



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Estudio de la evolución de las alteraciones microscópicas asociadas a la presencia de huevos larvados y antígenos de secreción y excreción de *Toxocara canis* en tejido pulmonar de ratas Wistar con infección inducida.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A N:

**GERARDO MANUEL CORRAL RUIZ
ESTEFANIA HERRERA TORRES**

ASESOR: M. en C. JUAN PABLO MARTÍNEZ LABAT



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES
CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estudio de la evolución de las alteraciones microscópicas asociadas a la presencia de huevos larvados y antígenos de secreción y excreción de *Toxocara canis* en tejido pulmonar de ratas Wistar con infección inducida.

Que presenta la pasante: Gerardo Manuel Corral Ruiz
Con número de cuenta: 309113791 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 09 de Marzo de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Juan Pablo Martínez Labat	
VOCAL	Dr. Marco Antonio Vega López	
SECRETARIO	MVZ. Gabriela Fuentes Cervantes	
1er. SUPLENTE	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
2do. SUPLENTE	Dr. Jorge Luis de la Rosa Arana	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: LA LAURA MARGARTA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estudio de la evolución de las alteraciones microscópicas asociadas a la presencia de huevos larvados y antígenos de secreción y excreción de *Toxocara canis* en tejido pulmonar de ratas Wistar con infección inducida.

Que presenta la pasante: Estefanía Herrera Torres

Con número de cuenta: 303787361 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

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

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 09 de Marzo de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Juan Pablo Martínez Labat	
VOCAL	Dr. Marco Antonio Vega López	
SECRETARIO	MVZ. Gabriela Fuentes Cervantes	
1er. SUPLENTE	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
2do. SUPLENTE	Dr. Jorge Luis de la Rosa Arana	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Agradecimientos

Al Dr. Pablo por el enorme apoyo, tiempo y atención dedicado a la realización de este trabajo, por la paciencia brindada y el conocimiento compartido. Por la confianza y la oportunidad de realizar este trabajo. Gracias por todas esas pláticas y por hacer de nuestra estancia en el laboratorio una grata experiencia. Pero sobre todo, por haber sido un excelente asesor y un profesor completamente entregado a su trabajo. Gracias por habernos permitido compartir este tiempo con usted.

Nuestro especial reconocimiento al Dr. Germán Garrido Fariña por su colaboración y apoyo, por las sugerencias que permitieron ampliar el horizonte de este estudio, por todo el tiempo invertido para capacitarnos en las diferentes técnicas de procesamiento histológico así como la interpretación de los resultados. Gracias por el interés, la paciencia y por compartir su experiencia acercándonos al vasto mundo de la histología.

A la Dra. Gabriela Xochitl Ayala del bioterio del Instituto de Fisiología Celular por la donación de los animales utilizados en este trabajo.

Al Dr. Enrique Flores Gasca del área de cirugía de la facultad de veterinaria en la FESC, por su apoyo durante la cirugía de los animales utilizados en el trabajo.

Al Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez por permitirnos el uso de su equipo.

A los integrantes del laboratorio de Parasitología de la FES Cuautitlán por el apoyo brindado y el tiempo compartido durante la duración de este trabajo.

Finalmente a nuestros sinodales por el tiempo dedicado a leer y corregir este trabajo.

Índice

Índice.....	i
Abreviaturas empleadas	iv
Índice de cuadros y figuras.....	v
Resumen	vii
Introducción	1
<i>Toxocara canis</i>	3
Epidemiología.....	5
Ciclo biológico	8
Toxocariosis	10
<i>Larva migrans visceral</i>	10
<i>Larva migrans ocular</i>	11
Toxocariosis encubierta.....	11
Mecanismos patogénicos.....	13
Respuesta inmunológica.....	14
Antígenos de secreción y excreción	17
Diagnóstico.....	21
Pruebas no específicas	22
Inmunodiagnóstico	22
Tratamiento	23
Justificación.....	25
Hipótesis.....	27
Objetivos	28
Diagrama de flujo.....	29
Material y métodos.....	30
Material biológico	30
Protocolo experimental.....	30

Obtención de parásitos adultos y cultivo de huevos de <i>Toxocara canis</i>	30
Infeción experimental	31
Procesamiento histopatológico del pulmón de rata inoculado con huevos larvados de <i>Toxocara canis</i>	31
Interpretación de los resultados obtenidos	33
Resultados	34
Tejidos de los grupos control y testigo con las distintas técnicas histológicas.	34
Inmunohistoquímica	34
Tejidos teñidos con Hematoxilina-Eosina..	35
Tejidos teñidos con la tinción Tricrómica de Van Gieson..	36
Tejidos teñidos con Naranja de Acridina.....	37
Descripción de las lesiones microscópicas mediante las tinciones histológicas.	38
Día 5 postinoculación.	38
Animales inoculados con 50 huevos.....	38
Animales inoculados con 100 huevos.....	38
Inmunohistoquímica.	39
Tejidos teñidos con Hematoxilina-Eosina.	40
Tejidos teñidos con la tinción Tricrómica de Van Gieson.....	41
Día 10 postinoculación.	42
Animales inoculados con 50 huevos.....	42
Animales inoculados con 100 huevos.....	42
Inmunohistoquímica.	43
Tejidos teñidos con Hematoxilina-Eosina.	44
Eosinófilos.	45
Mastocitos.....	46
Tejidos teñidos con la Tinción Tricrómica de Van Gieson.....	47
Tejidos teñidos con Naranja de Acridina.....	48
Día 30 postinoculación.	49
Animales inoculados con 50 huevos.....	49
Animales inoculados con 100 huevos.....	49
Tejidos teñidos con Hematoxilina-Eosina.	50
Tejidos teñidos con la Tinción Tricrómica de Van Gieson.....	51

Día 60 postinoculación.....	52
Animales inoculados con 50 huevos.....	52
Animales inoculados con 100 huevos.....	52
Inmunohistoquímica.....	53
Tejidos teñidos con Hematoxilina-Eosina.....	55
Eosinófilos.....	56
Mastocitos.....	57
Tejidos teñidos con la tinción Tricrómica de Van Gieson.....	58
Tejidos teñidos con Naranja de Acridina.....	59
Tejidos teñidos con Azul de Toluidina y Cromotrope 2R.....	60
Gráficos de los parámetros evaluados cualitativamente.....	61
Intensidad de daño.....	61
Mastocitos.....	62
Eosinófilos.....	63
Presencia de colágeno.....	64
Discusión.....	65
Conclusiones y perspectivas.....	72
Referencias.....	74
Apéndice.....	81

Abreviaturas empleadas.

3,3'Diaminobencidina	DAB
Antígenos de excreción secreción	TES
Azul de toluidina	AT
Buffer salino de fosfatos con tween ²⁰	PBS-T
Buffer tris salino con tween ²⁰	TBS-T
Células natural killer	NK
Células T colaboradoras tipo 1	Th1
Células T colaboradoras tipo 2	Th2
Cluster differentiation	CD
Complejo avidina-biotina	ABC
Cromotropro 2R	C2R
Estadio larvario 2	L2
Etiquetado final mediado por la desoxinucleotidiltransferasa	TUNEL
Factor de crecimiento tumoral beta	TGF-β
Hematoxilina-eosina	HE
Inmunoglobulina E	IgE
Inmunoglobulina G	IgG
Imunohistoquímica	IHQ
Interleucina	IL
kDA	Kilodaltons
<i>Larva migrans ocular</i>	LMO
<i>Larva migrans visceral</i>	LMV
Lavado broncoalveolar	BAL
Macrófagos alternativamente activados	AAM
Naranja de acridina	NA
Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂
Post infección	pi
Regulador de la activación de linfocitos T expresados y secretados	RANTES
Solución salina fisiológica	SSF
Tejido linfoide asociado a bronquios	BALT
Tricrómica de Van Gieson	TVG

Índice de Cuadros y Figuras.

Cuadro No. 1 Frecuencia de <i>Toxocara canis</i> en perros de diferentes lugares del mundo.....	6
Cuadro No. 2 Frecuencia de <i>Toxocara canis</i> en parques y suelo de diferentes lugares del mundo.....	7
Cuadro No. 3 Nivel de contaminación por huevos de <i>Toxocara spp.</i> en el suelo de los parques y calles en tres municipios del Estado de México.....	7
Cuadro No. 4 Frecuencia de anticuerpos anti- <i>Toxocara</i> de humanos en diferentes lugares del mundo.....	7
Cuadro No. 5 Composición de los carbohidratos presentes en los TES	18
Figura No. 1 Fotomicrografías de cortes histológicos de pulmón de jerbo.....	2
Figura No. 2 Gusanos adultos de <i>Toxocara canis</i>	4
Figura No. 3 Huevos de <i>Toxocara canis</i>	4
Figura No. 4 Ciclo biológico de <i>Toxocara canis</i>	9
Figura No. 5 Signos y síntomas de la toxocariosis.....	12
Figura No. 6. Cutícula de la fase larvaria de <i>Toxocara canis</i>	17
Figura No. 7. Mecanismos inmunoevasores	19
Figura No. 8 Corrimiento electroforético de las glicoproteínas de <i>Toxocara canis</i>	20
Figura No. 9 Fotomicrografías de cortes histológicos: Controles inmunohistoquímica	34
Figura No. 10 Fotomicrografías de cortes histológicos: Controles HE	35
Figura No. 11 Fotomicrografías de cortes histológicos: Controles TVG	36
Figura No. 12 Fotomicrografía de corte histológico: Control NA	37
Figura No. 13 Fotomicrografías de cortes histológicos: Inmunohistoquímica dosis 50 huevos larvados	39
Figura No. 14 Fotomicrografías de cortes histológicos: HE 50 y 100 huevos larvados, 5 días.....	40
Figura No. 15 Fotomicrografías de cortes histológicos: TVG 50 y 100 huevos larvados, 5 días	41
Figura No. 16 Fotomicrografías de cortes histológicos: Inmunohistoquímica dosis 100 huevos larvados, 10 días	43
Figura No. 17 Fotomicrografías de cortes histológicos: HE 50 y 100 huevos larvados, 10 días.....	44
Figura No. 18 Fotomicrografías de cortes histológicos: Eosinófilos 50 y 100 huevos larvados, 5 y 10 días	45

Figura No. 19 Fotomicrografías de cortes histológicos: Mastocitos 50 y 100 huevos larvados, 5 y 10 días	46
Figura No. 20 Fotomicrografías de cortes histológicos: TVG 50 y 100 huevos larvados, 10 días.	47
Figura No. 21 Fotomicrografías de cortes histológicos: NA 50 y 100 huevos larvados, 5 y 10 días	48
Figura No. 22 Fotomicrografías de cortes histológicos: HE 50 y 100 huevos larvados, 30 días	50
Figura No. 23 Fotomicrografías de cortes histológicos: TVG 50 y 100 huevos larvados, 30 días.	51
Figura No. 24 Fotomicrografías de cortes histológicos: Inmunohistoquímica dosis 100 huevos larvados, 60 días	53
Figura No. 25 Fotomicrografías de cortes histológicos: Inmunohistoquímica dosis 100 huevos larvados, 60 días	54
Figura No. 26 Fotomicrografías de cortes histológicos: HE 50 y 100 huevos larvados, 60 días.	55
Figura No. 27 Fotomicrografías de cortes histológicos: Eosinófilos 50 y 100 huevos larvados, 30 y 60 días	56
Figura No. 28 Fotomicrografías de cortes histológicos: Mastocitos 50 y 100 huevos larvados, 30 y 60 días	57
Figura No. 29 Fotomicrografías de cortes histológicos: TVG 50 y 100 huevos larvados, 60 días	58
Figura No. 30 Fotomicrografías de cortes histológicos: NA 50 y 100 huevos larvados, 30 y 60 días	59
Figura No. 31 Fotomicrografías de cortes histológicos: AT y C2R	60
Figura No. 32 Gráfica comparativa de la evolución de la intensidad de las lesiones en dos grupos experimentales inoculados con diferentes dosis de huevos	61
Figura No. 33 Gráfico comparativo de la presencia de mastocitos en dos grupos experimentales inoculados con distintas cantidades de huevos	62
Figura No. 34 Gráfico comparativo de la presencia de eosinófilos en dos grupos experimentales inoculados con distintas cantidades de huevos	63
Figura No. 35 Gráfico comparativo de la variación del colágeno presente en el tejido pulmonar en dos grupos experimentales inoculados con distintas dosis de huevos	64

Resumen.

