllar y col. (1993), no encontraron reacciones cruzadas en ratones inoculados con huevos larvados o con extracto crudo de *T. leonina* cuando fueron evaluados por ELISA buscando reactividad contra AgESTc, de manera similar, no encontraron reactividad cruzada en ratones infectados con *A. suum* contra los AgESTc, lo cual resulta consistente con los resultados de este estudio. Por otra parte, Sugane and Oshima, (1983), encontraron líneas de

identidad total entre sueros de ratones infectados con *T. canis* y sueros de ratones infectados con *A. suum* cuando fueron probados contra AgESTc en pruebas de precipitación. En otro estudio realizado por Zevallos-Lescano y col. (2012), se reportó que en grupos de ratones infectados con diferentes parásitos como *T. canis*, *A. suum*, *Strongyloides venezuelensis*, *Taenia crassiceps* y otros, solo se registraron reacciones cruzadas entre los ratones infectados con *T. canis* y *A. suum*. Las diferencias en los resultados entre los autores mencionados incluyendo los del presente estudio, pueden ser debidas a factores asociados al modelo experimental como son: cantidad de inóculo, viabilidad de los huevos y especie del modelo, o bien, a factores asociados a procesos de laboratorio como son: cantidad y pureza de los AgESTc o el refinamiento de la técnica de ELISA.

No fue posible la obtención de antígenos de excreción-secreción de *A. lumbricoides* y *A. suum*, debido principalmente a la falta de material biológico, por lo que no se evaluó la posible reactividad cruzada de los conejos infectados con *T. canis* hacia estos antígenos, también por medio de Western Blot se podría identificar con mayor precisión cuáles y cuantos antígenos son los que en realidad presentan cruce antigénico. Con los resultados de este estudio se demostró, que utilizando esta prueba, la reactividad cruzada entre *T. canis* y los otros ascaroideos estudiados es baja e indica la eficiencia de los AgESTc para el diagnóstico específico de la toxocariosis.

9.- CONCLUSIONES

- 1.- Los conejos como modelo experimental mostraron ser susceptibles a la infección por *T. canis*, *A. lumbricoides* y *A. suum*.
- 2.- Los niveles de IgG anti-AgESTc fueron significativamente mayores en los conejos infectados con *T. canis* que en los conejos infectados con *A. lumbricoides* y *A. suum*.
- 3.- La cinética de producción de IgG anti-AgESTc en los conejos infectados con *T. canis* mostró una respuesta progresiva a partir del día 10 p.i. que no fue observada en los conejos infectados con los otros ascaroideos.
- 4.- Los conejos infectados con *A. lumbricoides* y *A. suum* no mostraron incremento significativo de IgG anti-AgESTc con respecto a los conejos no infectados, por lo que no se mostró evidencia de reconocimiento cruzado de estos antígenos.

10.- BIBLIOGRAFÍA

1. - Abo-Shehada, M.N., Al-Zubaidy, B.A., Herbert, I.V. 1984. The migration of larval *Toxocara canis* in mice I. Migration through the intestine in primary infections. *Veterinary Parasitology*. 17, 65-73
- 2.- Alba-Hurtado, F. Evaluación de un modelo de Toxocariasis ocular y sistemática empleado en jerbos (*Meriones unguiculatus*). Tesis de doctorado.FES-Cuautitlán UNAM, 1999.
- 3.- Alba-Hurtado, F., Tortora, P.J.L., Tsutsumi, V., Ortega, M.G. 2000. Histopathological investigation of experimental ocular *Toxocariosis* in gerbils. *Int J Parasitol*. 30,143-147.
- 4.- Alba-Hurtado, F., Muñoz-Guzmán, M.A. 2011, *Parasitología Veterinaria (Helmintos)*. Color .México, 81-86.
- 5.- Alonso, J.M., López, M.A., Bojanich, M.V., Marull, J. 2004. Infección por *Toxocara canis* en población sana de un área subtropical de Argentina. *Parasitología Latinoamericana*. 59 ,1-2
- 6.- Álvarez-Guerrero, C., Muñoz-Guzmán, M.A., Buendía-Jiménez, J.A., Alba-Hurtado, F. 2011. *Gnathostoma binucleatum*: pathological and parasitological aspects in experimentally infected dogs. *Exp Parasitol*. 127, 84.
7. - Akiyama, T., Nobuo, O. 2010. Parasite-specific antibody profile in the aqueous humor of rabbits with ocular toxocariasis. *Parasitology international*. 112-120.
8. - Badley, J.L., Grieve, R.B., Bowman, D.D., Glickman, L.T., Rockey, J.H. 1987. Analysis of *Toxocara canis* larval excretory-secretory antigens: physicochemical characterization and antibody recognition. *Journal Parasitol* . 73, 593-600.
9. - Bowman, D.D., Grieve, M.M., Grieve, R.B. 1987. Circulating excretory-secretory antigen levels and specific antibody responses in mice infected with *Toxocara canis*. *Am J Trop Med Hyg*. 36, 75-82.
10. - Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Bioche* . 72, 248-254.
- 11.- Camargo, D. E., Nakamura, M.P., Vaz, A.J., Silva ,V. M ., Chieffi , P.P ., Melo, O.E. 1992. Standardization of dot-ELISA for the serological diagnosis of Toxocariasis and comparison of the assay with ELISA. *Rev. Inst.Med.trop Sao Paulo*. 34, 55-60

12. - Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Marguiles, D.H., Shevach, E.M. 1994. Current protocols in immunology. Identification of antigenic Determinants Using Synthetic Peptide combinatorial. Libraries. 2, 9.8.1-9.8.15.
13. - Coronel, M.D.L., Maldonado, V.R., Carreño, M.R., Gamboa, M.J. 2004. Síndrome hipereosinofílico como manifestación de larva Migrans visceral por *Toxocara canis*. Bol Med Hosp Infantil. Méx. 61.
14. - Cuellar, F., Guillen, J.L. 1995 . Cross-reactions of será from *Toxascaris leonina* and *Ascaris suum* infeted mice with *Toxocara canis*, *Toxascaris leonina* and *Ascaris suum* antigens. España. Journal Parasitology. 25, 731-739.
15. - De Savigny, D.H. 1975. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic test for visceral larva Migrans. Journal Parasitology. 61,781-782.
- 16.- Finesterer, J., Aver, H. 2007. *Neurotoxocarosis*. Revista del Instituto de medicina Tropical de Sao Paulo. 49, 5.
- 17.- Ishida, M.M.I., Elefant-Rubinsky,G., Ferreira, W.A;Shimizu-Hoshino,S., Vaz, A.J. 2003. Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. Acta tropica. 89, 73-84.
18. - Magnaval, J.F., Glickman, L.T., Dorchie, P., Morassin, B. 2001. Highlighs of human Toxocariasis. Journal Parasitology. 39, 1-11.
- 19.- Magnaval, J.F., Fabre, R., Maurieres,P., Charlet, J.P., Larrard, B. 1992. Evaluation of an Immunoenzymatic Assay Detecting Specific Anti-*Toxocara* Immunoglobulin E for Diagnosis and Posttreatment Follow-Up of human Toxocariasis. Journal of Clinical Microbiology.30, 2269-2274.
20. - Maizels, R.M., Savigny, D., Ogilvie, B.M. 1984. Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. Parasitol Immunol. 6, 23-24.
- 21.- Martinez, L.J.P. Detección del depósito de antígenos de excreción-secreción de larvas somáticas de *Toxocara canis* en los tejidos de jerbos con intención inducida. (tesis de maestría). México, FES-Cuautitlán. UNAM. 2004.
22. - Meghji, M., Maizels, R.M. 1986. Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. Mol Biochem Parasitol. 18, 155-170.

- 23.- Morales, R.O.L. Identificación de Antígenos de *Toxocara canis* mediante la Técnica de Western Blot en conejos infectados experimentalmente. (Tesis) Colombia. Universidad Nacional de Colombia, 1999.
- 24.- Muñoz-Guzman, M.A., Cuenca-Verde, C., Valdivia-Anda, G., Cuellar-Ordaz, J.A., Alba-Hurtado, F. 2012. Differential immune response between fundic and pyloric abomasal regions upon experimental ovine infection with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 185, 175-180.
25. - Muñoz-Guzmán, M.A., Navarro, V.E.R., Anda, V.G., Alba-Hurtado, F. 2010. The increase in seroprevalence to *Toxocara canis* in asthmatic children is related to cross-reaction with *Ascaris suum* antigens. *Allergol Immunopathol*. 38,115-121.
26. - Nichols, R.L. 1956. The etiology of visceral larva migrans. Diagnostic morphology of infective second-stage larvae. *Journal Parasitology*. 42, 349-362.
27. - Ohima, T. 1961. Standardization of techniques for infesting mice with *Toxocara canis* and observations on normal migration routes of the larva. *J. Parasitol*. 47,652-656 .
28. - Page, A.P., Hamilton, A.J., Maizels, R.M. 1992. Lectin binding to secretory structures, the cuticle and the surface coat of *Toxocara canis* infective larvae. *Exp. Parasitol*. 75, 72-86.
29. - Perteguer, M.J., Cuellar, C., Guillen, J.L., Aguila, C., Fenoy, S., Chivato, T., Laguna, R. 2003. Cross-reactivity between *Anisakis simplex* sensitization and visceral larva migrans by *Toxocara canis*. *Acta tropica*. 89, 85-89.
- 30.- Pérez, L.I. Evaluación del depósito de producto de secreción-excreción de larvas somáticas de *Toxocara canis* en las lesiones producidas por el parásito en animales con infección inducida tratados con selamectina. Tesis licenciatura. México. FES-Cuautitlán. UNAM, 2008.
- 31.- Quiroz, R.H. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. México. Limusa, 2003.
- 32.- Roldan, W., Espinoza, Y., Huapaya, P., Jimenez, S. 2010. Diagnóstico de la Toxocariosis Humana. *Rev Peru Med*. 27, 613-20.
- 33.- Robertson, B.D., Burkot, T.R., Gillespie, S.H., Kennedy, M.W., Wambai, Z., Maizels, R.M. 1988. Detection of circulating parasite antigen and specific antibody in *Toxocara canis* infections. *Inglaterra. Clin Exp Immunol*. 74,236-241.

