



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE UN COMPLEMENTO ALIMENTICIO FORMULADO A BASE DE  
ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 Y VITAMINA E SOBRE LA GENERACIÓN DE ESPECIES  
REACTIVAS DE OXÍGENO EN PERROS INFECTADOS CON *TOXOCARA CANIS***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

PRESENTA:

MVZ RAFAEL VILLALOBOS PEÑALOSA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DR. C MC MVZ YAZMÍN ALCALÁ CANTO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

COMITÉ TUTORAL:

PHD MSC MVZ María Esther Ortega Cerrilla

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

DR. C MC MVZ Carlos Gutiérrez Olvera

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

MÉXICO D.F. SEPTIEMBRE 2015



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.

ÍNDICE	Páginas
I.-Introducción	10
1.-Antecedentes	10
1.1 <i>Toxocara canis</i>	10
1.1.1 Características generales	10
1.1.2 Clasificación taxonómica	10
1.1.3 Morfología	11
1.1.3.1 Huevos	11
1.1.3.2 Larvas	12
1.1.3.3 Adultos	12
1.1.4 Ciclo de vida	13
1.1.4.1 En Hospederos definitivos	14
1.1.4.1.1 En cachorros	14
1.1.4.1.2 En perros adultos,	16
1.1.4.1.3 En hospederos paraténicos	16
1.1.5 Toxocariosis	17
1.1.5.1 Signos clínicos	18
1.1.5.2 Diagnóstico	19
1.1.5.3 Tratamiento y control	20
1.2 Nutrición	21
1.2.1 Nutraceuticos	21
1.2.1.1 Ácidos grasos omega-3	22
1.2.1.1.1 Fuentes naturales de omega-3	23

1.2.1.1.2 Funciones de omega-3	25
1.2.1.2 Antioxidantes	26
II.-Justificacion	28
III.-Hipótesis	28
IV.- Objetivo general	29
V.-Objetivo específico	29
VI.- Material y métodos	30
1.- Obtención de huevos embrionados de <i>Toxocara canis</i>	30
2.- Complemento nutricional	31
3.- Diseño experimental	32
4.- Muestras sanguíneas	33
5.- Determinación de la actividad antioxidante del plasma	33
6.- Determinación de malondialdehído (MDA)	34
7.- Determinación de la formación de nitritos	35
8.- Cuantificación de la carga parasitaria	36
VII.- Análisis estadístico	38
VIII.- Resultados	39
1.- Actividad antioxidante del plasma	39
2.- Determinación de malondialdehido en suero	41
3.- Determinación de nitritos en suero	43
4.- Coprología	44
IX.- Discusión	45
X.- Conclusiones	49

XI.- Recomendaciones	49
XII.- Referencias	51
Índice de figuras	
Figura 1. Microscopía óptica 40x, huevos de <i>T. canis</i> :	10
Figura 2. Microscopía óptica 10x, larva infectante de <i>T. canis</i> .	11
Figura 3. Adultos de <i>T. canis</i> .	12
Figura. 4 Ciclo de vida <i>T. Canis</i>	13
Figura.5. Ciclo biológico en cachorros	15
Figura 6. Ciclo biológico en perros adultos y hospederos paraténicos.	16
Figura 7. A) <i>T. canis</i> adulta en heces de perro	
B) <i>T. canis</i> adulta en vómito de perro	19
Figura 8. Clasificación de Ácidos grasos Omega-3	23
Figura 9. Diagrama de bloques. Secuencia de actividades	30
Figura10. Complemento alimenticio	31
Figura 11. Reacción para la determinacion antioxidante del plasma	34
Figura 12. Reacción para la determinacion del malondialdehido	35
Figura 13. Reacción para la determinacion de nitritos	35
Figura14. Técnica Mc master	38
Figura15 Actividad antioxidante en plasma	40
Figura 16. Determinación de malondaldehido en suero	41
Figura 17. Determinación de nitritos en suero	43
Figura 18. Excreción de huevos de <i>Toxocara canis</i>	44

## Indice de Tablas

Tabla 1. Actividad antioxidante en plasma	39
Tabla 2. Determinación de malondaldehido en suero	41
Tabla 3. Determinación de nitritos en suero	42
Tabla 4. Excreción de huevos por gramo de heces (HPG)	44

## Resumen

Objetivo: Evaluar la actividad nutracéutica de un complemento a base de ácidos grasos omega-3, vitamina E, vitamina A y vitamina D en perros infectados experimentalmente con *T. canis*.

Hipótesis: La adición de este complemento tiene un efecto antioxidante suficiente para evitar la presencia de estrés oxidativo en animales infectados con *Toxocara canis*.

Diseño: En este estudio se formaron cuatro grupos infectados experimentalmente con *Toxocara canis*. Dos de los grupos G1 y G2 se formaron por animales que consumieron una dieta complementada con 250 mg y 500 mg de la fórmula (que contiene ácidos grasos omega-3, vitamina E, vitamina A y vitamina D) la cual se administró dos veces por semana en el G1 y tres veces por semana en el G2. Al tercer grupo, Control (grupo control parasitado) no se le complementó la dieta. Un cuarto grupo Pirantel (grupo control desparasitado con pamoato de pirantel), que fungió como el control comercialmente tratado, tampoco recibió el complemento dietario. El estudio duró 77 días

Resultados: Se observó una mayor actividad antioxidante de manera significativa ( $P < 0.05$ ) en el plasma de los perros del grupo G2 en relación con los perros del G1. A partir del día 14 del estudio el grupo G1 presentó una actividad antioxidante significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) que los grupos Control y Pirantel. El grupo Pirantel presentó una actividad similar al grupo Control hasta el día 42 posterior a la desparasitación en el que presentó una mayor actividad antioxidante de manera significativa ( $P < 0.05$ ). Comparando al grupo Pirantel con el grupo G1, este presentó una actividad significativamente menor ( $P < 0.05$ ) hasta el día 42 en el que presentó un aumento significativo. Hubo un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) en la generación de malondialdehído (MDA), un marcador de la peroxidación lipídica, en suero sanguíneo en el grupo Control y el grupo Pirantel, comparados con los grupos G1 y G2 después del consumo de las dietas con altos y bajos contenidos del complemento alimenticio, que se mantuvieron

en una proporción significativamente baja. El grupo Pirantel presentó un crecimiento en la generación de MDA similar al grupo Control hasta el día 35 día que se realizó la desparasitación, y disminuyó significativamente el nivel de MDA. En la determinación de óxido nítrico (NO) los grupos G1 y G2 presentaron una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) en comparación con los grupos Control y Pirantel. Los grupos Control y Pirantel tuvieron un crecimiento sin cambios significativos entre ellos hasta el día 35 de la desparasitación, el grupo Pirantel disminuyó de manera drástica la generación de NO. No hubo cambio en la carga parasitaria en ninguno de los grupos parasitados.

Conclusiones: Este estudio indica que la peroxidación lipídica puede ser contrarrestada con antioxidantes como el complemento alimenticio utilizado, ya que la actividad antioxidante en los grupos G1 y G2 aumentó de manera significativa ( $P < 0.05$ ) sobre los niveles de MDA y NO. El grupo Control presentó una actividad antioxidante significativamente menor que los grupos G1 y G2, por lo que los niveles de MDA y NO fueron significativamente mayores ( $P < 0.05$ ) comparando con estos 2 grupos. El grupo Pirantel presentó las mismas tendencias que el grupo Control, hasta el día 35, día de la desparasitación, en el que disminuyeron drásticamente los niveles de MDA y NO, por lo que es recomendable en animales en edades de desparasitación ofrecer antioxidantes en su dieta ya que se demostró que los animales parasitados están propensos a sufrir estrés oxidativo. En cuanto a la carga parasitaria, el efecto de estos nutraceuticos es nulo.



## Abstract

**Objective:** Evaluate the nutraceutical activity of a dietary supplement containing omega-3, vitamins E, A and D in experimentally infected dogs with *T. canis*,

**Hypothesis:** The supplementation with vitamins E, A and E, have an antioxidant effect sufficient to prevent the presence of oxidative stress in animals supplemented with omega-3 fatty acid and infected with *Toxocara canis*.

**Design** In this study four groups experimentally infected with *Toxocara canis* were formed. Two of them, G1 and G2 groups were formed by animals that consumed a supplemented diet with 250 mg and 500 mg of a formula diet containing fatty acids omega-3 and vitamins E, A and D which is administered twice a week in the G1 and three times a week in group G2. Witness the third group (control group parasitized) with no supplemented diet. A fourth group Pyrantel (witness wormed group treated with pyrantel pamoate), who served as the untreated control commercially group, nor received the dietary supplement. The study lasted 77 days

**Results:** : Antioxidant activity increased significantly ( $P < 0.05$ ) was observed in the plasma of dogs in group G2 with respect G1 dogs. From day 14 of the study, the G1 group had a significantly higher antioxidant activity ( $P < 0.05$ ) than witness groups and Pyrantel. The Pyrantel group presented a similar activity to the witness group until day 42 after deworming in which he presented a significantly ( $P < 0.05$ ) higher antioxidant activity. Pyrantel group compared to the G1 group, had a significantly ( $P < 0.05$ ) lower activity to day 42 in which he presented a significant increase. There was a significant increase ( $P < 0.05$ ) of malondialdehyde (MDA), a marker of lipid peroxidation ( $P < 0.05$ ) in blood serum in the witness group and the Pyrantel group, compared to G1 and G2 after consumption diets with high and low levels of food supplement, which remained at a significantly lower proportion. The Pyrantel group showed an increase in the generation of MDA similar to the witness group until day 35

day deworming took place, and significantly decreased the level of MDA. In determining nitric oxide (NO), groups G1 and G2 decreased significantly ( $P < 0.05$ ) compared with witness groups and Pyrantel group. The witness and pyrantel groups had growth without significant changes between them until day 35, deworming day, pyrantel group decreased drastically NO generation. There was no change in the parasite load in any of the parasitized groups.

## **Conclusions**

This study indicates that lipid peroxidation may be countered by antioxidants like the dietary supplement used in this study. The antioxidant activity in the G1 and G2 groups increased significantly ( $P < 0.05$ ) on the levels of MDA and NO. The witness group had a significantly lower antioxidant activity than the G1 and G2 groups so that the levels of MDA and NO were significantly higher ( $P < 0.05$ ) compared to these 2 groups. The Pyrantel group presented the same trends as the witness group until day 35, deworming day, which dramatically decreased the levels of MDA and NO, which is recommended for ages deworming animals provide antioxidants in their diet since it was shown that animals parasitized are prone to oxidative stress. In the animals that were supplemented with omega-3 fatty acids for their properties in development, it is also recommended to provide vitamin E to counteract its negative effect as an oxidizing agent. As for the parasite load, the effect of these nutraceutical is zero.

# I.-Introducción

## 1.-Antecedentes

### 1.1 *Toxocara canis*

#### 1.1.1 Características generales

El *Toxocara canis* (Werner, 1958) es el helminto nematodo de distribución mundial, causante de la toxocariosis o toxocariasis, enfermedad parasitaria de mayor importancia médico-veterinaria. Este parásito tiene como hospedero definitivo a los perros y otros cánidos como el zorro, coyotes y lobos (principalmente afecta cachorros, ya que en adultos es asintomático); en México y en muchas otras partes del mundo es el helminto más comúnmente encontrado en perros (Cordero del Campillo M, *et al.*, 1999). Entre los hospederos paraténicos, se encuentran la mayoría de los mamíferos (hombre, cerdo, oveja, rata, ratón, etc.), aves y además algunos invertebrados como las lombrices de tierra y artrópodos como las pulgas (Alba-Hurtado, *et al.*, 2011). Esta helmintiasis es considerada una de las zoonosis con mayor distribución en el mundo debido a la amplia convivencia que ha generado el hombre con perros y gatos domésticos (Despommier D 2003).

#### 1.1.2 Clasificación taxonómica

Los miembros del género *Toxocara* son gusanos que presentan dimorfismo sexual, son de color blanquecino con forma cilíndrica y extremos puntiagudos, presentan tres labios y dos aletas cervicales en la parte posterior. Las especies pertenecientes a este género pueden ser distinguidas entre sí teniendo como base la morfología de los labios, las aletas cervicales, la longitud de las espículas y las características del aparato reproductor femenino.

**Reino Animalia**

**Phylum Nematoda**

**Orden Ascarididae**

**Superfamilia Ascaridoidea**

(Fuente: <http://insects.tamu.edu/research/collection/hallan/Nematoda/Family/Ascarididae.txt>)

### **1.1.3 Morfología**

#### **1.1.3.1 Huevos**

Son de forma oval, miden de 70 a 90  $\mu$  m aproximadamente y son de color blanquecino. Presentan tres capas dispuestas en forma concéntrica formando una cubierta gruesa con presencia de fasetas (Alba-Hurtado, *et al.*, 1994). Esta característica les confiere una gran resistencia a agentes físicos, químicos y mecánicos presentes en el ambiente. La primera capa es de origen albuminoso, enseguida y por debajo viene la capa quitinosa, y finalmente una capa lipóide formada por gránulos refringentes provenientes del citoplasma. Existe una cuarta capa formada por la adherencia de las secreciones uterinas del parásito al huevo. Al ser expulsado, el huevo entra en contacto con la bilis del tracto intestinal y esta última capa se endurece confiriéndole un color marrón.