En la ciudad de México existen aproximadamente 1,300,000 perros callejeros, de los cuales el 66% presentan anticuerpos anti *Toxocara canis*; un perro promedio infectado con *Toxocara* llega a eliminar 136 gramos de heces por día, liberando 10,000 huevos por cada gramo. La contaminación por *Toxocara* encontrada en los parques y calles de la ciudad de México oscila entre 60-67%, teniendo una viabilidad mayor al 80%. Los huevos de este parásito se incorporan a la tierra, al saturarse con agua, la tierra se convierte en lodo y al secarse, en polvo; el cual puede suspenderse en el aire con el viento aumentando la posibilidad de diseminación en el ambiente. Esto permite que las personas aspiren el polvo asociado a las corrientes de aire con partículas de polvo conteniendo los huevos larvados siendo factible su aspiración por la gente y que se depositen en tejido pulmonar, causando una forma diferenciada de afectación.

En este trabajo se describe el daño provocado por el depósito de 50 y 100 huevos larvados de *Toxocara canis* en las vías respiratorias de ratas evaluando en una cinética de sacrificio a los 5, 10, 30 y 60 días pi. Empleando la técnica de inmunohistoquímica y las técnicas de tinción histológica de Hematoxilina-Eosina, Tricrómica de Van Gieson, Naranja de Acridina, Azul de Toluidina y Cromotropo 2R que permiten la observación genérica del tejido o detectar diferentes poblaciones celulares.

La presencia de los huevos larvados en el tejido pulmonar de rata, fue capaz de inducir una respuesta inflamatoria progresiva en ambos grupos. Hubo un aumento gradual en las alteraciones observadas en ambos grupos de animales, las lesiones y la intensidad del daño inducido en el tejido pulmonar de los animales sacrificados dentro de los 10 días pi fue moderado, mientras que hubo un incremento entre los 30 y 60 días pi, siendo más marcado al final del estudio especialmente en el grupo de animales inoculados con 100 huevos. De acuerdo a lo observado, la evolución de las lesiones en esta forma de infección está relacionada con la dosis de huevos larvados inoculados y con el tiempo transcurrido post infección. Dentro de los primeros 10 días se observaron zonas incipientes de engrosamiento de los septos alveolares, con infiltrados celulares en los que predominaban neutrófilos, macrófagos y linfocitos que posteriormente en los tejidos de los animales sacrificados a los 30 y 60 días pi. presentaron un aumento notorio tanto en la intensidad como en el nivel de engrosamiento de los septos alveolares, en los que se mantuvo la composición de los infiltrados celulares con eosinófilos, macrófagos y linfocitos. Cabe destacar que las zonas de engrosamiento de septos alveolares más intenso fueron las situadas en la periferia de los pasajes

respiratorios tanto en bronquios como bronquiolos, sitios en los que se produjo la interacción con los huevos larvados, con patrones semejantes en ambos grupos. Durante el periodo de observación los tejidos no presentaron evidencia de que pudiese aparecer un proceso de cicatrización o reparación de las lesiones al no encontrar un incremento de colágeno que indicara un aumento de la matriz extracelular, descartando de esta manera la formación de tejido fibroso en los pulmones de las ratas por lo que se puede considerar que el proceso tendía a volverse crónico. De igual manera se observó una mayor cantidad de células cebadas en los pulmones de los animales infectados en comparación con los tejidos de los testigos, pero estas diferencias fueron irregulares en los diferentes periodos de sacrificio, lo que probablemente pudo deberse a que muchas de estas células ya se habían degranulado durante el proceso de la infección. En cuanto a los eosinófilos al no haber una migración larvaria en el parénquima, comenzaron a incrementarse a partir del día 5 pi. manteniéndose en constante incremento durante todo el periodo de observación, siendo este mayor en el grupo experimental inoculado con 100 huevos larvados; debido a que al depositarse los huevos larvados y no encontrar condiciones propicias para la eclosión, el estímulo antigénico-eosinofílico fue limitado a las zonas de interacción superficial en los pasajes respiratorios y sus zonas periféricas con los productos liberados por estos. Esta situación entonces permitió el desarrollo de agregados eosinofílicos de gran densidad.

Se evidenció la presencia de antígenos de secreción y excreción liberados a través de las paredes de los huevos que persistieron durante todo el periodo de estudio de los tejidos respiratorios los cuáles causaron un daño persistente y por otra parte a pesar de la respuesta inflamatoria evidenciada no tuvo la capacidad para eliminar la infección. Por lo anterior se concluye que la aspiración de huevos larvados de *Toxocara canis* se asocia con daño persistente al tejido pulmonar del hospedador que puede exacerbar la hiperreactividad de estas vías en personas asmáticas.

Introducción.

En el aire se encuentran suspendidos componentes físicos, químicos y biológicos que rodean e influyen en la vida de los seres vivos pudiendo derivar en el desarrollo de alguna enfermedad en el humano (Abrahams, 2006., González, 2009). La contaminación es la introducción o presencia de sustancias, organismos o formas de energía en ambientes o sustratos a los que no pertenecen o en cantidades superiores a las propias de dichos sustratos, por un tiempo suficiente, y bajo condiciones tales, que esas sustancias interfieren con la salud y la comodidad de las personas, dañan los recursos naturales o alteran el equilibrio ecológico de la zona (González, 2009).

El viento es el primer mecanismo atmosférico de transporte y que cuando inspiramos llega a nuestros pulmones alrededor de medio litro de aire que contiene partículas ambientales. Dichas partículas tienen importantes efectos en la salud, ya sea a través de sus constituyentes principales o por el hecho de facilitar la administración de contaminantes y agentes biológicos hacia el interior de los pulmones, teniendo así, una asociación directa entre los niveles elevados de contaminación del aire y los efectos adversos a la salud, afectando principalmente a los pulmones y el corazón (González, 2009).

Las helmintiasis son las infecciones causadas por gusanos parásitos, el humano no se encuentra exento de padecerlas, estas parasitosis pueden adquirirse por la ingestión o inhalación de tierra que contenga las fases infectantes de los parásitos produciendo diferentes grados de afectación en la fotografía que se muestra a continuación se muestra un huevo del nematodo *Toxocara canis* encontrado en tejido pulmonar de un jerbo, observándose una serie de cambios en el tejido que lo rodea, el hallazgo de estas alteraciones fue el que dio la pauta para desarrollar este trabajo. (Figura 1; Abrahams, 2006., González, 2009., Pérez y López, 2011).

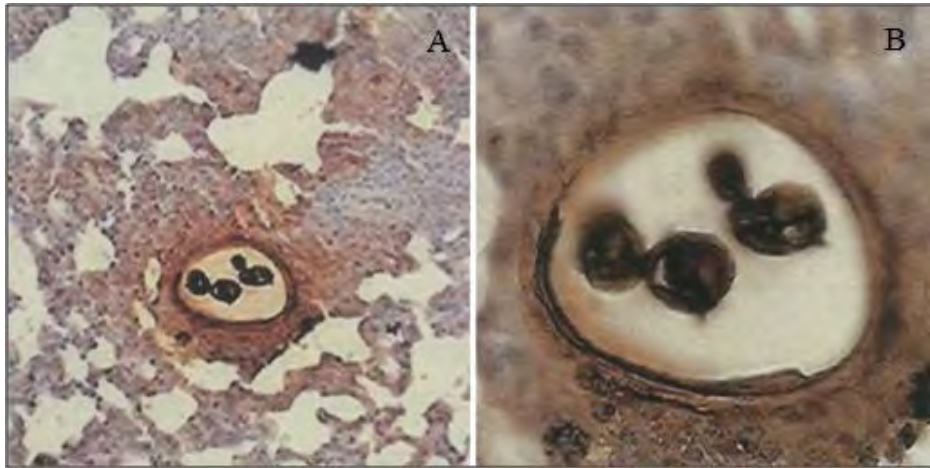


Figura No. 1. Fotomicrografías de cortes histológicos de un pulmón de jerbo con infección inducida. A) Se muestra el depósito de un huevo larvado de *Toxocara canis*, con una intensa marca en la superficie de la cubierta así como la difusión de los antígenos de secreción-excreción (TES) en la periferia de este. (IHQ, x100) B) Amplificación de la zona anterior (x400) (Modificado de Martínez, 2005).

Toxocara canis.

Toxocara canis es un nematodo de la familia *Ascaridae* que normalmente parasita el intestino delgado de los canidos. Los humanos son infectados por la ingestión accidental de huevos embrionados, consecuentemente alojan larvas de segundo estadio (L2) en sus tejidos, convirtiéndose en hospedadores paraténicos (Pecinali *et al.*, 2005).

Los gusanos adultos se caracterizan por ser de color blanco lechoso, los machos miden de 4 a 8 cm de largo por 2 a 2.5 cm de diámetro y las hembras miden hasta 18 cm de largo por 2.5 cm de diámetro (figura 2). En la parte anterior se observan tres labios bien desarrollados. Las especies del género *Toxocara*, presentan cerca de los labios a la altura del esófago un par de aletas cervicales, lo que les da la apariencia de punta de flecha. En el extremo posterior el macho termina curvado hacia su parte ventral, en donde se encuentran dos pequeñas espículas iguales y un estrechamiento terminal en forma de apéndice, mientras que las hembras terminan en forma recta; su vulva se abre en la región media del cuerpo; estas son ovíparas y producen una gran cantidad de huevos (Buendía, 2004).

Los huevos de *Toxocara canis* miden aproximadamente 85 μ m, tienen una forma subglobosa con una envoltura irregular y el protoplasma tiene apariencia granulosa (figura 3). Poseen cinco capas acomodadas de afuera hacia adentro de la siguiente manera: una membrana uterina delgada con pequeñas protuberancias; una capa vitelina representada por una membrana delgada que sigue el contorno de las crestas de una capa subyacente; una capa quitinosa gruesa (6.3 μ m); una capa con un grosor promedio de 0.35 μ m; y una zona laminar formada por la superposición de 4 ó 5 capas fibrosas con un grosor promedio de 0.6 μ m. Esta conformación le confiere al huevo una alta resistencia a condiciones ambientales y químicas desfavorables (Magaña *et al.*, 2016).