34. - Sommerfelt, I.E., Santillan, G., Ribicich, M., Betti, A., De Torres, R. 2006. *Toxocara canis* infections in a pig model: immunological, haematological and blood biochemistry responses. *Vet Parasitol.* 80, 73-7.
35. - Smith, H.V., Quinn, R., Bruce, R., Girdwood, R.W. 1982. Development of the serological response in rabbits infected with *Toxocara canis* and *Toxocaris leonina*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 76, 89-94.
36. - Soulsby, E.J. *Parasitología y Enfermedades Parasitarias en los animales Domésticos*, 7 ed. México. Interamericana. 1986.
37. - Sugane, K., Oshima, T. 1983. Purification and characterization of excretory and secretory antigen of *Toxocara canis* larvae. *Immunology.* 50, 113.
38. - Watzke, R.C. 1983. Ocular *Toxocara canis* infection: clinical and experimental features. *Acad Ophthalmol.* 31,263-71.
39. - Zevallos, L., Nakhle, M.C., Ribeiro, C., Chieffi, P. 2012. IgG antibody responses in mice coinfecting with *Toxocara canis* and other helminths or protozoan parasites. *Rev, Inst. Med.* 54(3), 145-152.

APENDICES

Apéndice 1

Reactivos para Bradford:

No	Mg	BSA (1mg/ml)	PBS	
1	0	0	1000	Blanco
2	10	10	990	10µl/ml
3	20	20	980	20µl/ml
4	40	40	960	40µl/ml
5	60	60	940	60µl/ml
6	80	80	920	80µl/ml
7	100	100	900	100µl/ml

Apéndice 2

Reactivos para la Prueba de ELISA:

SOLUCIÓN BUFFER DE CARBONATO BICARBONATO (BCB)

- Carbonato de Sodio 1.5g 150mg
- Bicarbonato de Sodio 2.93g 298 mg
- Agua Desionizada c.b.p 1000ml 100ml

- PBS 10X 100 500
- Cloruro de Sodio 8.0 g 40g
- Cloruro de Potasio 0.2g 1g
- Fosfato Dibásico de Na 1.44g 7.2g
- Agua Desionizada c.b.p 100ml

SOLUCIÓN REGULADORA DE CITRATOS

- Acido cítrico 1M -----24.3ml
 - Fosfato Dibásico de Na 0.2M -----25.7ml
 - Agua Desionizada -----50ml
- 100ml

Ácido cítrico 1M-----2.1g c.b.p 100ml
Fosfato Dibásico de Na 0.2M-----5.36 c.b.p 100ml

Solución PBS 1X:

- Se colocan 50 ml PBS 10 X + 450 ml de agua destilada

Solución de lavado de PBSTween 20 (.1%):

- Mezclar 400ml de PBS 1X con 400 µl de Tween

Solución Bloqueo (Albúmina sérica Bovina al 3%)

- Pesar 0.9 g y se mezcla con 30ml de PBS 1X y se administraron 150µl/ pozo (cantidad para una placa de 96 pozos)

Solución Desarrolladora de color

- Pesar 5mg de OPD y se mezcla con 10ml de Solución Reguladora de Citratos+ 400µl del mismo como excedente+ 10µl de Peróxido de Hidrógeno (cantidad para una placa de 96 pozos)

Solución de Paro: Mezclar 0.6ml de Ácido Ortofosfórico y 5ml de agua destilada.