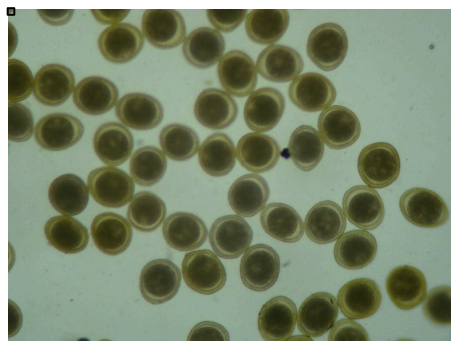


Figura1. Microscopía óptica10x huevos de *T. canis*:

### 1.1.3.2 Larvas

Las larvas de segundo estadio (LII) que se forman dentro del huevo son la fase infectante del parásito. No obstante, algunos autores mencionan que la fase infectante es la larva de tercer estadio (larva III), esto debido a la observación de que la larva sufre dos mudas dentro del huevo antes de volverse infectante (Brunaska, *et al.*, 1995). Son de color transparente, tienen una longitud aproximada de 400  $\mu\text{m}$  y un diámetro a nivel del esófago de 18 a 21  $\mu\text{m}$  (Nichols, 1956).

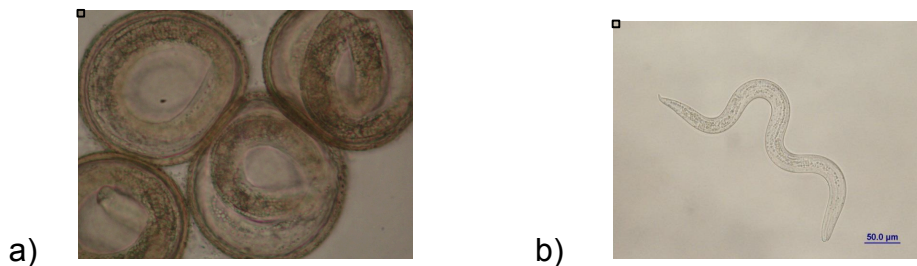
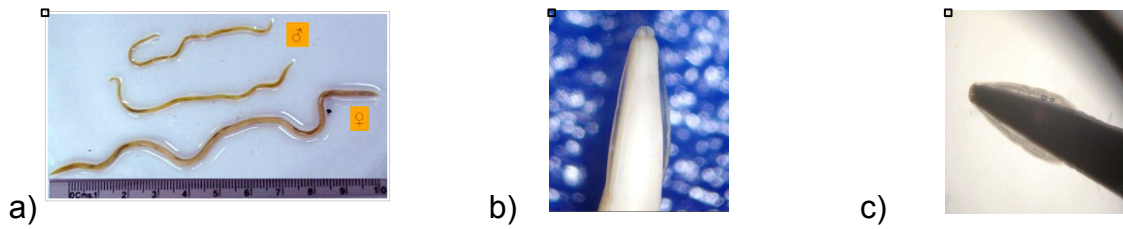


Figura 2. Microscopía óptica a) Larva II 40x, b) Larva III, 10x, larva infectante de *T. canis*.

### 1.1.3.3 Adultos

Son nematodos dimórficos de color blanquecino; los machos miden de 4 a 10 cm de longitud y las hembras llegan a medir hasta 18 cm. En la parte anterior presentan tres labios que no sobresalen del cuerpo. La superficie interna de los labios presenta una cresta dentada o pequeños dientes. Presenta aletas cervicales que le confieren la forma de “punta de flecha”. Los machos terminan en forma enroscada y en la porción ventral presentan dos espículas. En las hembras la vulva se encuentra en el primer tercio del cuerpo y pueden producir hasta 200,000 huevos al día por hembra grávida pero, estos huevos no están embrionados al momento de salir (Alba Hurtado, *et al.*, 2011).



**Figura 3. a) Adultos de *T. canis*. Fuente: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/larva-migrans-visceral.html>  
 b) 3 labios c) Aletas cervicales**

#### 1.1.4 Ciclo de vida

La relación existente entre este parásito y sus hospederos es extremadamente compleja. El ciclo de vida comienza con la eliminación de huevos no larvados en las heces de perros infectados y va a variar dependiendo del tipo de hospedero (definitivo o paraténico), de la edad del hospedero definitivo (cachorro o adulto) y del estado fisiológico (gestante o no gestante). En condiciones normales el desarrollo de la larva infectante requiere de 9 a 11 días a 24°C y de 3 a 5 días a 30°C en presencia de oxígeno y humedad relativa del 75% (Cordero del Campillo, *et al.*, 1999; Alba-Hurtado, 2011). El *T. canis* tiene un ciclo de vida directo. Tras la excreción de los huevos en las heces, las larvas se desarrollan en su interior hasta el estadio L-II en 10 a 15 días, los perros ingieren las larvas directamente, las larvas L-II eclosionan en el intestino, atraviesan la pared intestinal y emigran hasta los pulmones, aquí mudan a L-III y pasan a la tráquea, por tos o estornudos, son expulsadas al exterior o llegan a la boca y son ingeridas (emigración entero-hepato-cardio-pulmonar-tráqueo-esófago-gastrointestinal). Esta migración dura unos 10 días, Una vez ingerida, la larva L-III llega hasta el intestino y muda a L-IV y al estado adulto, En total dura 25 a 30 días tras la infección. Al poco tiempo empieza a producir huevos que se expulsarán por las heces.(Dwight DB, 2013).



**Figura 4. Ciclo de vida**

### 1.1.4.1 En hospederos definitivos

#### 1.1.4.1.1 En cachorros

Los cachorros menores de tres meses de edad son los principales portadores de las fases adultas del parásito. El contagio en ellos puede ser por distintas vías; transmisión materna (transplacentaria o lactogénica), o por la ingesta de huevos larvados (HL). La forma de infección más frecuentemente observada en los cachorros es la vía transplacentaria y se ha observado que las hembras con larvas somáticas pueden infectar a sus cachorros durante varias gestaciones consecutivas. (Soulsby EJ., 1983). Cuando los cachorros ingieren HL o larvas presentes en el calostro y la leche, estas atraviesan la pared intestinal entrando al flujo linfático y por vena porta llegan al hígado dos días después. Posteriormente viajan por vena cava al corazón derecho y por medio de la arteria pulmonar penetran a los pulmones (migración hepato-cardio-pulmonar). Después de permanecer un tiempo en los capilares

pulmonares las larvas pasan a los alveolos, migran hacia la faringe en donde son redegglutidas (migración traqueal) y se establecen en el estómago. Durante esta migración la larva sufre una muda y se transforma en LIII. Ya en el estómago, las larvas permanecen ahí un tiempo (aproximadamente hasta el día 10 post-infección) y pasan al duodeno donde ocurre la muda a LIV para convertirse en parásitos adultos entre los 19 y 27 días post-infección. 3 semanas antes del parto se movilizan las larvas y se presenta la infección vía transplacentaria en los cachorros, donde las larvas llegan al hígado fetal y se transforman en LIII. Cuando se da el nacimiento, las larvas se encuentran en los pulmones y permanecerán ahí durante la primera semana de vida. La muda a LIV se puede dar durante la primera o segunda semana de edad y hacia el final de esta semana, mudan LV para después convertirse en adultos. En este tipo de transmisión, la eliminación de huevos en heces da inicio a partir de los 15 días de edad. Por otra parte, si la transmisión fue por vía lactogénica o por ingesta de HL la eliminación de huevos sucede de 4 a 5 semanas post-infección (Quiroz R, 2003; Alba-Hurtado F, *et al.*, 2011).



Figura 5. Ciclo biológico en cachorros, transmisión transplacentaria y lactogénica.



#### **1.1.4.1.2 En perros adultos**

La infección puede darse por dos vías; Por la depredación de hospederos paraténicos (mamíferos (hombre, cerdo, oveja, rata, ratón, etc.), aves y además algunos invertebrados como las lombrices de tierra y artrópodos como las pulgas) con larvas somáticas enquistadas y/o por la ingesta de HL. Cuando hay ingesta de hospederos paraténicos las larvas se transforman en adultos sin la necesidad de realizar una migración somática y estos perros tienen la capacidad de eliminar huevos en un corto periodo de tiempo. Por otra parte, si la infección se da por medio de HL, las larvas eclosionan a nivel intestinal y atraviesan esta pared. Posteriormente realizan una migración hepato-cardio-pulmonar y regresan al corazón para distribuirse a los distintos órganos y tejidos (principalmente hígado, cerebro, pulmones, riñón y músculo) donde permanecerán como LII enquistadas (Fig. 6). En hembras gestantes las larvas somáticas sufren un proceso de reactivación el cual, al parecer es desencadenado por el aumento en la concentración de prolactina (PRL) (Overgaauw PA, *et al.*, 1998). Actualmente existen escasos reportes del papel de la PRL en la infección por *T. canis*, no obstante, un estudio realizado en un modelo murino sugiere que la reactivación y migración de las larvas somáticas hacia el útero y la glándula mamaria podrían estar desencadenados por un aumento en la concentración de esta hormona, favoreciendo la transmisión transplacentaria y lactogénica a la descendencia (Jin Z, *et al.*, 2008). Debido a lo anterior se podría estar dando un patrón de reactivación similar en los canidos, donde, el aumento en la concentración de PRL se presenta a partir del último tercio de gestación (Día 40-42).

#### **1.1.4.1.3 En hospederos paraténicos**

En los hospederos paraténicos sucede algo muy similar que en los perros adultos pero sin que exista desarrollo de parásitos adultos. Las larvas se van a establecer en los distintos

órganos y tejidos donde entran en un estado de latencia y permanecerán viables por largos periodos de tiempo esperando a ser ingeridas por un hospedero definitivo (Fig. 6), de no ser ingeridas las larvas mueren y se calcifican (Quiroz R, 2003; Alba-Hurtado F, *et al.*, 2011).

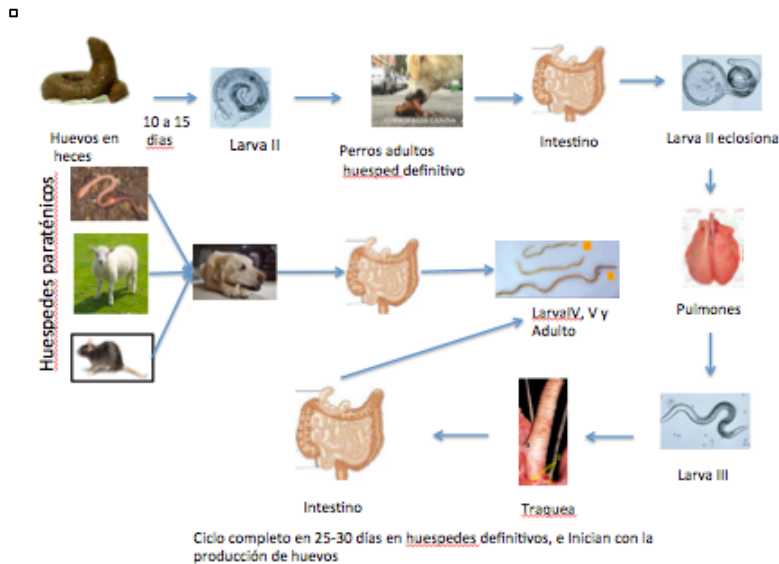


Figura 6. Ciclo biológico en perros adultos y hospederos paraténicos.

### 1.1.5 Toxocariasis

La toxocariasis es una infección zoonótica cosmopolita producida por *T. canis*. En los cachorros esta enfermedad puede ocasionar manifestaciones clínicas digestivas o nerviosas y ocasionalmente la muerte.

La presencia de los parásitos adultos en el lumen intestinal produce irritación con una consecuente disminución en la absorción de nutrientes, esto aunado al hecho de que los parásitos adultos se alimentan del contenido intestinal, puede generar diferentes grados de desnutrición, presencia de diarrea, vómito y en casos severos obstrucción intestinal que conlleva a la muerte del cachorro (Quiroz R, 2003).

La migración de las larvas (tanto en perros como en hospederos paraténicos) ejerce una acción traumática y las lesiones van a depender del número de larvas y del órgano afectado. En los cachorros con infección prenatal y lactogénica las lesiones producidas por el paso de las larvas por el hígado y los pulmones puede provocarles la muerte (Alba-Hurtado F, *et al.*, 2011).