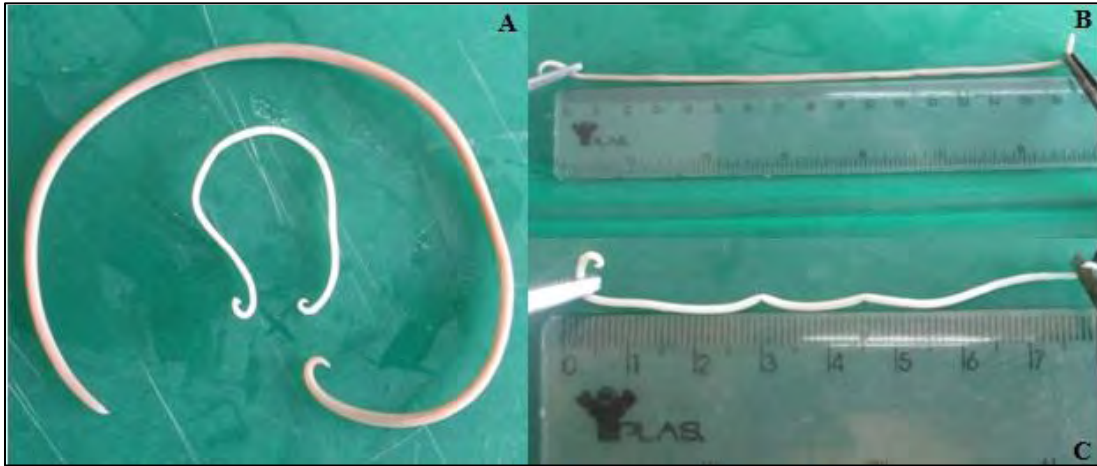


Figura No. 2. Gusanos adultos de *Toxocara canis*. A) Se muestra la comparación entre las dimensiones de los gusanos adultos de *Toxocara canis*, la hembra (exterior) es mayor que el macho (interior). B) Hembra de *Toxocara canis* de 16 cm de largo. C) Macho de *Toxocara canis* de 8 cm de largo.

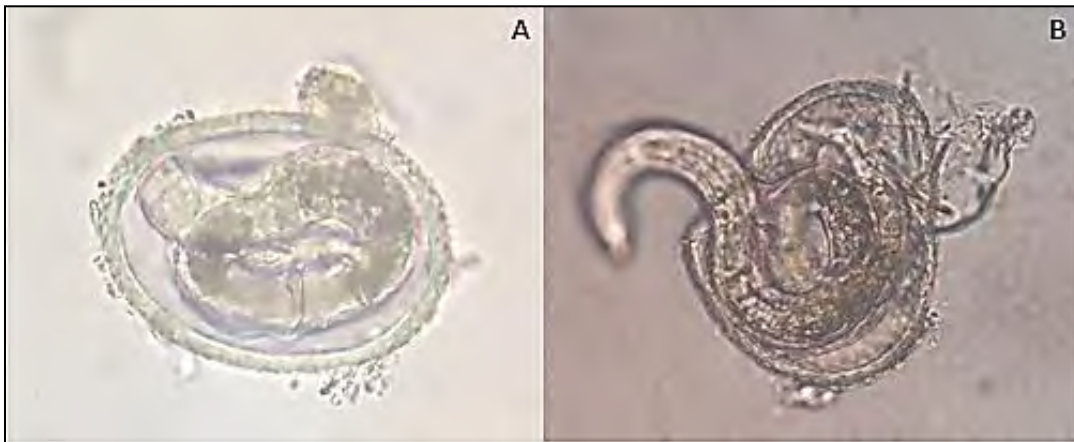


Figura No. 3. Huevo larvado de *Toxocara*. A) Se muestra el huevo larvado de *Toxocara canis*. B) Se muestra la larva de *Toxocara canis* saliendo del huevo.

Epidemiología.

Toxocara canis es un agente zoonótico con una amplia distribución geográfica debido a su carácter cosmopolita, pero que se considera endémica en la mayor parte de los países de América, África y Asia. La toxocariosis se presenta tanto en países desarrollados como en aquellos con deficientes estructuras sociales, culturales y sanitarias; y aunque es una helmintiasis poco reconocida, debido a su gran incidencia y patogenicidad en el humano es considerado como un importante problema de salud pública (Alba, 1999; Romero *et al.*, 2014).

La epidemiología de este parásito abarca factores de riesgo, como lo son la pobreza, la geofagia, la falta de educación y de programas para el control de la población o desparasitación de los hospedadores definitivos. Dentro de las principales poblaciones que se encuentran en riesgo de adquirir este parásito están los niños, esto debido al contacto directo con la tierra durante el juego, así como también las personas que están en contacto cercano con los perros, ya que pueden infectarse por la ingestión accidental de huevos embrionados presentes tanto en el suelo, como en el pelo de los perros. De igual manera se encuentran en riesgo aquellas personas que dentro de sus hábitos alimenticios se encuentra la ingesta de carne o vísceras poco cocidas de otros hospedadores paraténicos que hayan sido infectados (Calum, 2013).

Junto con los factores de riesgo asociados a la toxocariosis también presenta alta prevalencia con alto poder biótico de estos parásitos, ya que las hembras depositan hasta 200,000 huevos diarios. Además los huevos son altamente resistentes a las condiciones medio ambientales debido a que presentan una gruesa protección que estructuralmente se compone de varias capas como ya se mencionó, por lo que de esta manera son la fuente de infección para perros, humanos y otros hospedadores paraténicos (Alba, 1999; Calum, 2013; Enríquez, 2012; Martínez *et al.*, 1998;)

La epidemiología de la toxocariosis es compleja, ya que se deben abordar tres puntos así como la interconexión que existe entre ellos, siendo estos, la prevalencia y enfermedad en los cánidos, la contaminación ambiental y la toxocariosis humana. En el cuadro 1 se enlistan estudios recientes sobre la frecuencia de la toxocariosis en perros a nivel mundial en donde se reportan valores que van desde 1% hasta el 82% demostrando la alta prevalencia de este parásito en perros.

En el cuadro 2 y 3 se recuperan algunas cifras relativas a la presencia de *Toxocara canis* en muestras de parques y de suelos, a nivel internacional y puntualizándolo en el Estado de México

respectivamente, siendo estos resultados de gran interés, ya que la contaminación por la acumulación de huevos larvados en los suelos de parques y jardines constituyen uno de los factores epidemiológicos más importantes para la trasmisión de este parásito debido a que el suelo de las zonas en las que defecan los perros con toxocariosis se considera una fuente de infección constante; que junto a la acción de las lluvias, movimiento vehicular y por el desplazamiento de los humanos, es posible que los huevos se transporten a lugares distantes y alcancen grandes concentraciones en algunos sitios. Debe considerarse entonces que *Toxocara canis* es uno de los principales parásitos presentes en suelos de todo el mundo (Alba, 1999; Romero *et al.*, 2014).

La información sobre la incidencia de humanos con anticuerpos anti *Toxocara* en diferentes lugares del mundo se presenta en el cuadro 4. En este se concentra información que indica el alto grado de infestación por este parásito, sin embargo, la mayoría no presenta manifestaciones clínicas y estos solo aparecen cuando se ingieren grandes cantidades de huevos o las larvas se localizan en lugares críticos como cerebro u ojos (Alba, 1999).

Cuadro No. 1. Frecuencia de *Toxocara canis* en perros de diferentes lugares del mundo.

LUGAR	AÑO	NO. DE PERROS EXAMINADOS	TIPO DE EXAMEN	FRECUENCIA	REFERENCIA
España	1992	81	CPS (CN)	3.70%	Causap, 1996
México	1996	710	CPS (FL)	18.50%	Martínez, 1998
Italia	2002	295	CPS (FL)	33.60%	Habluetzel, 2003
Brasil	2002	271	CPS (FL)	5.50%	Oliveira, 2002
Australia	2005	1,400	CPS (CN)	1.20%	Carlyle, 2008
Irlanda	2005	100	Pelo	6.70%	Gillian, 2008
Irlanda	2005	100	N	39%	Gillian, 2008
México	2005	141	IHA	66.70%	Martínez, 2008
USA	2006	6,555	CPS (CN)	2%	Maureen, 2009
Egipto	2010	120	Pelo	19%	Wael, 2011
Egipto	2010	120	CPS (FL)	29%	Wael, 2011
Brasil	2011	301	ELISA	82.70%	Sabynne, 2011
México	2012	199	CPS (FL)	32.45%	Romero, 2013

N= Necropsia, CPS= Coproparásitoscópico CN= Concentración FL= Flotación IHA= Hemoaglutinación indirecta ELISA= Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas. Elaboración propia.

Cuadro No. 2. Frecuencia de *Toxocara canis* en parques y suelo de diferentes lugares del mundo.

LUGAR	AÑO	NO. DE MUESTRAS EXAMINADAS	FRECUENCIA	REFERENCIA
<i>México</i>	1996	935	14.60%	Martínez, 1998
<i>Chile</i>	2000	288	13.50%	Castillo, 2000
<i>Italia</i>	2002	60	52.70%	Habluetzel, 2003
<i>República Checa</i>	2003	119	19.30%	Dubna, 2007
<i>Costa Rica</i>	2007	69	7%	Durand, 2007
<i>Iran</i>	2010	180	5.80%	Saraei, 2012
<i>Brazil</i>	2011	159	29.50%	Manini, 2012
<i>México</i>	2012	2,374	24.70%	Romero, 2013

Elaboración propia.

Cuadro No. 3. Nivel de contaminación por huevos de *Toxocara spp.* en el suelo de los parques y calles en tres municipios del Estado de México.

UBICACIÓN DEL PARQUE	SUELO DE PARQUES		CALLES	
	POSITIVO (%)	VIABLE (%)	POSITIVO (%)	VIABLE (%)
Nezahualcóyotl	30.31	72.64	28.17	80
Tejupilco	25.25	58.23	20.48	64.23
Toluca	25.07	72.18	33.54	84.25

(Tomado de Romero 2014).

Cuadro No. 4. Frecuencia de anticuerpos anti-*Toxocara* de humanos en diferentes lugares del mundo.

LUGAR	AÑO	NO. DE MUESTRAS EXAMINADAS	TIPO DE EXAMEN	FRECUENCIA	REFERENCIA
<i>Italia</i>	2002	428	ELISA	1.60%	Habluetzel, 2003
<i>Turquía</i>	2006	124	ELISA *	9.70%	Semra, 2007
<i>Canada</i>	2007	251	ELISA *	5%	Campagna, 2011
<i>Brasil</i>	2011	90	ELISA *	17.80%	Manini, 2012
<i>Brasil</i>	2010	253	ELISA *	8.70%	Negri, 2013
<i>México</i>	2010	108	ELISA *	22.22%	Romero, 2013
<i>Argentina</i>	2013	60	WB	45%	Archelli, 2014
<i>Nigeria</i>	2014	366	WB*	86.10%	Gyang, 2015

WB= Western Blot. ELISA= Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas.

*Detección de Ab IgG

Elaboración propia.

Ciclo biológico.

Toxocara canis tiene un ciclo de vida muy complejo. Este varía de acuerdo con la edad a la que el perro adquiere la infección y a las formas en que el parásito llega al mismo. Las vías de infección pueden ser: trasplacentaria, calostrada, ingesta directa de huevos larvados o ingestión de un hospedador paraténico con larvas enquistadas. La infección también puede ser adquirida por un hospedador paraténico a través de la ingesta de huevos con la larva de segundo estadio (L2) (González, 2009).