Los productos de secreción-excreción de las larvas somáticas, tienen un efecto enzimático sobre los tejidos para facilitar su migración, además de generar granulomas con infiltrado eosinofílico que pueden generar una reacción anafiláctica (Bardón IM, 1992).

#### **1.1.5.1 Signos clínicos en perros**

Los animales con infecciones leves no presentan manifestaciones clínicas aparentes. En infecciones severas, los cachorros son los que principalmente presentan signos clínicos debido a la migración de las larvas por los distintos órganos y tejidos. A su paso por los pulmones pueden generar signos respiratorios como tos, taquipnea y flujo nasal. También se pueden observar signos nerviosos como incoordinación y convulsiones generados por el paso de las larvas por el sistema nervioso central. Los gusanos adultos en el intestino producen inflamación intestinal, pérdida de peso, distensión abdominal, diarrea, vómito (que puede contener parásitos) y en infestaciones masivas puede haber peritonitis causada por la ruptura del intestino (Cordero del Campillo M, *et al.*, 1999).

### 1.1.5.2 Diagnóstico.

Para el diagnóstico se debe tomar en cuenta la edad de los cánidos ya que los cachorros son los más afectados. La presencia de signos clínicos sugerentes de daño pulmonar, el grado de dilatación abdominal, la presencia de signos nerviosos y en algunas ocasiones la presencia de gusanos adultos en el vómito o las heces nos sirven como métodos de diagnóstico (Fig. 7). Técnicas coproparasitológicas como Flotación, Faust o McMaster se utilizan para la detección de huevos en las heces, son técnicas fáciles de realizar y de bajo costo sin embargo, esto solo se puede realizar cuando existe presencia de gusanos adultos en el intestino y la ausencia de los huevos en las heces no excluye de la presencia de larvas somáticas (Overgaauw PA, *et al.*.,1997; Alba-Hurtado F, *et al.*, 2011). Para diagnosticar la presencia de larvas somáticas se utilizan técnicas inmunológicas como ELISA y Western Blot.



Figura 7. a) *T. canis* adulta en heces de perro ,

b) *T. canis* adulta en vómito de perro

c) Huevos de *T. Canis* microscopía óptica 10x

### 1.1.5.3 Tratamiento y control

Es muy conveniente evitar que los perros ingieran tierra u otra materia contaminada con huevos, pero muy a menudo esto es muy difícil de lograr. En criaderos y pensiones de perros es esencial cuidar la higiene y desinfección regular de las jaulas y locales donde están los animales, eliminar diariamente los excrementos, etc.

A los cachorros se les tiene que desparasitar a partir de las 3 semanas, cada 2 a 3 semanas hasta los tres meses, al mismo tiempo se trata a las madres. También se desparasita a los perros adultos, aunque no haya crías, según la situación epidemiológica local y a las condiciones particulares en las que vive la mascota (apartamento, casa con jardín, entorno rural, si vive en la costa, etc.).

#### Desparasitantes

Los desparasitantes efectivos contra *Toxocara canis* son los benzimidazoles (p.ej. albendazol, febantel, fenbendazol), el levamisol y los endectocidas (p.ej. ivermectina, milbemicina oxima, moxidectina, selamectina) y la emodepsida.

Las tetrahidropirimidinas (pirantel, morantel) y los derivados de la piperazina tienen un espectro menor pero también son eficaces contra los ascáridos.

La mayoría están disponibles en formulaciones:

- Orales sólidas: tabletas, comprimidos, etc.
- Orales líquidas: suspensiones, soluciones, etc.
- Inyectables: sobre todo ivermectina y levamisol

Algunos de estos compuestos no son eficaces contra las larvas migratorias. Por ello a menudo se recomienda repetir el tratamiento a las 2 a 4 semanas, pues se supone que en

ese tiempo la mayoría de las larvas en estado de letargo se habrán reactivado y vuelto susceptibles al antihelmíntico (Dwight BD, 2013).

## **1.2 Nutrición.**

La nutrición es un elemento indispensable en el desarrollo y el funcionamiento adecuado de todo organismo vivo. Un animal mal nutrido es más susceptible a enfermedades. Entre los nutrimentos que se han identificado que tienen un efecto nutracéutico importante, son los ácidos grasos omega-3, que son precursores de eicosanoides, moléculas que intervienen en la inflamación, pero al ser ácidos grasos poliinsaturados tienden a oxidarse y a producir especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés reactive oxygen species) y para esto existen elementos antioxidantes, que pueden ser endógenos (generados en el organismo) y exógenos (incorporados a través de la dieta) como la vitamina E, que pueden ser utilizadas para evitar que se presente el estrés oxidante. Existen muchos alimentos que utilizan ácidos grasos omega-3 que es un elemento oxidable, y no adicionan ingredientes antioxidantes, lo que puede provocar que se presente el estrés oxidante (Hand MS, *et al.* 2004).

### **1.2.1 Nutracéuticos**

Dentro de la nutrición existen ingredientes conocidos como nutracéuticos que son todos aquellos nutrimentos que se consideran como poseedores de un efecto benéfico específico sobre la salud, entre ellos están los ácidos grasos omega-3 y los antioxidantes como la vitamina E

### 1.2.1.1 Ácidos grasos omega-3

Los ácidos grasos son las unidades básicas de los lípidos saponificables que están compuestos por cadenas de carbonos que contiene desde 2 a 24 o más carbonos con un grupo de ácido carboxílico en un extremo y un grupo metilo en el lado opuesto. Los ácidos grasos no esterificados que contienen de 14 a 24 carbonos se clasifican como de cadena larga, los de 8 a 12 como de cadena mediana y los de 2 a 6, de cadena corta.

Los ácidos grasos con el primer doble enlace entre los carbonos 3 y 4, corresponden a la familia omega 3.

Los mamíferos no tienen capacidad de sintetizar omega-3 y omega-6, por lo que es necesario consumirlas en los alimentos. Los mamíferos tienen capacidad de sintetizar ácidos grasos saturados y de la serie 9 hasta de 18 carbonos. Pueden elongar o desaturar los ácidos grasos recién sintetizados o los provenientes de la dieta mediante enzimas específicas para ciertos carbonos de la cadena de carbonos, pero no pueden desaturar los carbonos ubicados entre el n-1 y el n-3, ni los enlaces dobles del n-6 o n-9. Como estos sistemas enzimáticos son muy específicos, los ácidos grasos insaturados no pueden convertirse entre familias, por ejemplo omega-6 u omega-9 a omega-3. Además debido a la especificidad y a las limitaciones del metabolismo.

Los ácidos grasos tienen funciones importantes en los organismos, la familia de ácidos grasos omega-6 es necesaria para el crecimiento, la reproducción, y como precursor de la síntesis de eicosanoides y prostaglandinas. Los miembros de la familia omega-3, (los ácidos  $\alpha$ -linolénico (18:3n-3), eicosapentaenoico (20:5n-3) (EPA) y docosahexaenoico (22:6n-3) (DHA)), son necesarios para la función cerebral y retiniana, ambas familias contribuyen a la fluidez de la membrana celular y a la salud de la piel (Hand MS, *et al.*, 2000) .

Los ácidos grasos omega 3 se encuentran en alta proporción en los tejidos de ciertos pescados (por regla general pescado azul), y en algunas fuentes vegetales como las semillas

de lino, la semilla de chía, el sachá inchi, los cáñamos y las nueces. Algunas fuentes de omega-3 pueden tener otros tipos, como los omega-6. A los ácidos grasos inicialmente se les denominó vitamina F hasta que determinaciones analíticas más precisas hicieron ver que realmente formaban parte de los ácidos grasos (Nettleton JA, 1991).

Figura 8. Clasificación de ácidos grasos Omega-3

NOMBRE COMÚN	NOMBRE DEL LÍPIDO	NOMBRE QUÍMICO
Ácido alfa linolénico (ALA)	18:3 (n-3)	Octadeca-9,12,15-trienoico
Ácido estearidónico	18:4 (n-3)	Octadeca-6,9,12,15-tetraenoico
Ácido eicosatetraenoico	20:4 (n-3)	Eicosa-8,11,14,17-tetraenoico
Ácido eicosapentaenoico (EPA)	20:5 (n-3)	Eicosa-5,8,11,14,17-pentaenoico
Ácido docosapentaenoico	22:5 (n-3)	Docosa-7,10,13,16,19-pentaenoico
Ácido docosahexaenóico (DHA)	22:6 (n-3)	Docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenóico

(Hand MS, *et al.*, 2000)

#### 1.2.1.1.1 Fuentes naturales de Omega-3

En términos generales, se distinguen dos tipos de aceites según su origen: los obtenidos a partir de semillas y/o frutos de origen terrestre y los obtenidos a partir de vegetales (algas) y animales (peces, crustáceos, moluscos y mamíferos) de origen marino y peces de agua fría.



Ambos tipos de aceites están igualmente constituidos por mezclas de triglicéridos cuyos principales componentes son los ácidos grasos.

Las fuentes más ricas en omega-3 son los peces de agua fría, incluyendo el salmón, pez que supuestamente tendría el más bajo nivel de contaminación. Hay otras fuentes importantes como pescados azules, entre estos está la sardina que tiene 1:7 entre omega-6 y omega-3.

La mejor alternativa en el mundo vegetal está en las semillas de *Salvia sclarea*. El aceite producido por éstas contiene cerca del 50% de omega-3 tipo ALA y omega-9. A diferencia de otras alternativas vegetales, es sumamente estable. Otra alternativa son las semillas de Cárcamo ya que mantiene un porcentaje perfecto de omega-6 y omega-3, 3 partes de omega-6 y una parte de omega-3 (3/1). Otras alternativas en el mundo vegetal son la chía o salvia hispánica, el lino y las semillas de calabaza. Una de las fuentes vegetales con mayor proporción de omega-3 (48%) se encuentra en el Sacha Inch, una variedad de maní de origen amazónico que se encuentra principalmente en Perú.

En cuanto a los ácidos grasos omega-3 obtenidos de origen animal, está menos desequilibrada la proporción en carne de animales criados con pasto que los criados con grano. En el ganado alimentado con pasto la proporción de omega-3 es mucho mayor que en el alimentado con grano (Murray RK, *et al.*, 1992; Cahill JP., 2003; Valenzuela AB, *et al.*, 2009)

#### 1.2.1.1.2 Funciones de los ácidos grasos omega-3

El organismo necesita los ácidos grasos omega-3 para funcionar correctamente. Entre las principales funciones del ácido linolénico se encuentran las siguientes:

- 1.- La formación de las membranas celulares.
- 2.- La formación de hormonas eicosanoides.
- 3.- La correcta formación de la retina.
- 4.- El funcionamiento de las neuronas y las transmisiones químicas.
- 5.- Inmunomodulación. Esta se refiere a la supresión o potencialización de la respuesta inmune, La supresión funcional es necesaria en pacientes con procesos inflamatorios exagerados o enfermedad mediada por procesos inmunológicos.
- 6.-Propiedades antiinflamatorias: Se ha comprobado que los ácidos grasos omega--3 tienen propiedades antiinflamatorias en enfermedades de las articulaciones. Por ello pueden ser muy adecuados para disminuir la inflamación y aliviar el dolor en enfermedades como la artritis reumatoide, psoriasis y lupus. También se ha investigado la participación de los ácidos grasos omega-3 en problemas inflamatorios cutáneos, y en enfermedades inflamatorias intestinales, como en la enfermedad de Crohn (Murray RK, *et al.*, 1992; Cahill JP, 2003).

En estudios recientes se ha demostrado que los ácidos grasos EPA y DHA, dos de las ácidos grasos omega-3 mas comunes, causan la producción de ROS (*reactive oxygen species*) , produciendo apoptosis en células del organismo (Fukui M, *et al.*, 2013)

Las mitocondrias son los principales organelos en la producción de ROS. La sobreproducción de ROS induce el daño oxidativo en macromoléculas, incluyendo lípidos, y puede dañar la estructura y función de las membranas celulares. El aumento en el consumo de omega-3 y el

consecuente aumento de estos en las membranas celulares puede ser desventajoso para la salud, ya que lleva a la producción de ROS. El control mitocondrial de la peroxidación lipídica es uno de los mecanismos que protege del daño oxidativo (Al-Gubory KH, 2012, 2014; Turner D, *et al* 2007, 2009)

### **1.2.1.2 Antioxidantes**

Un antioxidante es una sustancia capaz de retrasar o de inhibir la oxidación de un sustrato, así los antioxidantes protegen a los sistemas biológicos frente a los efectos perniciosos de las reacciones que causan oxidación excesiva. La presencia de antioxidantes en el organismo es una necesidad frente a su inevitable utilización del oxígeno y la consecuente producción de radicales libres con alta capacidad oxidante, la cual deteriora todas las biomoléculas. Dado que las ROS y los radicales libres no sólo son dañinas para las células, sino que también son necesarias para muchos de los procesos que llevan a cabo, por lo que resulta imprescindible un balance entre oxidantes y defensas antioxidantes para el adecuado mantenimiento de la salud. Cuando se produce un desequilibrio con mayores cantidades de ROS que de antioxidantes, esto se denomina estrés oxidante, lo que nos lleva al envejecimiento y a situaciones patológicas.

Las células del sistema inmune requieren generar ciertas cantidades de ROS para realizar muchas de sus funciones defensivas frente a infecciones y enfermedades como el cáncer, por lo que en ellas el equilibrio oxidante/antioxidante es fundamental.

Los antioxidantes pueden ser endógenos y exógenos. En los endógenos tenemos toda una serie de enzimas como superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y las tioredoxinas, además de antioxidantes no enzimáticos como el glutatión.

Entre los antioxidantes exógenos tenemos la vitamina C o ácido ascórbico, la vitamina E o tocoferol, los polifenoles (dentro de ellos los fenólicos y los flavonoides) y los carotenoides.

Los radicales libres son aquellas especies químicas que pueden existir por si mismos y poseen uno o mas electrones desapareados, esta situación les confiere una alta capacidad de reacción, prácticamente con cualquier compuesto al que puede quitar un electrón que le falta, y por tanto, oxidarlo, lo que también condiciona su corta existencia. Las ROS se producen inevitablemente al ser utilizado el oxígeno por las células del organismo.

Las distintas ROS pueden participar en diversos tipos de reacciones en las que pueden sufrir procesos de oxidación o reducción. De menor a mayor grado de reducción son: El anión superóxido ( $O_2^-$ ) que es un agente oxidante muy reactivo con el agua. El peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$ . El radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) que es el más reactivo, aceptando un electrón más, el radical ( $OH^\cdot$ ) da lugar a una molécula de agua. También pertenecen a las ROS el óxido nítrico (NO) y el ácido nitroso ( $HONO_2$ .) Al ser especies reactivas las ROS pueden producir efectos dañinos sobre las células, como daños en el ADN, en los ácidos grasos poliinsaturados y en los aminoácidos

Para evitar estos daños, las células tienen varios mecanismos de eliminación y transformación de las ROS como como son los antioxidantes endógenos y exógenos que se encargan de reducir las ROS. En los peroxisomas del hígado el  $H_2O_2$  participa con la catalasa en funciones de detoxificación realizando la oxidación de ciertas sustancias como alcoholes, ácido fórmico o fenoles.

La alteración del balance en los mecanismos de producción y eliminación de las ROS, origina el estado de estrés oxidante en la célula. Además de provocar daños celulares, el estrés oxidante influye en la regulación de ciertos genes involucrados en la aceleración de los procesos de envejecimiento en la activación de rutas de apoptosis y en la activación de

distintas respuestas de defensa frente al estrés oxidante. (Wilhem HT,2002; Sierra MPS *et al.*, 2004; Ohta Y,*et al.*, 2015; Ekaidem JS, *et al.*, 2014; Neubauer O, *et al.*, 2015; Cobb CA, *et al.*,2015; Abdel Ghany EA, *et al.*.,2015; Crespo san Juan J, *et al.*,2015; Zeng W, *et al.*, 2015; Fogliano V, *et al.*, 1999; Green LC, *et al.*,1982; Sargi SC, *et al.*, 2012; Zicker SC, *et al.*,2006)

## II.-Justificación

La presencia de parásitos en el intestino provocan un aumento en la producción de ROS, al igual que la presencia de ácidos grasos omega-3 en el organismo, por ello este estudio se realizó para considerar el efecto antioxidante del complemento alimenticio en perros infectados con *T. canis* y complementados en su dieta con ácidos grasos omega-3. La mayoría de los alimentos comerciales para cachorros contienen ácidos grasos omega-3 y en las primeras etapas de vida los perros se encuentran parasitados con *T. canis*, por lo que consideramos importante realizar un estudio sobre los efectos de este complemento alimenticio, midiendo su efecto antioxidante. No existen estudios del efecto de los elementos que forman este complemento en perros parasitados.

## III.-Hipótesis

La adición del complemento alimenticio (vitaminas E, A y D) tiene un efecto antioxidante suficiente para evitar la presencia de estrés oxidante en animales complementados con ácido graso omega-3 e infectados con *Toxocara canis* .

## IV.-Objetivo general

Evaluar la actividad nutracéutica del complemento alimenticio (ácidos grasos omega-3, vitaminas E, A y D) en perros infectados experimentalmente con *T. canis*, .

## V.- Objetivos específicos

1. Determinar el efecto antioxidante del complemento en perros infectados experimentalmente con huevos larvados de *Toxocara canis* mediante la medición de la generación de ROS y la capacidad antioxidante del plasma.
2. Medir el efecto oxidativo producido por la estimulación parasitaria y por la complementación de omega-3.
3. Cuantificar la carga parasitaria de los perros infectados experimentalmente para evaluar si el complemento alimenticio induce una actividad antihelmíntica.

## VI.- Material y métodos

Diagrama de bloques. Secuencia de actividades

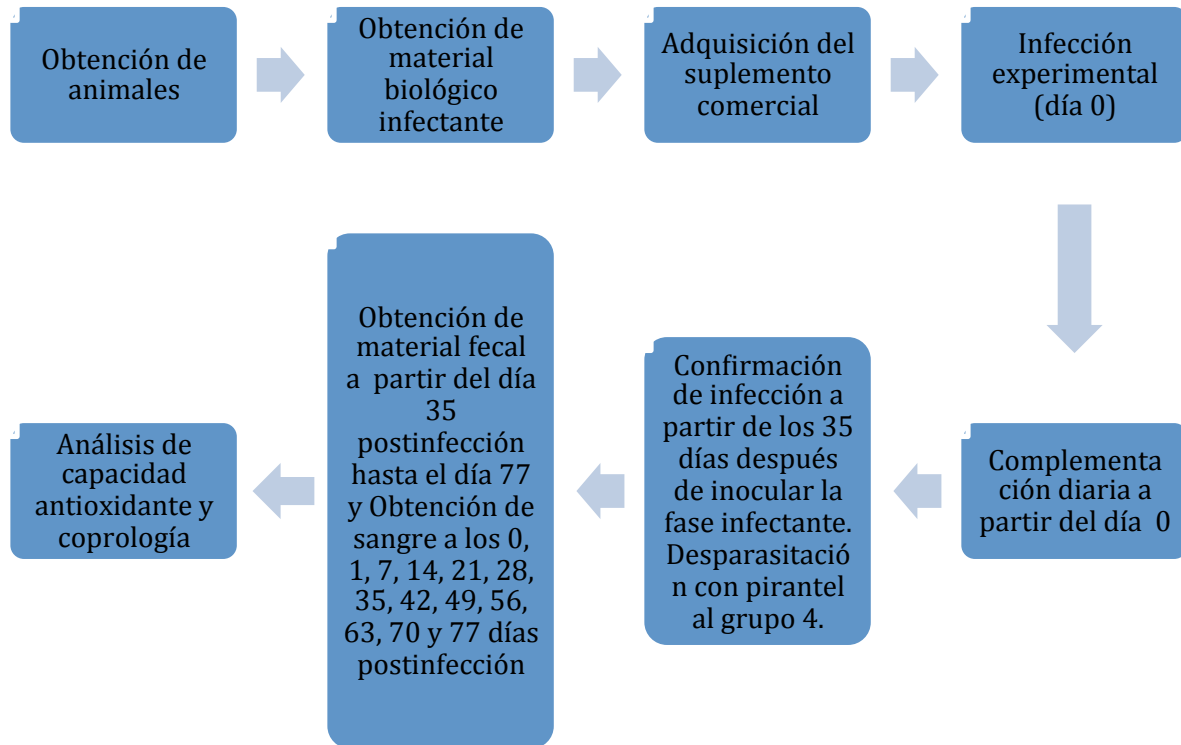


Figura 9. Diagrama de bloques. Secuencia de actividades

### 1.-Obtención de huevos larvados de *Toxocara canis*

Se obtuvieron adultos de *T. canis* del intestino delgado de perros eutanasiados en el centro de control canino y felino de Tlalpan. Los huevos fertilizados fueron aislados de acuerdo con la metodología descrita por Rodríguez-Caballero et al., 2007. Los parásitos hembras se lavaron con solución salina fosfatada amortiguada (PBS) suplementada con formaldehído al 1.0% utilizando un pincel. Los huevos se cultivaron en PBS, 2% de glucosa suplementada con 1.0% de plasma. Los huevos se cosecharon cada 25 horas y se lavaron con PBS para eliminar el plasma. Una vez transcurridos 30 días de incubación, los huevos se observaron

para verificar la viabilidad y el desarrollo embrionario; se realizaron lavados por centrifugación y suspensión en solución salina estéril, un lavado en una solución de hipoclorito de sodio al 1% por diez minutos y por último cuatro lavados asépticos en campana de flujo laminar con un medio estéril RPMI 1640, amortiguado con ácido hidroxietil piperazina etanesulfónica (HEPES) solución buffer que mantiene el pH a 7.2 con 100 µm/ml de gentamicina y glucosa al 1%. Las larvas se liberan por medio del aparato de Baermann, recolectándose en cajas Falcón con medio de cultivo RPMI-1640 (Rodríguez-Caballero, et al., 2007).

## 2.-Complemento alimenticio

El complemento es marca Petco, fue el que escogimos que contiene ingredientes que son ácidos grasos omega-3, vitamina E, vitamina A y vitamina D



Ingredientes:

Aceite de pescado, gelatina, glicerina, agua, acetato de alfa tocoferol (vitamina E), palmitato vitamina A, vitamina D<sub>3</sub>,

Ingredientes activos por cápsula de gel: vitamina A 400UI, vitamina D<sub>3</sub> 100UI, vitamina E 4UI, EPA (omega-3) 180mg. DHA (omega-3) 120mg

Figura 10. Complemento alimenticio



### 3.-Diseño experimental

El experimento se llevó a cabo en el Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. El diseño fue controlado y aleatorio.

Se incluyeron 24 perros criollos de 10-13 semanas de edad, Se desparasitaron y se aclimataron en la unidad de usos múltiples del Departamento de Parasitología durante 7 días. Durante ese período se llevaron a cabo tres cuantificaciones de huevos en heces mediante la técnica de McMaster (Besné MA, et al. 2005) para determinar la ausencia o presencia de infecciones por protozoarios o helmintos. Los perros se examinaron físicamente y se determinó su estado de salud. El día 0, todos los perros se inocularon con aproximadamente 400 huevos embrionados de *T. canis*. Los perros se dividieron con base en su sexo y peso corporal el día 4 del estudio, en 4 grupos de 6 perros cada uno con una proporción de sexo de 1:1. La complementación con ácidos grasos omega-3, vitaminas E, A y D, se llevó a cabo el día 0. el grupo 1 (Control parasitado) fungió como testigo parasitado sin complementar Al grupo 2, (G1, complementado a dosis bajas) se le administró el complemento en una proporción de 250 mg dos veces por semana, al grupo 3, (G2, complementado a dosis altas) se le administró el complemento en una proporción de 500 mg tres veces por semana, y el grupo 4 (control desparasitado sin complemento alimenticio) fue tratado con 5 mg/kg de pamoato de pirantel, (desparasitante efectivo contra *T. canis*) cuando se observaron huevos en heces el día 35 y día 63. Durante el período prepatente, los animales ingirieron una dieta comercial y el agua se les administró *ad libitum*. Se condujeron observaciones generales de salud diariamente durante la limpieza y alimentación de los animales, así como durante la interacción con los mismos. Se determinó la carga parasitaria individualmente a partir del día 35 y hasta el día 77. Las jaulas se inspeccionaron para detectar helmintos. El día 77, fin del estudio, los perros de los grupos 1, 2 y 3 se desparasitaron utilizando un producto a base de pirantel de acuerdo con la posología correspondiente al peso (5 mg/Kg P.V.).

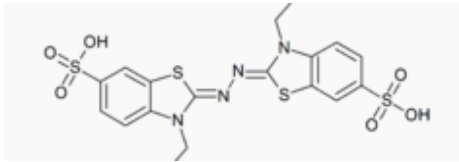
#### 4.-Muestras sanguíneas

La obtención de las muestras sanguíneas se realizó por medio de tubos Vacutainer® con y sin anticoagulante el día 1 post-infección, y posteriormente cada 7 días hasta concluir el estudio a los 77 días, La sangre se recolectó en tubos de polipropileno heparinizados (dos gotas de heparina para 10 ml de sangre), se mezcló por inversión y se centrifugó a 3,000 rpm (El radio de rotación de la centrífuga es de 10 cm, por lo tanto, esto corresponde a 1000 x gravedades) y a 0°C durante 10 min. El plasma resultante se separó en dos alícuotas similares y se almacenó congelado hasta su análisis. Y de los vacutainer sin anticoagulante se obtuvo el suero que se almacenó congelado hasta su análisis.