La hembra de *Toxocara canis* produce huevos que son eliminados con las heces del animal infectado, bajo condiciones adecuadas de temperatura y humedad se desarrolla dentro del huevo la larva 1, luego muda a larva 2, esta última es la fase infectante para hospedadores finales o paraténicos. A temperatura de 12 a 18 °C, los huevos presentan larvas a los 54 días, pero en un intervalo de 25 a 30 °C, el tiempo se acorta hasta los 14 días. Los huevos infectantes sobreviven bajo condiciones óptimas hasta un año, si estos se mantienen a temperatura ambiente, la infectividad decrece significativamente a las diez semanas (Alatorre *et al.*, 2005).

El desarrollo de las fases adultas de *Toxocara canis* comienza cuando son ingeridos los huevos larvados (L2) por perros. Cuando estos llegan al intestino delgado, eclosionan y las L2 atraviesan la pared intestinal, penetran a vasos linfáticos o sanguíneos y migran a diferentes órganos, principalmente hígado, músculo, pulmones, ojo y cerebro. Si se trata de perros adultos permanecen como L2 encapsuladas sin alcanzar el estado adulto (González, 2009).

En cachorros, una vez que las larvas migraron a los pulmones a través de los bronquios llegan a la faringe y son deglutidas; llegan a intestino delgado, maduran a las formas adultas y comienzan la reproducción sexual, produciendo una gran cantidad de huevos por día.

En perras gestantes las larvas pueden seguir su desarrollo, ya que estas son reactivadas por mecanismos hormonales dados por la prolactina, cortisona y la oxitocina. Algunas larvas llegan al útero entre el día 40 y 42 de la gestación infectando a los cachorros antes del nacimiento; otras larvas se reactivan y migran a la glándula mamaria y son eliminadas a través del calostro y la leche. Debido a esto los cachorros pueden nacer parasitados o adquirir la infección durante la lactancia, y así los cachorros pueden eliminar huevos a partir de los 20 días de nacidos. Algunas larvas en las

perras gestantes pueden migrar a intestino y alcanzar su estadio adulto; sin embargo, estos gusanos son eliminados de manera espontánea antes de 60 días (González, 2009).

Los huevos larvados son ingeridos por hospedadores paraténicos, en los cuales no hay desarrollo de las fases adultas del parásito. Cuando las larvas atraviesan la pared intestinal y llegan al hígado, pulmones y el corazón, entran en la circulación y se distribuyen a otros órganos tales como riñón, ojo, tejido muscular y sistema nervioso central. En estos tejidos la L2 se encapsula y puede permanecer viable largos periodos (González, 2009).

Cuando un perro adulto consume un hospedador paraténico la L2 reactiva su desarrollo en él y se convierte en adulto directamente en intestino sin necesidad de migrar. Eventualmente estos perros pueden eliminar huevos de *Toxocara canis* en un corto periodo ya que los gusanos serán eliminados de manera espontánea (González, 2009).

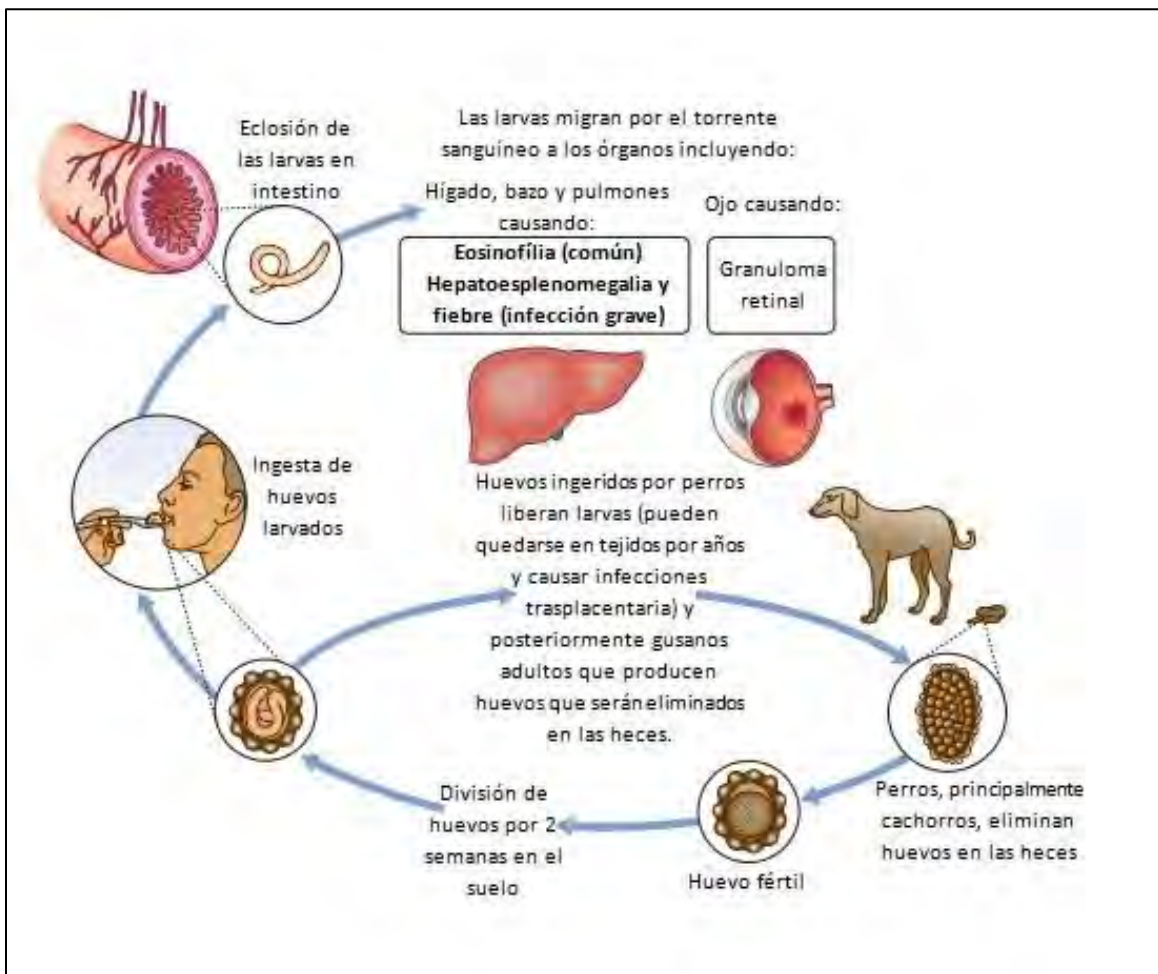


Figura No. 4. Ciclo biológico de *Toxocara canis*. (Modificado de McCarthy *et al.*, 2011).

Toxocariosis.

Toxocariosis es el término clínico usado para describir la infección en humanos ocasionada por *Toxocara canis* o *Toxocara cati*. Del mismo modo que con casi todas las otras zoonosis helmínticas, las larvas infectivas de *Toxocara* no pueden madurar a su etapa adulta en el hospedador humano. En cambio, las larvas migran a través de los tejidos buscando las condiciones necesarias para poder madurar a su fase adulta. La migración de las larvas inmaduras a través de los tejidos desencadena una respuesta inflamatoria local y sistémica, dando como resultado los síndromes de *larva migrans* (McCarthy *et al.*, 2011).

El panorama clínico de la toxocariosis en humanos ha sido clasificado en tres grupos: síndrome de *larva migrans visceral* (LMV), síndrome de *larva migrans ocular* (LMO) y la toxocariosis encubierta. El amplio espectro de consecuencias clínicas y patológicas de la toxocariosis así como la frecuencia de infecciones inaparentes pueden causar algunas dificultades al momento de identificar y clasificar los casos clínicos. La severidad y el rango de síntomas dependen del tejido invadido, el número de larvas migrando y la edad del hospedador. Se cree que la respuesta de hipersensibilidad inmediata a la muerte de la larva es la principal causa de los síntomas de la LMV. Los niños menores a 5 años son generalmente los más afectados y usualmente presentan fiebre, dolor abdominal, probablemente debido a la hepatoesplenomegalia, así como síntomas respiratorios como tos, broncoespasmos y asma causados por neumonía y bronquitis parasítica (Strube *et al.*, 2013).

Larva migrans visceral.

El síndrome de larva migrans visceral típicamente se caracteriza por eosinofilia, fiebre y hepatomegalia. Es más común en infantes con historia de “pica” y asociado a cachorros. Sin embargo, el espectro del síndrome de LMV puede incluir también tos, sibilancias, bronconeumonía y anemia. Aunque cualquier órgano puede resultar afectado, el hígado suele verse afectado con mayor frecuencia y en algunas ocasiones las lesiones se confunden con neoplasias metastásicas. Una minoría de pacientes puede llegar a desarrollar esplenomegalia o incluso presentar linfadenopatía (McCarthy *et al.*, 2011).

Entre las manifestaciones cutáneas del síndrome de LMV se encuentran la urticaria, prurito crónico y eczema, que al no ser exclusivas de la toxocariosis pueden ser asociadas a otro agente

causal. Las sibilancias son comunes y en infecciones intensas pueden presentarse casos de asma severa e hipereosinofilia. Mediante radiografías se pueden observar infiltrados pulmonares. La toxocariosis puede producir neumonía eosinofílica aguda o crónica que puede evolucionar hasta provocar una falla respiratoria. Pueden presentarse algunos problemas en articulaciones tales como monoartritis y paniculitis entre otras (McCarthy *et al.*, 2011).

Aunque es poco común, se han reportado casos de invasión directa al sistema nervioso central, teniendo como posibles manifestaciones la meningitis eosinofílica, meningoencefalitis, convulsiones, encefalopatía, aracnoiditis, lesiones cerebrales aisladas y mielitis. El corazón rara vez se ve afectado en infecciones con *Toxocara canis*, sin embargo, puede ser una complicación severa (McCarthy *et al.*, 2011).

Larva migrans ocular.

Los pacientes con LMO tienden a ser niños mayores sin evidencia de lesiones en otros órganos, lo cual sugiere un mecanismo patogénico alternativo. Las larvas de *Toxocara canis* que migran a la órbita ocular quedan atrapadas y se desencadena una respuesta inflamatoria eosinofílica. El síndrome requiere de varias semanas para ser clínicamente aparente, siendo las manifestaciones clínicas típicas déficit visual unilateral, dolor ocular, leucocoria o estrabismo. La lesión retinal más común tiene las características de un tumor cercano a la macula. En las etapas iniciales se encuentra por encima del nivel de la retina y tiene una gran semejanza a un retinoblastoma. Una vez que la fase aguda ha disminuido, la lesión permanece como una zona bien definida de degeneración retinal y es generalmente el estrabismo debido a daño macular el síntoma de presentación. En algunos casos pueden desarrollarse iridociclitis de bajo grado con sinequia subsecuente y evolucionar a endoftalmitis y finalmente provocar desprendimiento de retina. Ha habido reportes de retinocoroiditis posterior y periférica y papilitis óptica. Debido a la respuesta inflamatoria puede formarse una membrana epiretinal y haber desprendimiento de retina. En contraste con el síndrome de LMV, la hipereosinofilia, hepatomegalia y los síntomas pulmonares se encuentran ausentes (McCarthy *et al.*, 2011).