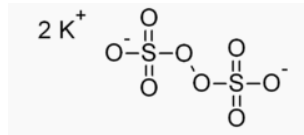
#### 5.-Determinación de la capacidad antioxidante del plasma

Se determinó en el plasma de las muestras, la presencia del radical ABTS+ de conformidad con la metodología desarrollada por Roberta Re, *et al.* (1999) y descrita por Kuskoski EM, *et al.* (2004). Es un método para la detección de la actividad antioxidante, es un ensayo de cambio en la coloración aplicable a los antioxidantes del plasma. El monocatión radical pre-formado de 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS+) se genera por la oxidación con persulfato de potasio y se reduce en la presencia de tales antioxidantes donadores de hidrógeno (AO). Después de la decoloración ABTS+ se mide la equivalencia de Trolox (TE) (ácido 6-hidroxi-2,5,8-tetrametilchromano-2-carboxílico). El trolox es un análogo de la vitamina E, su utilidad se basa en que es una medida de fuerza antioxidante, Los radicales ABTS y Trolox se obtuvieron de Sigma Aldrich (St Louis, MO, EUA). La absorbancia se midió a 450 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS

(Perkin Elmer de México). Los resultados se expresan en capacidad miliequivalente de Trolox por mL de plasma.



ABTS



Persulfato de Potasio

$ABTS + e^- \rightarrow ABTS^{\cdot-}$  AO = Decoloracion vs TROLOX

**Figura 11. Reacción para la determinación antioxidante del plasma**

## 6.-Determinación de malondialdehído (MDA)

La concentración de MDA en suero sanguíneo como un índice de lipoperoxidación se determinó en las membranas aisladas de los eritrocitos, de acuerdo con el método descrito previamente (Ohkawa H, et al. 1979 y Ramírez-Farías C, et al. 2008). Las muestras se enfriaron inmediatamente después de su obtención con agua a **cuatro** °C, y homogenizadas en un amortiguador de fosfatos. Este método se basa en la reacción del malondialdehído con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). El MDA en condiciones de bajo pH y alta temperatura reacciona con el TBA dando lugar a un aducto MDA-TBA, cromógeno o pigmento rojo que es detectable por espectrofotometría. La absorbancia del sobrenadante se determinó en el espectrofotómetro a 532 nm. Los resultados se expresan en nM/mg de proteína.

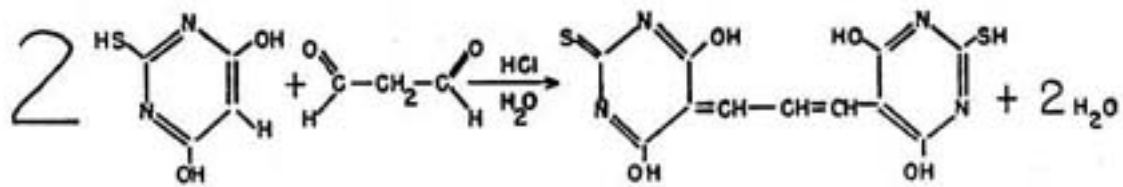


Figura 12. Reacción para la determinación del malondialdehido

## 7.- Determinación de la formación de nitritos

Los nitritos forman parte de los ROS y son elementos fácilmente medibles en suero. La medición de los nitritos totales se basó en la reacción de Griess (Green LC, *et al.*, 1982). Cien  $\mu$ L de la muestra de suero se diluyeron con agua destilada y se desproteiniza. La lectura se realizó a 540 nm. El nitrito es detectado y analizado por la formación de un color rojo rosado al tratamiento de una muestra conteniendo nitrito con el reactivo de Griess. Cuando se agrega el ácido sulfanílico, los nitritos forman una sal de diazonio, Cuando se agrega la diamina, se desarrolla un compuesto color rosado y este se mide en un espectrofotómetro

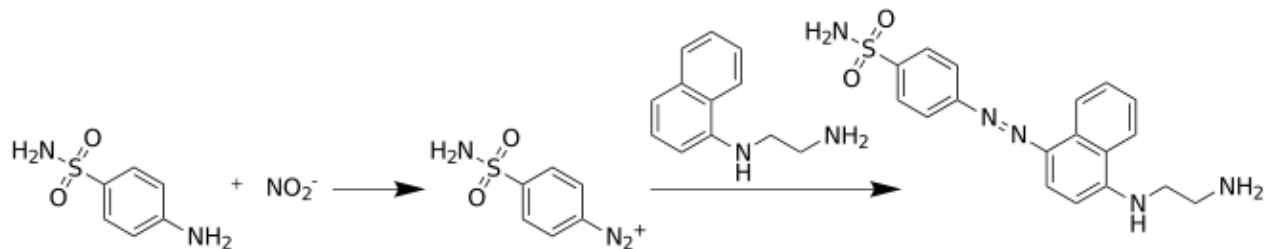


Figura 13. Reacción para la determinación de nitritos

## 8.- Cuantificación de la carga parasitaria

Se utilizó la técnica de McMaster para realizar la cuantificación parasitaria en las muestras fecales. Esta técnica utiliza cámaras de conteo que posibilitan el examen microscópico de un volumen conocido de suspensión fecal (2 x 0.15 mL). Los resultados se expresan como huevos por gramo de heces.

Procedimiento:

1. Depositar solución saturada glucosada hasta la primera línea del tubo.



2. Depositar una muestra de heces hasta la segunda línea del tubo.



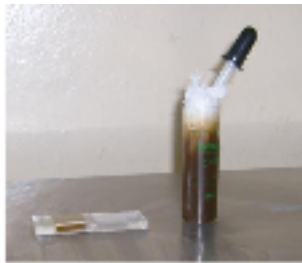
3. Depositar solución saturada hasta la tercera línea del tubo, cerrar y agitar hasta lograr un homogenizado completo.



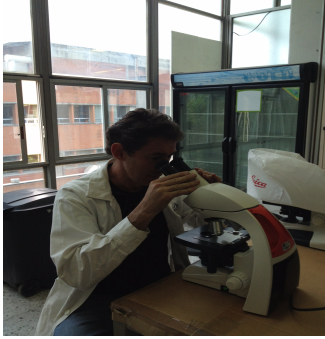
4. Introducir una gasa para que cumpla la función de filtro o colador.



5. Con la ayuda de un gotero obtener el líquido que se encuentra dentro de la gasa y depositarlo en la cámara McMaster cuidando que no se formen burbujas.



6. Colocar la cámara de Mc Master en el microscopio compuesto y enfocar las cuadrículas con el objetivo seco débil (10x).



7. Para realizar la lectura e interpretación, enfocar el ángulo superior derecho del cuadro e ir subiendo y bajando entre cada carril hasta completar el recorrido en las seis divisiones de la primera cámara, registrar el número de huevos de *Toxocara canis* encontrados, realizamos el mismo procedimiento con la siguiente cámara y al terminar el conteo, sumamos el total de huevos encontrados en ambas cámaras, multiplicamos por 100 y dividimos entre dos; el resultado será el número de huevos por gramo de heces de la materia fecal.

**Figura 14 Técnica Mc master. (Estrada, 2013)**

## VII.- Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó una prueba no paramétrica U de Mann-Whitney usando el paquete SPSS versión 17.0 para windows (SPSS Inc. Chicago, II, EUA).

Para todas las pruebas el nivel de significancia fue  $P < 0.05$ .

## VIII.-Resultados

### 1.-Actividad antioxidante del plasma

De acuerdo con lo que se observa en la Tabla 1 y la Figura 15, con el complemento utilizado se observó que la vitamina E ejerció una actividad antioxidante en los perros infectados. A partir del día 14 post-infección y después de proporcionar el complemento a los perros, se encontró una actividad antioxidante significativa ( $P < 0.05$ ) mayor en los sueros de los perros del grupo  $G_2$  que ingirieron 500 mg del complemento tres veces por semana en relación con el grupo  $G_1$  los que comieron 250 mg del producto dos veces por semana y estos con los grupos 1 Control y 4 Pirantel. Los resultados de la capacidad antioxidante del grupo Pirantel fue significativamente ( $P < 0.05$ ) mayores que la del grupo  $G_1$  desde el día 42. Asimismo, no se presentó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre el grupo 4 Pirantel y el grupo 1 Control del día 0 al 42. A partir de este día, los grupos Pirantel y  $G_2$  no presentaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la actividad antioxidante.



Tabla 1.- Efecto de la administración del complemento sobre la actividad antioxidante en plasma de perros infectados con *Toxocara canis* (Media  $\pm$  Desv. Est; n=5)

ABTS	MEDIA $\pm$ DESV. EST.			
	Control	G1 (250 mg)	G2 (500 mg)	Pirantel
DÍA 0	24.71 $\pm$ 1.81 <sup>a</sup>	25.60 $\pm$ 1.02 <sup>a</sup>	26.44 $\pm$ 1.60 <sup>a</sup>	25.05 $\pm$ 0.93 <sup>a</sup>
DÍA 1	25.02 $\pm$ 0.98 <sup>a</sup>	26.74 $\pm$ 3.19 <sup>a</sup>	26.11 $\pm$ 1.28 <sup>a</sup>	24.13 $\pm$ 3.04 <sup>a</sup>
DÍA 7	20.3 $\pm$ 2.48 <sup>a</sup>	27.64 $\pm$ 2.69 <sup>a</sup>	28.99 $\pm$ 0.84 <sup>a</sup>	21.22 $\pm$ 2.51 <sup>a</sup>
DÍA 14	18.4 $\pm$ 1.31 <sup>a</sup>	28.06 $\pm$ 3.39 <sup>b</sup>	43.15 $\pm$ 2.25 <sup>c</sup>	20.01 $\pm$ 2.22 <sup>a</sup>
DÍA 21	16.85 $\pm$ 1.57 <sup>a</sup>	28.67 $\pm$ 0.91 <sup>b</sup>	51.11 $\pm$ 0.20 <sup>c</sup>	17.45 $\pm$ 2.49 <sup>a</sup>
DÍA 28	19.4 $\pm$ 1.54 <sup>a</sup>	29.74 $\pm$ 3.08 <sup>b</sup>	52.19 $\pm$ 1.31 <sup>c</sup>	18.06 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup>
DÍA 35	20.66 $\pm$ 2.39 <sup>a</sup>	35.50 $\pm$ 0.39 <sup>b</sup>	55.03 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>	19.82 $\pm$ 0.63 <sup>a</sup>
DÍA 42	21.2 $\pm$ 1.62 <sup>a</sup>	35.97 $\pm$ 3.42 <sup>b</sup>	55.41 $\pm$ 2.24 <sup>c</sup>	47.16 $\pm$ 2.34 <sup>c</sup>
DÍA 49	21.6 $\pm$ 3.05 <sup>a</sup>	40.19 $\pm$ 1.97 <sup>b</sup>	48.01 $\pm$ 2.02 <sup>c</sup>	46.00 $\pm$ 1.47 <sup>c</sup>
DÍA 56	23.3 $\pm$ 2.18 <sup>a</sup>	38.57 $\pm$ 3.65 <sup>b</sup>	49.09 $\pm$ 0.98 <sup>c</sup>	48.22 $\pm$ 1.08 <sup>c</sup>
DÍA 63	24.71 $\pm$ 2.64 <sup>a</sup>	42.66 $\pm$ 2.79 <sup>b</sup>	50.36 $\pm$ 2.14 <sup>c</sup>	48.85 $\pm$ 1.47 <sup>c</sup>
DÍA 70	24.83 $\pm$ 1.50 <sup>a</sup>	44.19 $\pm$ 3.27 <sup>b</sup>	53.62 $\pm$ 1.18 <sup>c</sup>	49.88 $\pm$ 0.94 <sup>c</sup>
DÍA 77	25.55 $\pm$ 3.24 <sup>a</sup>	43.04 $\pm$ 0.42 <sup>b</sup>	56.85 $\pm$ 0.99 <sup>c</sup>	57.57 $\pm$ 1.64 <sup>c</sup>

Literales distintas en la misma fila indican diferencia significativa (P<0.05)

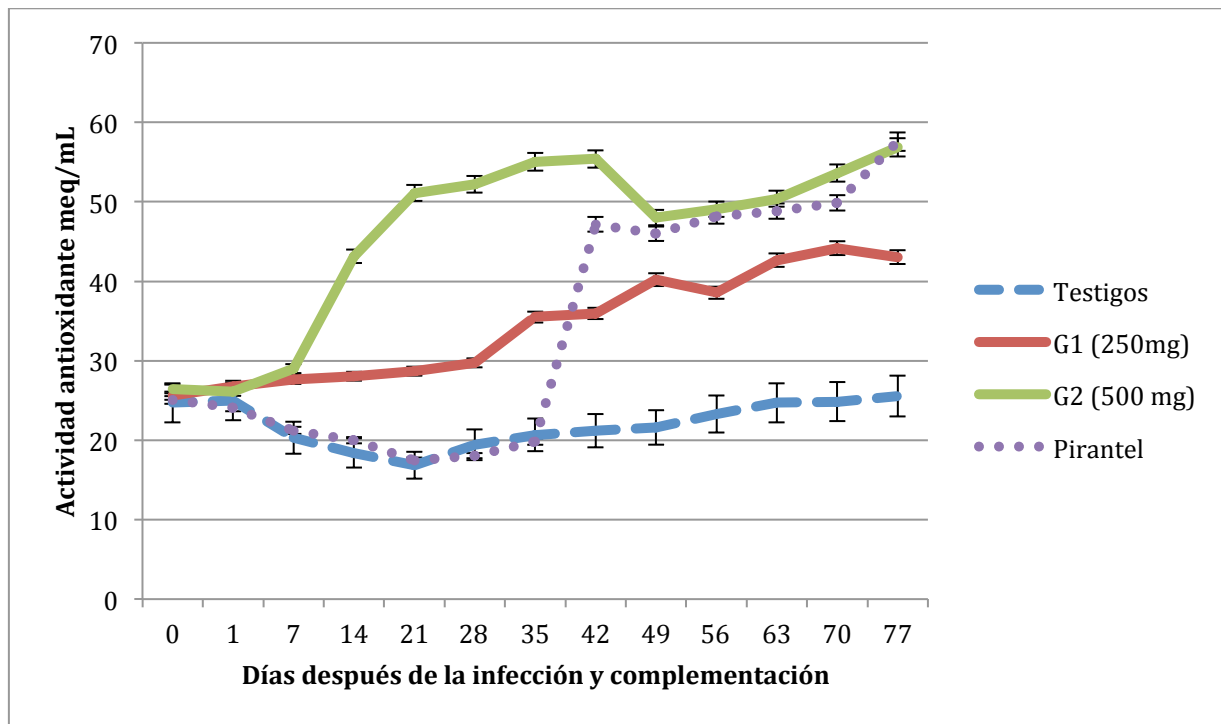


Figura 15. Actividad antioxidante en suero meq/ml (Media  $\pm$  Error Estándar; n=5)

## 2.-Determinación de malondialdehído (MDA) en suero

Los resultados de la peroxidación lipídica (Tabla 2 y Figura 16) confirman la actividad antioxidante del complemento utilizado. A partir del día 7, los dos grupos que recibieron el complemento nutricional G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> presentaron una reducción significativa ( $P<0.05$ ) de la generación de MDA en comparación con los grupos control y Pirantel. Así mismo, a partir de ese día, hubo una mayor ( $P<0.05$ ) peroxidación lipídica en el grupo que recibió 250 mg del producto administrado. En el grupo Pirantel se determinó una menor generación de MDA de manera significativa ( $P<0.05$ ) en comparación con el grupo G<sub>1</sub> y el grupo Control a partir del día 42. La producción de MDA en el grupo Pirantel no hubo diferencia significativa ( $P<0.05$ ) con el grupo G<sub>2</sub> a partir del día 42

Tabla 2. Concentración de malondialdehído (Media  $\pm$  Desv. Est; n=3)

	Control	G1 (250 mg)	G2 (500 mg)	Pirantel
Día 0	8.52 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	8.22 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	8.04 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	8.73 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>
Día 7	11.43 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	9.77 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	8.25 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	10.45 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
Día 14	11.24 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	9.83 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	8.21 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>	11.08 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>
Día 21	11.55 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	9.79 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	8.58 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	11.66 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
Día 28	12.74 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	9.89 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	8.44 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	12.23 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
Día 35	13.66 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	9.83 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	8.39 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>	14.24 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
Día 42	14.41 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	9.42 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	8.14 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	8.35 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>
Día 49	14.94 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	9.46 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	8.48 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>	8.29 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>
Día 56	14.68 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	9.67 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	8.47 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>	8.33 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>
Día 63	14.86 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	9.55 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	8.75 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>	8.54 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>
Día 70	14.49 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	9.84 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	8.23 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>	8.63 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>
Día 77	14.53 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	9.28 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	8.88 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	8.01 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>

Literales distintas en la misma fila indican diferencia significativa (P<0.05)

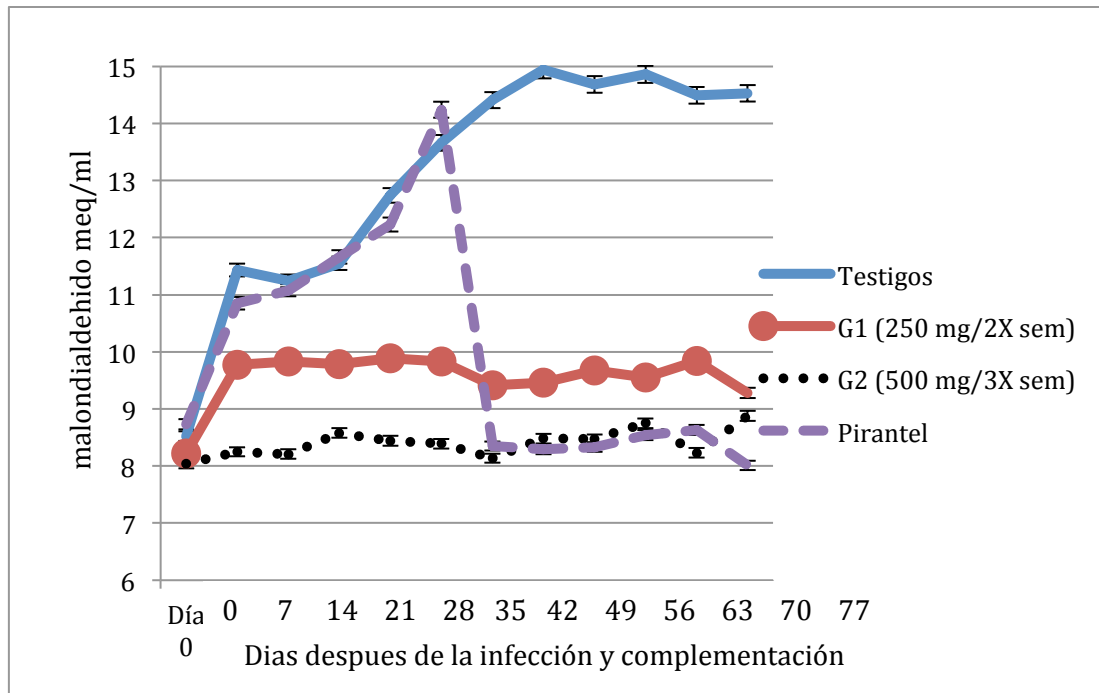


Figura 16. Concentración de malondialdehído en suero meq/ml (Media  $\pm$  Error Estándar; n=3)

### 3.-Determinación de nitritos en suero

En el Tabla 3 y la Figura 17 se observa que la generación de nitritos aumentó significativamente ( $P<0.05$ ) a partir del día 14 en los grupos Control y Pirantel en comparación con los grupos G1 y G2. En los perros del grupo Pirantel a partir del día 42 hubo una disminución significativa en la producción de nitritos en comparación con el grupo Control

Tabla 3. Determinación de nitritos (Media  $\pm$  Desv. Est; n=3)

	Control	G1 (250 mg)	G2 (500 mg)	Pirantel
Día 0	55.48 $\pm$ 3.05 <sup>a</sup>	51.24 $\pm$ 2.69 <sup>a</sup>	54.62 $\pm$ 4.77 <sup>a</sup>	50.75 $\pm$ 1.90 <sup>a</sup>
Día 7	50.26 $\pm$ 3.94 <sup>a</sup>	53.45 $\pm$ 4.80 <sup>a</sup>	55.16 $\pm$ 1.94 <sup>a</sup>	55.86 $\pm$ 4.54 <sup>a</sup>
Día 14	86.5 $\pm$ 2.45 <sup>a</sup>	54.04 $\pm$ 3.11 <sup>b</sup>	54.72 $\pm$ 4.50 <sup>b</sup>	74.26 $\pm$ 3.53 <sup>c</sup>
Día 21	91.19 $\pm$ 4.71 <sup>a</sup>	52.43 $\pm$ 1.96 <sup>b</sup>	55.36 $\pm$ 3.02 <sup>b</sup>	84.54 $\pm$ 1.50 <sup>c</sup>
Día 28	96.06 $\pm$ 3.41 <sup>a</sup>	50.21 $\pm$ 3.24 <sup>b</sup>	53.47 $\pm$ 4.00 <sup>b</sup>	93.54 $\pm$ 4.43 <sup>a</sup>
Día 35	99.62 $\pm$ 6.39 <sup>a</sup>	50.59 $\pm$ 1.06 <sup>b</sup>	49.45 $\pm$ 2.62 <sup>b</sup>	94.92 $\pm$ 3.76 <sup>a</sup>
Día 42	80.02 $\pm$ 2.46 <sup>a</sup>	55.57 $\pm$ 3.72 <sup>b</sup>	50.95 $\pm$ 3.02 <sup>b</sup>	54.08 $\pm$ 4.09 <sup>b</sup>
Día 49	80.15 $\pm$ 4.19 <sup>a</sup>	56.14 $\pm$ 1.04 <sup>b</sup>	52.58 $\pm$ 3.84 <sup>b</sup>	54.8 $\pm$ 3.27 <sup>b</sup>
Día 56	81.92 $\pm$ 1.67 <sup>a</sup>	54.28 $\pm$ 2.52 <sup>b</sup>	50.68 $\pm$ 1.19 <sup>b</sup>	53.12 $\pm$ 2.07 <sup>b</sup>
Día 63	79.98 $\pm$ 1.26 <sup>a</sup>	54.49 $\pm$ 3.31 <sup>b</sup>	50.66 $\pm$ 4.71 <sup>b</sup>	56.23 $\pm$ 3.11 <sup>b</sup>
Día 70	75.41 $\pm$ 4.42 <sup>a</sup>	53.15 $\pm$ 1.99 <sup>b</sup>	52.48 $\pm$ 1.26 <sup>b</sup>	55.52 $\pm$ 1.74 <sup>b</sup>
Día 77	68.03 $\pm$ 1.34 <sup>a</sup>	52.91 $\pm$ 2.03 <sup>b</sup>	53.73 $\pm$ 2.58 <sup>b</sup>	52.53 $\pm$ 3.07 <sup>b</sup>

Literales distintas en la misma fila indican diferencia significativa ( $P<0.05$ )

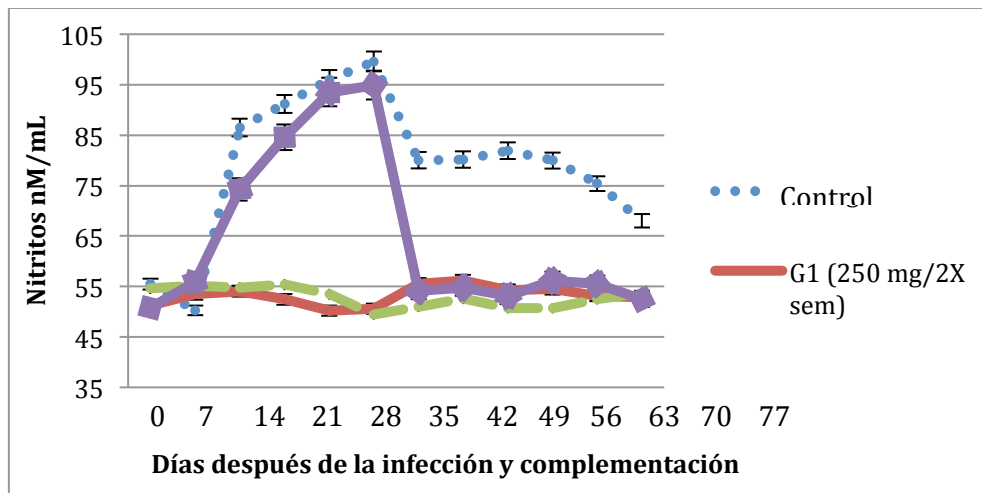


Figura 17. Concentración de nitritos en suero nM/ml (Media  $\pm$  Error Estándar; n=3)

## 4.-Coprología

Como se observa en el Tabla 4 y la Figura 18, no se encontró una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre la carga parasitaria determinada en los grupos complementados con ambas dosis experimentales y el testigo. En contraste, los perros tratados con Pirantel no excretaron huevos de *Toxocara canis* a partir del día 35 post-infección.