Toxocariosis encubierta.

Entran en esta clasificación aquellos pacientes que poseen evidencia serológica y que presentan síntomas ligeros o no lo presentan. El desarrollo de pruebas serológicas comerciales ha

facilitado la detección de estos individuos. Esta categoría se implementó para describir a pacientes con manifestaciones clínicas inespecíficas incluyendo tos, desórdenes del sueño, dolor abdominal, cefalea y desórdenes del comportamiento asociados a títulos elevados de anticuerpos anti *Toxocara*.

Pueden presentar eosinofilia pero en este caso es menor a la presente en el síndrome de LMV. La prevalencia de seropositividad a *Toxocara* sugiere que la mayoría de la infecciones en humanos son asintomáticas (McCarthy *et al.*, 2011).

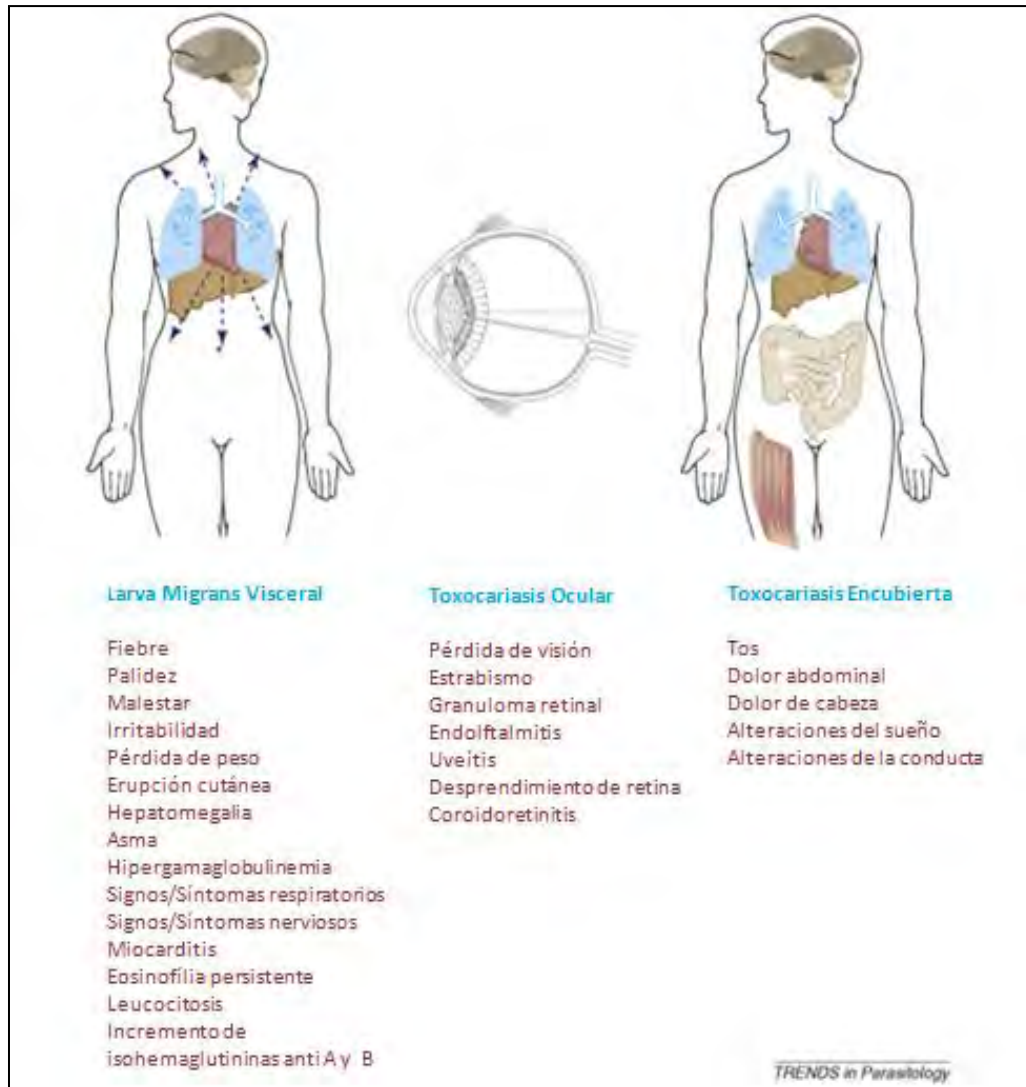


Figura No. 5. Signos y síntomas de las diferentes manifestaciones clínicas de la toxocariosis. (Modificado de Smith *et al.*, 2009).

Mecanismos patogénicos.

El daño que se presenta en el hospedador durante la infección dependerá de la fase evolutiva en la que se encuentre el parásito, siendo este principalmente causado por la migración en los diversos órganos durante la fase larvaria tanto en hospedadores paraténicos como en el definitivo (Enríquez, 2012; Pérez, 2008). La migración inicia a través de la pared intestinal, en la cual la L2 eclosiona mediante la ayuda de las proteinasas que contiene en el fluido perivitelino del huevo y de esta manera poder destruir y digerir las diversas capas de este órgano causando así lesiones traumáticas que dan lugar a focos hemorrágicos, originando una respuesta inflamatoria que puede ocasionar una atrofia en las vellosidades, hiperplasia de las criptas y desde luego daño en el epitelio mucosal (Enríquez, 2012; González et al., 2007; Martínez, 2005; Meeusen, 1999). Ya asentadas en el hígado y mediante su desplazamiento siguen presentándose zonas hemorrágicas debido a la digestión del tejido parenquimatoso o capsular alterando las funciones metabólicas propias del hígado que puede conllevar a la formación de una fibrosis hepática. Además de causar una elevación de las enzimas glutamato deshidrogenasa y alanina aminotransferasa (Martínez, 2005; Meeusen, 1999; Rodríguez *et al.*, 2014). Una vez que llegan al pulmón el daño se presenta por la destrucción del tejido provocado por la ruptura de capilares y de alveolos originándose una vez más la presencia de severas hemorragias, lo que llega a afectar la capacidad respiratoria, por esta razón se ha relacionado que en personas asmáticas puede haber exacerbación de la patología pulmonar conjuntándolo con la alergia preexistente, dejando como secuela material cicatrizal asociado a la reparación del órgano (Maizels, 2013; Martínez, 2005).

Estudios histopatológicos en cerebro de ratón han demostrado que la presencia y depósito de las larvas en el cerebro conllevan a la desmielinización y degeneración de las fibras nerviosas, así como se han registrado cambios conductuales en estos y el desarrollo de síntomas nerviosos. Mientras que estudios en el humano han demostrado que la presencia de las larvas en el tejido nervioso está asociada al bajo desarrollo y déficit cognitivo en niños (Alba, 1999; Akao *et al.*, 2003; Strube *et al.*, 2013;). Adicionalmente otros órganos pueden verse infectados por la migración larvaria como lo son: músculo cardíaco y esquelético que con la respuesta inmune ocasionan en estos una miocarditis y una polimiositis; de igual manera son capaces de infectar el riñón causando una glomerulonefritis y al ojo, donde se puede llegar al desprendimiento de la retina (Meeusen, 1999; Pérez, 2008).

La infección producida por los estadios larvarios sigue un comportamiento dependiente de la cantidad de huevos conteniendo L2 que son ingeridos por parte del hospedador (Martínez, 2005). En el hospedador definitivo al encontrarse también la fase adulta del parásito, este puede interferir con el paso de los alimentos, alterando el proceso de digestión y absorción (Pérez, 2008).

Respuesta inmunológica.

La reacción inmunológica ocasionada por *Toxocara canis* es muy similar a la que se presenta ante otros parásitos de esta índole, provocando una respuesta de tipo Th1 y Th2 pero con predominancia de esta última. Esta respuesta del hospedador estará determinada por la naturaleza de los antígenos, la cantidad de huevos larvados ingeridos y la frecuencia con la que ocurre la ingestión, el tejido en el que ocurre el depósito larvario, así como la genética y el nivel de maduración del sistema inmunológico (Kwung *et al.*, 2013; Martínez, 2005; Nussenblatt *et al.*, 2010).

Dicha respuesta Th2 regula la liberación de las citocinas IL-4, -5, -10, -13, con la finalidad de que las células inmunes implicadas, trabajen de manera orquestada para ejercer una respuesta inflamatoria. La IL-4 actúa como agente mitogénico y ayuda a promover la diferenciación de los linfocitos B, además de montar una respuesta policlonal por IgE e IgG, y es de esta manera que contribuye a la estimulación de la mastocitosis originando una respuesta inflamatoria al llevarse a cabo la degranulación de estas células. Mientras que la IL-5 es un factor quimiotáctico para eosinófilos cuya función aparte de inducir una eosinofilia tanto a nivel local como a nivel sanguíneo, es capaz de promover la diferenciación y función de estos mismos (Kwung *et al.*, 2013; Maizels, 2013; Martínez, 2005). Por lo que durante la infección con *Toxocara canis* dos principales características en la respuesta del hospedador son, la marcada eosinofilia así como una hipergammaglobulinemia (Kwung *et al.*, 2013).

Actualmente se sabe que durante una infección ocasionada por helmintos, no sólo se presenta el daño ocasionado por la patogenicidad *per se* del parásito, sino que al interactuar con el sistema inmune del hospedador, éstos son capaces de modularlo para que se vea alterada la respuesta ante otros patógenos o que la misma respuesta inflamatoria ocasione mayor daño que el parásito (Mulcahy *et al.*, 2004; Nussenblatt *et al.*, 2010). En este caso, la constante liberación de los antígenos de secreción y excreción de *Toxocara canis* es un estímulo que conlleva a la prevalencia de la eosinofilia, así como a la producción de anticuerpos del isotipo IgE, dando como resultado que aparezcan complicaciones sistémicas (Kwung *et al.*, 2013).

El papel de los eosinófilos está enfocado a la eliminación del parásito por medio de su unión a los complejos antígeno-anticuerpo para que así tengan la capacidad de activarse y poder liberar sus gránulos citotóxicos, dentro de los cuales se secretan distintas proteínas catiónicas como la neurotoxina derivada del eosinófilo, la proteína catiónica eosinofílica, la peroxidasa eosinofílica y la proteína básica mayor, junto con otros radicales libres. No obstante esta respuesta no es eficaz debido a que los estadios larvarios tienen la capacidad de resistir este ataque ya que pueden desprenderse de su envoltura sin que estos se vean comprometidos (Maizels, 2013; Martínez, 2005).

La respuesta inflamatoria también comprende la participación de neutrófilos y macrófagos, que junto con los eosinófilos forman agregados celulares que se encuentran rodeados de una capa de fibrocitos, colágeno y células epiteliales. Donde se llega a contener dentro de estos granulomas a las larvas, pero que finalmente logran liberarse de estos y continúan con su migración, dejando por un lado dentro de los granulomas un contenido antigénico derivado de los antígenos secretores-excretos (TES). Estos antígenos al encontrarse presentes siguen siendo un estímulo que genera la permanencia de las células inflamatorias conllevando así a la patología asociada a esta respuesta (Alba, 1999; Kwung *et al.*, 2013; Martínez, 2005).

El hígado y los pulmones son dos de los principales órganos afectados en muchas helmintiasis debido a que son parte de la ruta de la migración del parásito y que al actuar como filtros de estos, se ven afectados a consecuencia de la inmunopatología. Siendo que los mecanismos patogénicos son similares en estos órganos, los síntomas clínicos varían dependiendo de su condición fisiológica, del grado de compromiso en que se encuentren y, en función de que tan violenta sea la respuesta inflamatoria, así como del número de parásitos presentes (Meeusen, 1999). La presencia de las larvas en el pulmón, es de especial interés ya que inducen hiperreactividad en las vías respiratorias mediada principalmente por los productos eosinofílicos dañando el epitelio respiratorio que de esta producen necrosis del mismo generando un aumento de la respuesta inflamatoria, que a su vez lleva la consiguiente liberación de quimiocinas que incrementan el infiltrado celular. De igual manera es necesario mencionar a la población celular de linfocitos doble negativos (CD4⁻ CD8⁻), que se encuentran distribuidos en el pulmón, y que favorecen aún más el estímulo eosinopoyético ocasionado por la liberación de la IL-5, por lo que influyen de gran manera en la patogenia pulmonar, encontrada principalmente durante la primera fase migratoria de *Toxocara canis* (Foster *et al.*, 2002; Maizels, 2013).

Estudios actuales han descrito la participación de linfocitos T reguladores durante la infección de *Toxocara canis*; esta población se encarga principalmente de mantener una homeostasis en el sistema inmunológico mediante la supresión de la expresión de ciertas citocinas inhibiendo así la proliferación de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, generando un balance entre las respuestas Th1 y Th2. Durante ciertas infecciones parasitarias se ha visto que contribuyen a mantener una regulación de la inmunopatología provocada por estas, pero a su vez esta regulación permite la supervivencia de los patógenos, por lo que este mismo perfil puede ser regulado a conveniencia del parásito para generar condiciones favorables que le permitan su persistencia en el hospedador (Kwung *et al.*, 2013). En el caso de *Toxocara canis* aún no se ha descrito la importancia de estas células, pero se ha reportado su presencia de manera indirecta en los granulomas que se encuentran presentes en el hígado por medio de la elevada expresión del factor de crecimiento tumoral beta, (TGF- β) ya que esta citocina además de promover la producción de colágeno y del desarrollo de la fibrosis, es también necesaria en la supervivencia y función de los linfocitos T reguladores (Kwung *et al.*, 2013; Martínez, 2005;). Junto con esta población se ha descrito la actividad de los macrófagos alternativamente activados (AAM) en el tejido pulmonar y se propone que su actividad está relacionada con la reparación y protección de la inmunopatología causada por *Toxocara* durante y después de la interacción del estadio larvario en su migración (López *et al.*, 2013).

Es ampliamente aceptado que la respuesta de tipo Th2 no es siempre efectiva para combatir a las fases extraintestinales de algunos helmintos, siendo que la respuesta humoral en los hospedadores paraténicos contra la larva 2 de *Toxocara canis* no ejerce una efectiva función protectora (López *et al.*, 2013). Esto se debe a que se ha comprobado en varios modelos experimentales que la producción de anticuerpos no reduce la cantidad de larvas durante la infección. Los mecanismos involucrados en esta falta de protección son varios, el primero de ellos se relaciona con que la respuesta de anticuerpos que se monta principalmente contra los TES, los cuales son excretados hacia al exterior del parásito ejerciendo efectos quimiotácticos sobre neutrófilos y eosinófilos, además de que el parásito tiene la facilidad de desprenderse de su cubierta, quedando de esta manera protegida contra el reconocimiento de los anticuerpos y la subsecuente fijación del complemento o de las células efectoras. Otro mecanismo propuesto es el efecto mitogénico de los antígenos de *Toxocara* sobre los linfocitos B teniendo como resultado la producción de una gran cantidad de anticuerpos no específicos así como de autoanticuerpos (Alba, 1999; Martínez, 2005). Este incremento policlonal inespecífico de IgE genera el bloqueo de los receptores de membrana de las células eosinófilas impidiendo así su unión con las larvas, de

manera que son incapaces de llevar a cabo de manera efectiva su función protectora. Todo este mecanismo representa un gran desgaste para el hospedador, que resulta inservible puesto que el parásito tiene la habilidad de seguir renovando de manera permanente los TES amplificando el detrimento de los tejidos del hospedador por la respuesta inmunológica (Martínez, 2005).

Antígenos de secreción y excreción.

Son productos antigénicos que se originan en la glándula esofágica, secretados por medio de la cavidad oral o liberados a través de las ramificaciones caudales que se encuentran en esta glándula y que desembocan por el poro excretor de la larva. De esta manera se integran a la cutícula para así ir formando la epicutícula mostrada en la figura 6 que tiene aproximadamente 10-20 nm de espesor y cuya función se asemeja a la de una barrera, ya que se encarga de aislar y cubrir al parásito (Pérez, 2008).

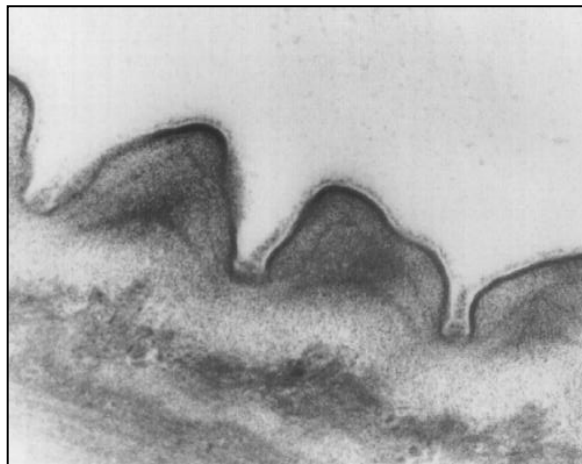


Figura No. 6. Cutícula de la fase larvaria de *Toxocara canis*. Se muestra el recubrimiento de la superficie.
(Tomada de Maizels y Page, 1990).

Por medio de la aplicación de metodologías y técnicas cada vez más sofisticadas se ha permitido la identificación de al menos 50 distintas moléculas en los sobrenadantes de los cultivos larvarios y que se han caracterizado como mucinas, lectinas de tipo C y como proteínas de unión a la fosfatidiletanolamina (Maizels y Page, 1990; Martínez, 2005). Dentro de la composición de estas glicoproteínas se presentan principalmente dos azúcares importantes la N-acetilgalactosamina y la galactosa, como se muestra en el cuadro 5 (Alba, 1999). Se ha comprobado que estos glicoconjugados, son de suma importancia en la relación hospedador-parásito, ya que tienen la capacidad de modular la respuesta inmunológica del hospedador (Grieve, 1990), esto debido a que una de las funciones que tienen estos antígenos es permitir la sobrevivencia y adaptación del

parásito en los tejidos del hospedador, siendo esto un factor importante en el parasitismo (Martínez, 2005).

Cuadro No. 5. Composición de los Carbohidratos presentes en los TES

AZÚCAR	µg/mg PROTEÍNA
N-Acetilgalactosamina	401.4
Galactosa	168.2
Manosa	43.7
N-Acetilglucosamina	32.9
Glucosa	23
Fucosa	16.2
Xilosa	1.5

(Tomado de Meghji y Maizels, 1986).

Dentro de la actividad biológica los TES se han relacionado con la exacerbación de las respuestas alérgicas, activación del complemento y estimulación eosinofílica (Meghji y Maizels, 1986). Además de ejercer distintos mecanismos de inmunoevasión que favorecen la actividad parasitaria. Entre ellos se encuentra la capacidad que tienen de desprenderse de la superficie de la cutícula o epicutícula, al llevarse a cabo la interacción con los anticuerpos, proteínas del complemento, así como por los receptores de las células eosinofílicas, que por medio de citocinas y quimiocinas fueron atraídas al lugar donde se monta la respuesta. Estas células junto con macrófagos, linfocitos, fibroblastos, etc, inducen a la formación de granulomas, donde se lleva a cabo la liberación de productos tóxicos como resultado del intento de eliminar al cuerpo extraño, pero que gracias a la capacidad que tiene de desprenderse de la epicutícula el parásito puede liberarse del interior del granuloma y posteriormente renovar esta superficie, esto sin que se vea afectada la viabilidad de las larvas. Otro efecto que tienen estos antígenos es la patología asociada a la respuesta inmunológica, que por medio de sus distintos mecanismos efectores, promueve la pérdida de la función y destrucción de los tejidos del hospedador (Callister *et al.*, 2008).

El TES 26 es un antígeno que se ha caracterizado como una proteína de unión a la fosfatidiletanolamina y que al encontrarse en la cutícula del estadio larvario (L2) le permite la unión a la membrana citoplasmática del hospedador (Pérez, 2008). El TES 32 muestra una gran similitud con las lectinas de tipo C, las cuales se encuentran relacionadas con el sistema inmune, ya que estas glicoproteínas forman parte de los receptores de las células de este sistema, como lo son la selectina, el receptor de baja afinidad para IgE, así como otros receptores que se encuentran en las células dendríticas o células asesinas (NK; por sus siglas en inglés); Esta proteína forma parte de la

capacidad inmunoevasora que tiene el parásito para contrarrestar dicho sistema, mediante el mimetismo molecular que tiene con estos receptores o a través de la competición por los ligandos de las selectinas que se encuentran en la superficie de las células del hospedador. Bloqueando de esta manera la adhesión de las células leucocitarias al endotelio vascular y evitando que se lleve a cabo o se retrase el proceso de infiltración celular hacia al tejido, en respuesta al proceso inflamatorio, como se muestra en la figura 7 (Maizels y Page, 1990; Martínez, 2005). De igual manera los TES 45, 55 y 70 tienen propiedades de lectina, perteneciendo así a la misma familia que el TES 32, además de que este último tiene la capacidad de precipitar a los anticuerpos.

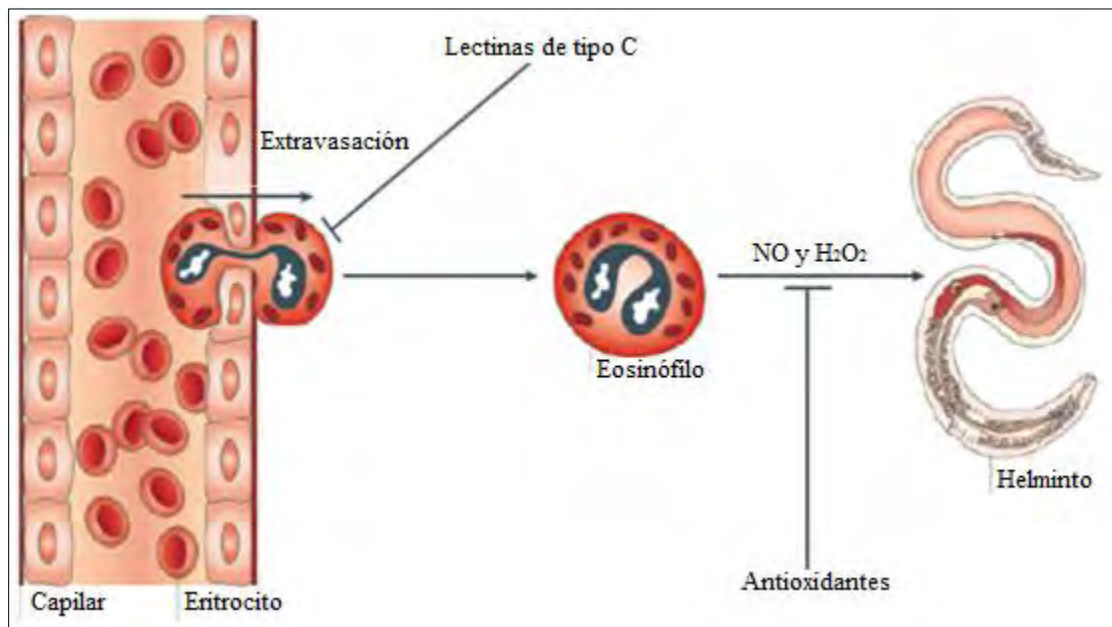


Figura No. 7. Mecanismos Inmunoevasores. El TES-32 interfiriendo con los pasos de la respuesta inmune como lo es la extravasación mediada por el reconocimiento de las selectinas en las células endoteliales por los leucocitos. Así como la inhibición de los especies reactivas de nitrógeno y oxígeno por medio de enzimas antioxidantes presentes en los TES (Modificado de Maizels y Yazdanbakhsh, 2003).