Tabla 4. Excreción de huevos por gramo de heces (HPG) (Media  $\pm$  Desv. Est; n=3)

Día	Control	G1 (250 mg)	G2 (500 mg)	Pirantel
35	3.46 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup>	3.43 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>	3.41 $\pm$ 0.89 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
42	3.43 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>	3.37 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	3.30 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
49	3.38 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>	3.30 $\pm$ 0.78 <sup>a</sup>	3.29 $\pm$ 0.99 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
56	3.31 $\pm$ 0.92 <sup>a</sup>	3.29 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>	3.29 $\pm$ 0.74 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
63	3.28 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>	3.28 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	3.28 $\pm$ 1.02 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
70	3.29 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>	3.26 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	3.29 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
77	3.27 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	3.26 $\pm$ 1.10 <sup>a</sup>	3.30 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>

Literales distintas en la misma columna indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ )

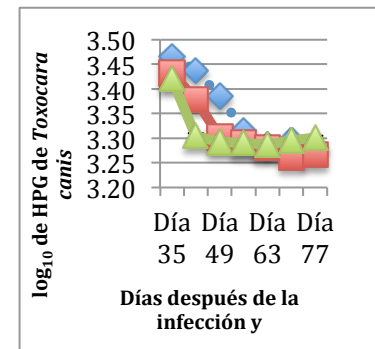
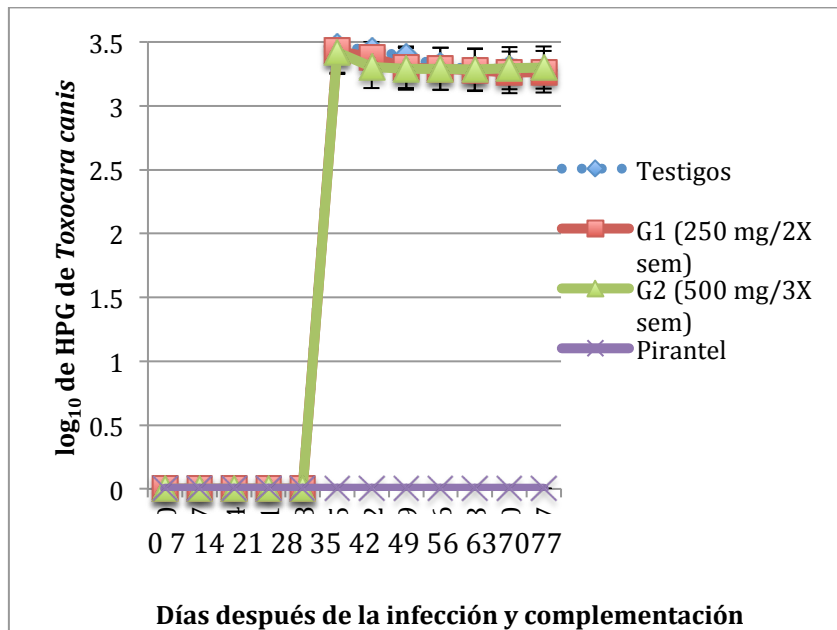


Figura 18. Excreción de huevos de *Toxocara canis* (Media  $\pm$  Error Estándar; n=3)

## IX-Discusión

En las enfermedades parasitarias gastrointestinales se presentan deficiencias nutricionales que conllevan a defectos metabólicos e inmunitarios; no obstante, los aspectos relacionados con la lesión oxidativa en los sistemas biológicos y el papel de los distintos antioxidantes en la toxocariosis canina han sido poco estudiados.

La terapia anti-inflamatoria actual depende del uso crónico de fármacos esteroidales o no esteroidales que tienen efectos colaterales indeseables, tales como la inducción de ulceraciones en el tubo digestivo. Una de las consecuencias de las parasitosis gastrointestinales es la severa inflamación intestinal, por lo que en casos crónicos de infecciones por nemátodos que habitan el intestino delgado es necesario modular la respuesta a fin de evitar cuadros clínicos severos que pueden resultar letales en animales débiles. El uso de alternativas anti-inflamatorias puede proporcionar terapias que eliminen o disminuyan el uso de fármacos ulcerogénicos. Para ello es necesario llevar a cabo estudios como el que se presenta en este trabajo de tesis para proporcionar evidencia que sustente el desarrollo de protocolos terapéuticos utilizando estos nutraceuticos.

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que no se presentó una disminución en la carga parasitaria de los animales que ingirieron el complemento probado y el grupo Control, a diferencia de los tratados con Pirantel. Esto permite sugerir que los ácidos grasos omega-3 y la vitamina E, vitamina A, y la vitamina D no ejercen un efecto tóxico o inmunomodulador que elimine o controle las poblaciones de parásitos tanto en sus estadios de larva como de adulto. Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 como el EPA y DHA se encuentran en cantidades importantes en los pescados grasos (atún, jurel y salmón) y especialmente en el aceite obtenido de estas especies, el cual actualmente se utiliza como suplemento nutricional (nutraceutico). Tanto el EPA como el DHA, luego de ser ingeridos, se incorporan rápidamente a los fosfolípidos de las membranas celulares donde pueden ser

liberados por enzimas lipooxigenasas y ciclooxigenasas, originando productos con potentes propiedades citoprotectoras y especialmente antiinflamatorias. La evidencia clínica y epidemiológica de múltiples estudios permite establecer que el consumo de EPA y DHA puede contribuir a la prevención y/o tratamiento de una serie de patologías, especialmente aquellas donde la inflamación juega un papel preponderante en su desarrollo. El EPA y el DHA presentan propiedades antiinflamatorias, vía la generación ya sea de agentes anti-inflamatorios, como las resolvinas, o a través del bloqueo de agentes pro-inflamatorios (Nordgren TM, *et al.* 2013; Ishida T, *et al.* 2010; Wallace JL, *et al.* 1989).

En la presente investigación, las concentraciones séricas de nitritos en los perros infectados presentaron diferencias significativas con su grupo Control y también presentó diferencias significativas con el grupo Pirantel a partir de la desparasitación el día 42 . Durante el curso de la infección y durante la complementación con el producto probado, se observó una disminución en las concentraciones de nitritos, la cual puede deberse al suministro de moléculas que probablemente interfieran en la síntesis o el funcionamiento de enzimas que catalicen la formación de nitritos (Ferrer Viant, D, *et al.* 1998) o bien, que los ácidos grasos omega-3 o las vitaminas E, A y D estimulen la diferenciación fenotípica de macrófagos activados alternativamente, denominados M2, los cuales desempeñan papeles reguladores en lugar de pro-inflamatorios (Stout, 2010) Es razonable especular que al activarse los macrófagos M2, la secreción de óxido nítrico disminuya, ya que se ha descrito que los mediadores inflamatorios tales como IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , así como las especies oxidativas de nitrógeno, están estrictamente relacionadas con los macrófagos M1 (Martínez FO, *et al.* 2006).

De manera similar a los nitritos, la complementación nutricional estudiada en este trabajo incidió en la reducción de las concentraciones séricas de MDA al disminuir el estrés oxidativo, lo cual se confirmó con los resultados del ensayo TROLOX. Los resultados obtenidos en la presente investigación, tanto para TROLOX, como MDA y nitritos, no pudieron ser

comparados con otros estudios, dado que en la literatura consultada, no se encontraron trabajos donde se determinen las concentraciones de estas moléculas en perros con toxocariosis sometidos a la ingestión de ácidos grasos omega 3 y vitaminas E, A y D, lo que amerita seguir realizando investigaciones más exhaustivas sobre este nutraceutico.

La disminución en la generación de estrés oxidativo que se demostró en este trabajo puede ser explicada por la actividad de la vitamina E que se incluye en los complementos nutricionales. No se puede descartar que las vitaminas A y D tengan un efecto positivo en la desoxidación ya que intervienen en los mecanismos de transporte de las células, Christopher KG, *et al.*, (2006), Michael M, *et al.*, (2003) La disminución en el estrés oxidativo también podría deberse a la actividad de los ácidos grasos, ya que a pesar de que se consideran pro-oxidantes, se ha descrito que los mediadores derivados del EPA y DHA, conocidos como resolvinas y protectinas, son mediadores clave en la resolución de la inflamación y se consideran reguladores de la homeostasis (Serhan CN, *et al.* 2004). Por ejemplo, los mediadores derivados del DHA, tal como la resolvina D2 y la resolvina D1, así como el mediador RvE1 del EPA son efectivos en la prevención de la inflamación intestinal (Bento AF, *et al.* 2011). Al existir menor daño intestinal, es razonable sugerir que disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno. Existe un debate sobre el papel de los ácidos grasos omega-3 sobre el estrés oxidativo. Mientras Fukui M, *et al.*, 2013, menciona que son oxidantes, Kelley NS, *et al.*, 2014, demostraron que su efecto es el contrario. Bajo las condiciones en las que se realizó este estudio, no se pudo definir el efecto de los ácidos grasos. Por lo tanto, sería necesario realizar ensayos oxidativos posteriores utilizando solamente los ácidos grasos Omega sin la vitamina E para confirmar su actividad sobre la peroxidación

En cuanto al aumento en la capacidad antioxidante del grupo Pirantel en el momento de la desparasitación el día 35, hasta donde se tiene conocimiento, no hay información en la literatura sobre la actividad antioxidante del pamoato de pirantel, por lo que es razonable especular que al no haber parásitos, la producción de ROS disminuye, comparado con los



otros 3 grupos, por lo que la actividad de los antioxidantes endógenos tienen la capacidad de evitar el estrés oxidativo a estos niveles. Podemos afirmar que la ausencia de parásitos evita la producción de especies reactivas de oxígeno, ya que en el grupo control que se encontraba infectado con *T. canis* presentó una mayor producción de manera significativa ( $P < 0.05$ ) de MDA y NO en comparación con los otros 3 grupos.

Es importante mencionar que para atribuir el efecto oxidante, antioxidante o desinflamatorio, es necesario realizar un estudio con cada ingrediente por separado, tanto EPA, DHA, vitaminas E, A y D

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio demuestran por primera vez que, hasta donde tenemos conocimiento, los ácidos grasos Omega 3, modulan la inflamación intestinal en perros infectados experimentalmente con *Toxocara canis*. De conformidad con la literatura consultada, se especula que este efecto antiinflamatorio posiblemente se debió a que los ácidos grasos Omega-3 inhiben la activación y migración de polimorfonucleares, interfieren con la vía del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB) y disminuyen la regulación de mediadores proinflamatorios. Asimismo, en vista de que estudios anteriores al presente han documentado que los ácidos grasos Omega-3 inducen la polarización fenotípica a los macrófagos tipo M2, se sugiere que este cambio de fenotipo inhibió la producción de óxido nítrico. En vista de que se ha documentado el incremento de estrés oxidativo a causa de *Toxocara canis* (Demirci C, *et al.* 2006; Gargili A, *et al.* 2004) se sugiere llevar a cabo más estudios para contar con evidencia suficiente que permita recomendar su inclusión en los alimentos para perros, pues a pesar de no ejercer un efecto antiparasitario, los resultados de este estudio demostraron que protege los tejidos de los nitritos y de la oxidación.

## X.-Conclusiones

Mediante la realización de este experimento se pudo demostrar que el nutracéutico utilizado ejerció un efecto antioxidante durante el curso de una infección experimental con *Toxocara canis*. Este tipo de ensayos *in vivo*, abre las puertas para continuar con el proceso de investigación en materia de nutracéuticos y de este modo, explicar de una manera más tangible los mecanismos por los cuales los productos nutricionales pueden coadyuvar o empeorar las enfermedades de tipo infeccioso, como una helmintiasis que además de tener una importancia médica en los animales jóvenes e inmunocomprometidos, también representa un riesgo para la salud pública.

## XI.- Recomendaciones

Para futuros ensayos con ácidos grasos omega 3 y vitaminas E, A y D, sería apropiado evaluar la respuesta de estos productos de manera independiente y en una mayor población y determinar la activación de más células anti-inflamatorias, pro-inflamatorias, inflamatorias y reguladoras, oxidantes o antioxidantes tanto *in vivo* como *in vitro*. Asimismo, este estudio reitera la necesidad de administrar los ácidos grasos omega-3 junto con productos antioxidantes en el alimento de los perros. Adicionalmente, se sugiere que su uso durante el curso de la toxocariosis canina para disminuir la severidad de la inmunopatología que se presenta como respuesta a la acción mecánica que ejerce el parásito sobre el tejido intestinal, así como la disminución del daño producido por las ROS generadas por la presencia del parásito, debe ser cuidadosamente evaluado, ya que la actividad inmunomoduladora puede enmascarar los signos clínicos que nos permiten identificar la actividad patogénica del parásito y llevar a cabo mecanismos oportunos de control. Si no se observan los signos

clínicos asociados a la inflamación intestinal, los parásitos pueden proliferar y llegar a provocar acciones obstructivas o traumáticas en el animal. Es por ello que la administración de ácidos grasos omega-3 y vitamina E en animales que no han sido desparasitados estratégicamente debe ser cuidadosamente evaluada por el Médico Veterinario Zootecnista.