El TES 120 es una mucina que se encuentra altamente glicosilada y que es de suma importancia para el parásito ya que es el componente más abundante en la cubierta de las fases larvianas de *Toxocara canis*, formando una lámina que recubre a la cutícula de este nematodo y que se encuentra en constante renovación tal y como se muestra en la figura 8. Este producto antigénico está compuesto por 3 componentes que se pueden distinguir en las bandas formadas cuyo corrimiento electroforético consiste en una movilidad en los 120 kDa. Dentro de las características que hacen de gran importancia a este componente se encuentra su resistencia a la tripsina, quimiotripsina y pepsina ya que no son capaces de poder degradar esta cubierta permitiendo que la

larva pueda sobrevivir en el tracto gastrointestinal (Meghji y Maizels, 1986), además de ser la principal proteína responsable del desprendimiento de la superficie larvaria ante la interacción con los componentes del sistema inmunológico del hospedador, protegiendo y asegurando la supervivencia de la larva.

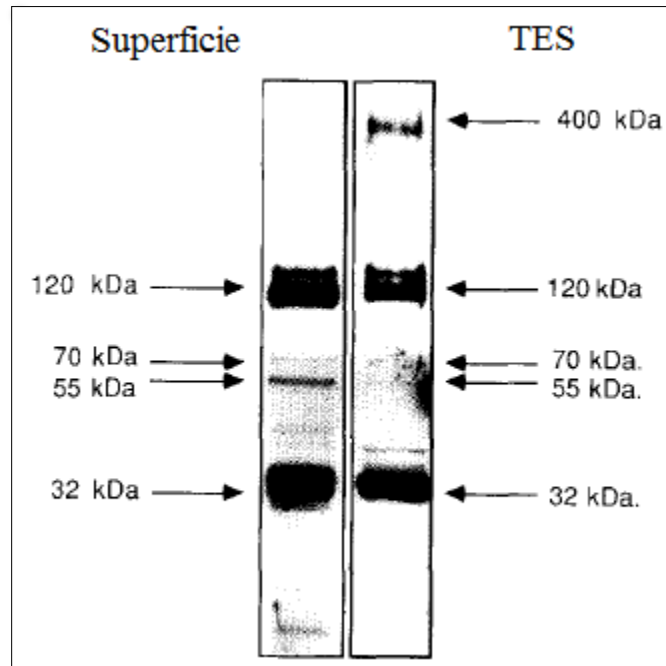


Figura No. 8. Corrimiento electroforético de las glicoproteínas de la superficie larvaria y de los antígenos de secreción excreción de *Toxocara canis*. Se muestra la similitud antigénica que presentan los TES con la superficie de la cutícula larvaria. (Tomada de Maizels y Page, 1990).

Otro antígeno secretado por *Toxocara canis* es el TES 400 que ha sido caracterizado como un proteoglicano que al igual que los TES 32, 45, 55 y 70; el TES 400 posee dominios de lectina. Estos antígenos de excreción y secreción también se ven involucrados en los procesos de nutrición y en la penetración hacia los tejidos (Fakhar *et al.*, 1987), mediante enzimas proteolíticas que pertenecen a la familia de las cisteín proteasas, como lo son las catepsinas y la asparaginil endopeptidasa (Maizels, 1990). De igual manera se ha reconocido la presencia de la super óxido dismutasa, que al ser una enzima de carácter antioxidativo desempeña su función eliminando los radicales libres provenientes del estallido respiratorio, siendo así otra manera de contrarrestar la respuesta inmunológica (Maizels *et al.*, 2000). Finalmente se han detectado proteínas que son homólogas a los alérgenos de veneno, así como también a la aquaporina y a la prohibitina, la primera de estas se encuentra relacionada con la elevada presión hidrostática que presentan los cuerpos de los nematodos y que permiten la locomoción de estos. Mientras que la última de ellas es

un inhibidor del ciclo celular relacionada con el proceso de arresto larvario (Martínez, 2005; Schabussova *et al.*, 2007).

Debido a la actividad biológica de estos antígenos, se ha propuesto que son un factor importante en los mecanismos de inmunoevasión del parásito, puesto que son las proteínas contra las que se monta principalmente la respuesta inmune pero que al ser secretadas al exterior del helminto, la respuesta inmune no es capaz de cumplir con su función protectora. Por lo que los TES sirven como distractor del sistema inmunológico significando así un desgaste para el hospedador además de que se asocia la patología y pérdida de la función de los tejidos por la presencia del proceso inflamatorio (Alba, 1999; Pérez, 2008).

Diagnóstico.

La toxocariosis es una zoonosis presente en muchos países independientemente de su condición económica. Sin embargo, el número de casos reales de toxocariosis se encuentra subestimado debido a la falta de programas de vigilancia adecuados. Aunque existen algunas pruebas diagnósticas, es necesario mejorar su sensibilidad y su especificidad. La toxocariosis es catalogada como una de las cinco enfermedades más importantes que se encuentran descuidadas de acuerdo al CDC (García *et al.*, 2014).

Las técnicas coproparásitoscópicas son las preferidas para la detección de nematodos gastrointestinales debido a que son sencillas y accesibles para la mayoría de los centros médicos, sin embargo, el desarrollo de fases adultas capaces de ovopositar en el intestino no se lleva a cabo en humanos, haciendo que estas técnicas pierdan su utilidad.

La diversidad de condiciones clínicas asociadas a los diferentes órganos donde las larvas de *Toxocara* pueden presentarse hace difícil el diagnóstico de la toxocariosis. Es por ello que el diagnóstico definitivo se realiza por medio de biopsias y la detección visual del parásito. Debido a que es un procedimiento extremadamente invasivo y depende de la carga larvaria y el estadio de la infección, no suele recomendarse y es por eso que se han desarrollado nuevos métodos inmunológicos de diagnóstico (García *et al.*, 2014).

Pruebas no específicas.

- Conteo sanguíneo.

En el síndrome LMV, los conteos sanguíneos siempre mostraban la presencia de eosinofilia sanguínea, la cual se encontraba muy marcada y en ocasiones era masiva, aproximadamente 10,000 células/mm³. En la toxocariasis encubierta los valores de la eosinofilia sanguínea en promedio son menores, aproximadamente 1500 células/mm³. En la toxocariosis ocular, los niveles de eosinofilia sanguínea por lo general se encuentran dentro del intervalo normal debido a que la infección es causada únicamente por una larva. Sin embargo, cuando el ojo se ve afectado debido a la migración de la larvas durante una infección generalizada la eosinofilia sanguínea se manifiesta (Fillaux y Magnaval, 2013).

- Examen citológico de otros fluidos.

La presencia de larvas de *Toxocara canis* en el SNC generalmente se encuentra acompañado de eosinofilia y pleocitosis en el líquido cerebro espinal (CSF). La presencia de eosinófilos también se reportó en el humor vítreo en la toxocariasis ocular, sin embargo, el poco volumen de este tipo de muestra hace esta técnica poco útil en la práctica (Fillaux y Magnaval, 2013).

- Niveles totales de IgE sérica.

En la infección típica por *Toxocara canis* el 79% de los pacientes presentan un incremento en el nivel total de IgE sérica (Fillaux y Magnaval, 2013).

Inmunodiagnóstico.

La prueba de ELISA para detectar IgG anti Ag TES (IgG TES-ELISA) se ha convertido en la prueba de referencia para el inmunodiagnóstico de la toxocariasis (Fillaux y Magnaval, 2013). Debido a que los TES son altamente inmunogénicos durante la infección, han sido el blanco de los estudios para la realización de nuevos métodos de diagnóstico (García et al., 2014). Jaquier et al. reportaron la ocurrencia de reacciones cruzadas cuando se analizaban sueros de pacientes con estrongiloidiasis o triquinelosis. Esto correlacionaba con lo reportado por Lynch et al. que demostraron que los sueros de pacientes con ascariasis inducían resultados elevadamente positivos. El indisputable problema de especificidad que presentaba la prueba de TES-ELISA al ser empleada en sueros de pacientes con la sospecha de múltiples parasitosis incitó el desarrollo de un método más específico sin una pérdida significativa de sensibilidad. En la estela de la

mejora del inmunodiagnóstico del HIV, un método de diagnóstico empleando la técnica de Western Blot (WB) para detectar IgG específicas anti Ag TES fue establecido a finales de los años 80's por Magnaval et al. (Fillaux y Magnaval, 2013). Estadísticamente, el ensayo de WB se correlaciona bien con TES-ELISA, pero el primero resulta más específico para patrones de bandas correspondientes a fracciones de bajo peso molecular, evitando así problemas de reactividad cruzada con sueros infectados con otras enfermedades helmínticas (Magnaval *et al.*, 1991).

Tratamiento.

La decisión de tratar la toxocariasis puede resultar difícil, algunos autores se cuestionan la necesidad de tratarla debido a su naturaleza subclínica, por otro lado algunos se preocupan por las posibles respuestas alérgicas que se desencadenan a raíz del tratamiento con antihelmínticos ya que en algunos casos, como en la LMO, dichas respuestas pueden ser peores que la misma infección. Sin embargo, la toxocariasis humana es de carácter crónico lo cual puede resultar en una reactivación en la migración de las larvas y estas pueden llegar al cerebro y al ojo. Es por lo anterior que se requiere un tratamiento específico para el síndrome de LMV y algunos casos de toxocariasis encubierta. En el caso de LMO y de la neurotoxocariasis dependerá de lo observado en el aspecto clínico y pruebas de laboratorio, sin embargo, debido a las reacciones alérgicas el tratamiento antihelmíntico debe ir siempre acompañado de un tratamiento para prevenir reacciones alérgicas.

Entre los fármacos disponibles para el tratamiento de la toxocariasis se encuentran los derivados bencimidazólicos, la dietilcarbamacina o las lactonas macrocíclicas como la ivermectina y se han desarrollado pruebas en animales para evaluar la eficacia del levamisol y la nitazoxanida. (Ahmad, 2012).