## XII.-Referencias

1. Alba-Hurtado F, Ibarra VF, Figueroa CJA, Quiroz RH (2011): "Parasitología Veterinaria" Vol. II. Helmintos. México, D.F. 2011: 81-87.
2. Alba-Hurtado F, Flores-Alatorre L, Cuéllar OJ, Martínez LJP, (1994): "Desarrollo de un nuevo modelo de toxocariasis ocular". Memorias del XXV Congreso Nacional de Microbiología Ciudad Obregón Son. México. 1994.
3. Abdel Ghany EA, Alsharany W, Ali AA, Younass ER, Hussein JS, (2015): "Anti-oxidant profiles and markers of oxidative stress in preterm neonates". *Pediatr Int Child Health*. 2015 May 4.
4. Al-Gubory KH (2014): "Environmental pollutants and lifestyle factors induce oxidative stress and poor prenatal development" *Reprod Biomed Jul*; 29(1):17-31.
5. Al-Gubory KH, (2012): "Mitochondria: omega-3 in the route of mitochondrial reactive oxygen species" *Int J Biochem Cell Biol Sep*;44(9):1569-73. doi: 10.1016/j.biocel.2012.06.003. Epub 2012 Jun 15.
6. Bardón IM, (1992): "Contribución a la biología e inmunología de *Toxocara canis*. Memoria". Universidad Complutense. Facultad de Farmacia. Departamento de Parasitología Madrid, España. .
7. Bento, AF, Claudino RF, Dutra RC, Marcon R, and Calixto JB, (2011): "Omega-3 fatty acid-derived mediators 17(R)-hydroxy docosahexaenoic acid, aspirin-triggered resolvin D1 and resolvin D2 prevent experimental colitis in mice". *J. Immunol*. 187: 1957–1969.
8. Besné MA, Figueroa CJA, Quiroz RH, Ramírez GA, Ramos ME, (2005): "Manual de Prácticas de Laboratorio de Parasitología". FMVZ-UNAM, Ciudad Universitaria, México D.F. ISBN: 970-32-3321-X.
9. Brunaska M, Dubinsky P, Reiterova K,(1995): "*Toxocara canis*: ultrastructural aspects of larval moulting in the maturing eggs". *Int. J. Parasitol*. 25: 683–690.

10. Cahill JP (2003): "*Ethnobotany of Chia, Salvia hispanica L. (Lamiaceae)*". *Economic Botany* **57** (4): 604–618.
11. Christopher KG & Sumito O (2006) "Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity" *Nat Rev Immu* **6**: 44–55 doi:10.1038/nri1748
12. Cobb CA, Cole MP (2015): "Oxidative and nitrative stress in neurodegeneration". *Neurobiol Dis.* May 27. pii: S0969-9961(15)00177-1. doi: 10.1016/j.nbd.2015.04.020.
13. Cordero del Campillo M, Rojo V, Martínez F, Sánchez A, Hernández, R, Navarrete I, Díez B, Quiroz R y Carvalho V, (1999): "Parasitología Veterinaria", primera edición en español, editorial McGraw-Hill-Interamericana. Madrid España, 968 pp
14. Crespo San Juan J, Calvo Nieves MD, Aguirre gervas B, Herreros Rodriguez J, (2015): "Early detection of high oxidative activity in patients with adenomatous intestinal polyps and colorectal adenocarcinoma: myeloperoxidase and oxidized low-density lipoprotein in serum as new markers of oxidative stress in colorectal cancer" *Lab. Med.* Spring;46(2):123-35.
15. Demirci C, Gargili A, Kandil A, Cetinkaya H, Uyaner I, Boynuegri B, Gumustas MK (2006): "Inhibition of inducible nitric oxide synthase in murine visceral larva migrans effects on lung and liver damage". *Chin J Physiol.* Dec 31;49(6):326-34).
16. Despommier D, (2003); "Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects". *Clin. Microbiol. Rev.* 16(2): 265-272.
17. Dwight DB, (2011): "*Parasitología para veterinarios*" 9ª Edición, Editorial Elsevier, 213-289.
18. Estrada BJ, (2013): "Manual de prácticas de parasitología" FMVZ-UAEM. Toluca Edo de Mexico, Jun P. 36-38.
19. Ekaidem JS, Usoh IF, Akpanabiatu MI, Uboh FE, Akpan HD, (2014): "Urate synthesis and oxidative stress in phenytoin hepatotoxicity: the role of antioxidant vitamins". *Park J Biol Sci.* Nov;17(11):1179-84.

20. Ferrer Viant D, Fonseca C, García Rodríguez R, Martínez P. (1998): "Oxido Nítrico. Importancia biológica y participación en algunas funciones cardiovasculares y hematológicas". *Medisan*; 2(3): 45-53
21. Fogliano V, Verde V, Randazzo G, Ritieni A. (1999): "Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 1935-1940.
22. Fukui M, Kang KS, Okada K, Zhu (2013): "EPA, an omega-3 fatty acid, induces apoptosis in human pancreatic cancer cells: role of ROS accumulation, caspase-8 activation, and autophagy induction". *J Cell Biochem*. Jan;114(1):192-203. doi: 10.1002/jcb.24354.
23. Gargili A, Demirci C, Kandil A, Cetinkaya H, Atukeren P, Gümüştaş MK.(2004): "In vivo inhibition of inducible nitric oxide and evaluation of the brain tissue damage induced by *Toxocara canis* larvae in experimentally infected mice". *Chin J Physiol*. Dec 31;47(4):189-96
24. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. (1982): "Analysis of nitrite, and (15N) nitrate in biological fluids". *Anal Biochem*. ; 126:131-138
25. Hand MS, Thatcher CD, Remillard RL, Roudebush P, (2000): "*Nutricion clínica en pequeños animales* ".4ª edición, Editorial Intermédica, 69-72
26. Hand MS, Thatcher CD, Remillard RL, Roudebush P. (2004): "*Nutricion clínica en pequeños animales* ".5ª edición, Editorial Intermédica, 100-104
27. Ishida, T., M. Yoshida, M. Arita, Y. Nishitani, S. Nishiumi, A. Masuda, S. Mizuno, T. Takagawa, Y. Morita, H. Kutsumi, et al.(2010): "Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium-induced colitis". *Inflamm. Bowel Dis*. 16: 87–95
28. Jin Z., Akaon N., Ohta N, (2008): "Prolactin evokes lactational transmission of larvae in mice infected with *Toxocara canis*". *Parasitology Int.*, 57: 495-498.

29. Kelley NS, Yoshida Y, Erickson KL, (2014), "Do n-3 polyunsaturated fatty acids increase or decrease lipid peroxidation in humans?" *Metab Syndr Relat Disord*. 2014 Oct;12(8):403-15. doi: 10.1089/met.2014.0045. Epub Jul 21.
30. Kuskoski EM, Asuero AG, Tron Coso AM, Garcia-Parill AM, Fett R. (2004): "Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos". *Rev. Bras. Ciênc. Tecnol. Alim.*, v. 24, n.4, 691-693, 2004
31. Martinez, F O, Gordon, S., Locati, M and Mantovani, A. (2006). "Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression". *J. Immunol*. 177: 7303–7311
32. Michael M, Sander K, (2003) *Nature Reviews Genetics* 4, 315-322;
33. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. (1992): "*Bioquímica de Harper*" 12ª edición, Editorial manual moderno, 135-137
34. Neubauer O, Yfanti C. (2015): "Antioxidants in Athlete's Basic Nutrition: Considerations towards a Guideline for the Intake of Vitamin C and Vitamin E. *Antioxidants in Sport Nutrition*". Boca Raton (FL): CRC Press; Chapter 3.
35. Nettleton JA. (1991): "*Omega -3 Fatty acids: Comparison of plant and seafood sources in human nutrition*". *J. Am. Diet. Assoc.* Vol. 91, no. 3, pp. 331-337.
36. Nichols RL (1956): "The etiology of visceral larva migrans. I. Diagnostic morphology of infective second-stage *Toxocara* larvae". *J. Parasitol.* 42(4): 349-362.
37. Nordgren, TM, Heires, AJ; Wyatt, TA, Poole, JA, Levan TD, Cerutis, DR, and Romberger, DJ, (2013): "Maresin-1 reduces the proinflammatory response of bronchial epithelial cells to organic dust" *Respir. Res.* 14: 51
38. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979), "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction" *Anal Biochem* 1979; 95:351-358.
39. Ohta Y, Yashiro K, Ohashi K, Horikoshi Y, Kusumoto C, Matura T, Fukuzawa K. (2015): "Effect of Dietary Vitamin E Supplementation on Liver Oxidative Damage in

- Rats with Water-Immersion Restraint Stress” J. Nutr Sci Vitaminol (Tokyo);61(2):113-22. doi: 10.3177/jnsv.61.113.
40. Overgaauw PA., Okkens AC, Bevers MM, Kortbeek LM, (1998): “Incidence of patent *Toxocara canis* infections on bitches during the oestrus cycle”. Vet. Quart. 20(3): 104-107.
41. Quiroz R. (2003): “Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos”. Ed. Limusa. México, D.F. .
42. Ramírez-Farías C, Madrigal-Santillán E, Gutiérrez-Salinas J, Rodríguez-Sánchez N, Martínez-Cruz M, Valle-Jones I. (2008), “Protective effect of some vitamins against the toxic action of ethanol on liver regeneration induced by partial hepatectomy in rats”. World J Gastroenterol 2008; 14: 899-907
43. Roberta Re, Nicoletta P, Protegente A, Yang M, Rice Evans C. (1999), “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay” Free Radic. Biol. Med., 26, 9/10, 1231-1237 Volume 26, issues 9-10, May 1999, Pages 1231–1237
44. Rodríguez-Caballero, Luna-Ochoa RI, Ponce-Macotela M, Peralta-Abarca GE, Martínez-Gordillo MN, (2007) A simple and inexpensive in vitro method for retrieving fertilized *Toxocara canis* eggs. Parasitol. Res., 101, pp. 829–832
45. Sargi SC, Dalalio MM, Visentainer JV, Bezerra RC, Perini JÂ, Stevanato FB, Visentainer JE. (2012), *Producción of TNF- $\alpha$ , nitric oxide and hydrogen peroxide by macrophages from mice with paracoccidiodomycosis that were fed a linseed oil-enriched diet*. Lab de Imunogenética, Dep de C Bás da Saúde, Univ Est de Maringá, Maringá, PR, Brasil, 2012;107(3):303-9. 87020-900
46. Serhan, CN, Gotlinger K, Hong S, Arita M. (2004). Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 73: 155–172.



47. Sierra MPS, Guzmán A.M.G., Olivares I.M.C., Torres Y.D.R., Hicks J.J.G. (2004) "Participación de las especies reactivas de oxígeno en las enfermedades pulmonares" Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. v.17 n.2 México jun.
48. Soulsby EJ. (1983): "Toxocariasis". Br Vet J., 139 (6): 471-475.
49. Stout RD, (2010). Editorial: macrophage functional phenotypes: no alternatives in dermal wound healing? J. Leukoc. Biol. 87: 19–21
50. Turner D, Steinhart AH, Griffiths. (2007), *Ácidos grasos omega-3 (aceite de pescado) para el mantenimiento de la remisión en la colitis ulcerosa*. Clin Gastroenterol Hepatol. Jan;5(1):103-10. Epub 2006 Dec 4.
51. Turner D, Zlotkin SH, Shad PS and Griffids AM. (2009), *Omega 3 fatty acids (fish oil) for maintenance of remission in Crohn's disease*, Article first published online: 21 JAN DOI 10.1002/14651858.CD006320.pub3
52. Valenzuela AB, Sanhuesa JC. (2009), *Aceites de origen marino, su importancia en la nutrición y en la ciencia de alimentos*. Rev chil nutr Vol 36 No 3 Sep 2009
53. Wallace J L, W K MacNaughton, Morris GP, Beck PL. (1989). Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. Gastroenterology 96: 29–36
54. Werner (1958) "A report on *Toxocara canis*", By Gloria A. Webster. Canadian Journal of comparative medicine, August Vol. XXII, No 8, 272:279
55. Willard M. (2009), *The veterinarian* Num 6 Nov
56. Wilhelm HT (2002) "Biología de las especies reactivas de oxígeno" Mensaje Bioquímico, Vol. XXVI, 19-50
57. William OR, Dukes (2004) Physiology of domestic animals 12 edition, 381-405
58. Zicker SC, Wedekind KJ, Jewell DE. (2006), Antioxidants in veterinary nutrition. Vet Clin Small Anim 36 1183–1198.

59. Zeng W, Xiao J, Xing F, Tipoe GL, Wang X, He C, Chen ZY, Liu Y. (2015) "Antioxidant treatment enhances human mesenchymal stem cell anti-stress ability and therapeutic efficacy in an acute liver failure model" *Sci Rep.* Jun 9;5:11100. doi: 10.1038/srep11100.