En el caso de los derivados bencimidazólicos se han hecho pruebas en animales para comparar la eficacia relativa de cada una. Diversos estudios han encontrado que el tiabendazol produce una marcada disminución en la migración larvaria aunque su efecto larvicida es muy pobre. El mebendazol resultó efectivo en la reducción en el número total de larvas. En el caso de los humanos el panorama es menos claro debido a las pruebas clínicas. Se realizó una prueba para comparar la efectividad del tiabendazol contra el albendazol siendo este último más efectivo. El estudio recomendaba el uso del albendazol para el tratamiento del síndrome de LMV y LMO como una dosis mínima de 10 mg/Kg diario durante 5 días. Se han realizado pruebas para el mebendazol

concluyendo que este posee una eficacia moderada para el tratamiento de la toxocariasis. (Ahmad, 2012).

Hoy en día el albendazol se ha convertido en un fármaco común en el tratamiento de la toxocariasis, posiblemente debido a la ausencia de reacciones adversas en la mayoría de los países. Por otro lado el tiabendazol ha resultado moderadamente efectivo, pero debido al alto índice de efectos secundarios no deseados rara vez recomendado y en algunos países ha sido retirado del mercado. (Ahmad, 2012).

En el caso de la ivermectina los médicos se ven tentados a usarla debido a que puede administrarse en una sola dosis de 12 mg y posee pocos efectos secundarios. Sin embargo, no se han realizado estudios controlados para verificar su efectividad. Cuando ha sido probado en casos de toxocariasis encubierta ha demostrado tener solo un 40% de efectividad en la reducción de las manifestaciones clínicas y no hubo disminución en el conteo sanguíneo de eosinófilos. Por lo tanto son necesarios más estudios para evaluar el uso de la ivermectina como tratamiento de la toxocariasis. (Ahmad, 2012).

Justificación.

Toxocara canis es un nematodo que parasita a los canidos, de gran potencial zoonótico siendo capaz de parasitar al humano en el cual puede inducir tres tipos de síndromes, el de *larva migrans visceral*, *larva migrans ocular* y toxocariosis encubierta. La evolución de las entidades clínicas, durante la infección se ven relacionadas con la interacción física del parásito con el hospedador durante la migración o depósito larvario así como por la liberación de los antígenos de secreción y excreción, que llevan a la aparición de hemorragias ocasionadas por la destrucción de los tejidos, además del daño que se encuentra asociado al proceso inflamatorio que conlleva a la formación de granulomas que se encargan de encapsular a la larva, la cual llega a tener la capacidad de permanecer viable por un periodo prolongado así como también puede escapar de la respuesta del sistema inmunológico.

Además de la capacidad que tiene para infectar a otros hospedadores más allá del definitivo, existe un alto riesgo de infección humana ya que tan solo en la ciudad de México existen aproximadamente 1,300,000 perros callejeros, en los cuales se han llegado a reportar una seroprevalencia de anticuerpos anti *T.canis* del 66%, indicando así que han estado en contacto con el parásito (Martínez *et al.*, 2008). Un perro promedio llega a eliminar 136g de heces por día y que con una infección ligera de *T. canis* resulta en la liberación de 10,000 huevos por cada gramo de heces, que estos al ser eliminados en la calle algunos encontrarán las condiciones apropiadas para sobrevivir en el suelo permaneciendo viables por años (Ahmad *et al.*, 2011). Siendo que la contaminación por *Toxocara* spp. encontrada en los parques de la ciudad de México es de 60-67%, mientras que en el Estado de México oscila entre 25-30% llegándose a reportar de 3-6 huevos por gramo de suelo, con una viabilidad mayor al 80% (Romero *et al.*, 2013; 2014).

La falta de atención respecto a medidas sanitarias por propietarios de perros o por autoridades, tales como la limpieza periódica de los parques removiendo las heces, así como el control integral de los parásitos en cánidos y mantenimiento de las vialidades incrementa el riesgo de infección debido a la facilidad con la que los huevos son integrados en la tierra, además la lluvia convierte en lodo la tierra que es transportada por vehículos y los propios pies; que al secarse se convierte en polvo que contamina superficies. Este material tiene un elevado potencial para suspenderse en aire con el viento generado por los cambios de temperatura o el movimiento vehicular aumentando su diseminación en el ambiente. Esto causa que humanos o animales respiren el polvo que contiene los huevos larvados provocando su depósito en el tejido pulmonar causando

una forma diferenciada de afectación, situación que no ha sido estudiada ya sea en el caso de este nematodo como el de otros geohelminthos, lo que nos llevó a la realización de este trabajo con la finalidad de estudiar este tipo de interacción. En este caso las estructuras se impactan en el tejido pulmonar y se mantienen pasivas, actúan como cuerpo extraño que adicionalmente liberan, a través de sus cubiertas sus productos de secreción y excreción que son responsables de generar una violenta respuesta inflamatoria.

Hipótesis.

La aspiración de huevos larvados de *Toxocara canis* ocasionará el desarrollo de una respuesta inflamatoria en el tejido pulmonar de ratas Wistar, originada por su presencia y debido tanto a los antígenos de la cubierta del huevo como a la liberación de los antígenos de secreción y excreción, provocando el colapso del tejido pulmonar y generando cambios tisulares. De esta manera se simula la posible afección que se desarrollara en el humano en caso de inhalación de partículas de polvo contaminadas con huevos larvados de *Toxocara canis*.

Objetivos.

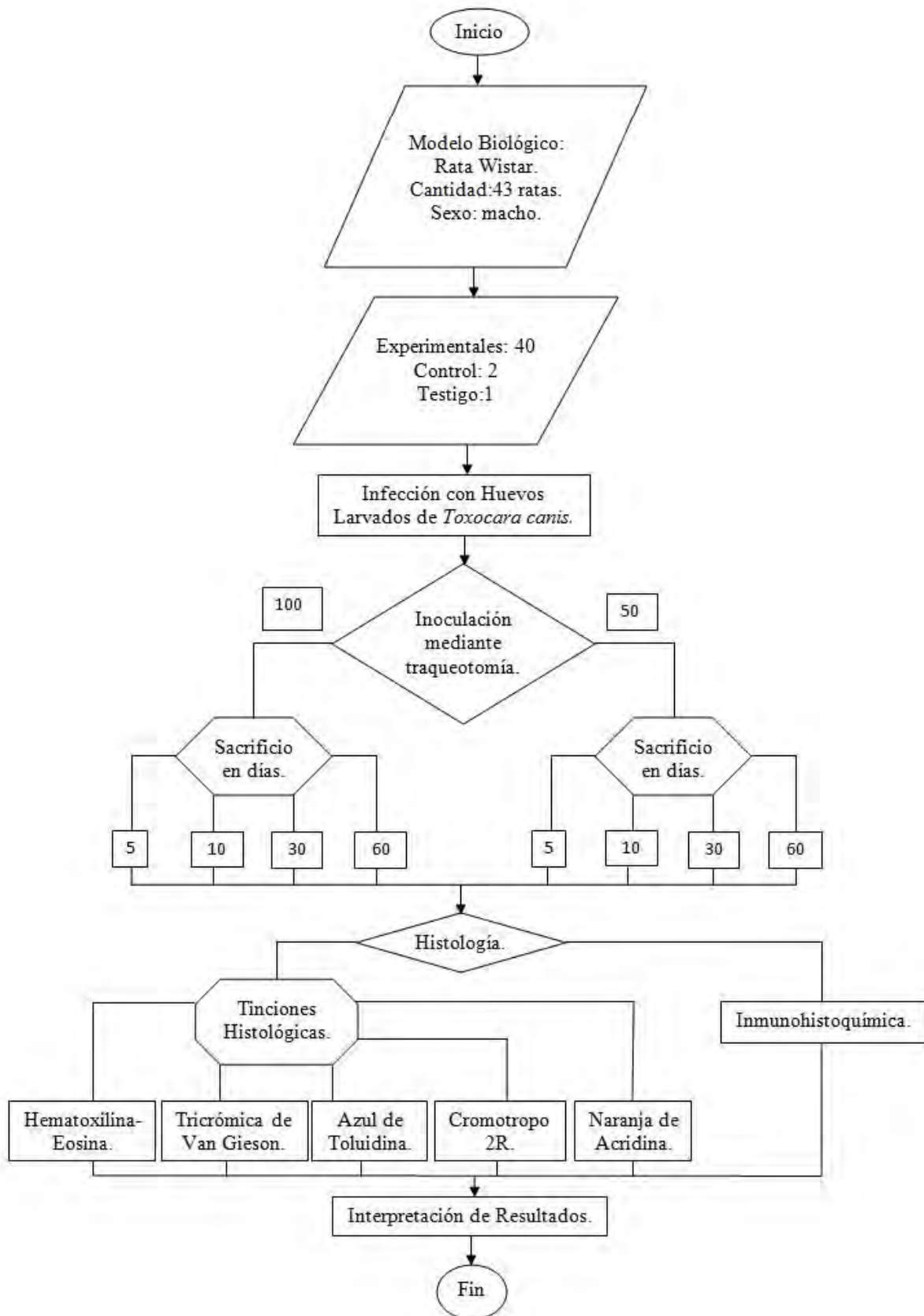
Objetivo general:

Estudiar los efectos de la presencia de huevos larvados de *Toxocara canis* en el tejido pulmonar de ratas Wistar por la inoculación de dichos huevos, que en la naturaleza pueden ser encontrados como contaminantes suspendidos en el aire, y caracterizar así las alteraciones microscópicas que se encuentren en esta forma diferenciada de infección, en comparación a las presentadas por los otros síndromes generados por este nematodo.

Objetivos particulares:

- I. Contribuir al estudio de las lesiones pulmonares asociadas a las fases infectantes de *Toxocara canis* utilizando ratas Wistar como modelo biológico.
- II. Estudiar la evolución de las lesiones mediante diversas técnicas histopatológicas y la técnica de Inmunohistoquímica, para evidenciar el papel de los antígenos de excreción secreción y de los antígenos somáticos larvarios de *Toxocara*.
- III. Estudiar la evolución en la composición de los infiltrados celulares presentes en el tejido pulmonar de los animales infectados, por medio de distintas tinciones histológicas evidenciando así las células inflamatorias presentes ocasionadas por la presencia de los huevos larvados.

Diagrama de flujo.



Material y métodos.

Material biológico.

Cadáveres de cachorros menores de 6 meses de edad capturados por el personal del Centro de Control Canino del Municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México de sexo indistinto y 43 ratas Wistar, que fueron alojadas en cajas de policarbonato destinadas a su mantenimiento, suministrándoseles agua y alimento para roedores *ad libitum*. Para la obtención de un suero policlonal con anticuerpos de isotipo IgG anti *Toxocara canis* se inocularon cinco conejos machos de raza Nueva Zelanda, estos anticuerpos se utilizaron para el marcaje de los antígenos durante el proceso inmunohistoquímico. Estos se alimentaron con un producto comercial y agua *ad libitum*, albergándolos en jaulas con mantenimiento de limpieza diariamente. En el manejo de animales se cumplieron con las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio como lo son: la movilización, técnicas experimentales, eutanasia y medidas de bioseguridad que se encuentran contempladas en la NOM-062-ZOO-1999.

Protocolo experimental.

Obtención de parásitos adultos y cultivo de huevos de *Toxocara canis*.

Se colectaron parásitos adultos de *T. canis* a partir del intestino delgado de los perros capturados por el Centro de Control Canino con infección natural, después de obtenidos se depositaron en agua, enjuagándolos y posteriormente se separaron las hembras. Las hembras de *T. canis* fueron depositadas en cajas Petri con solución salina fisiológica (SSF) formolada al 2% y se disectaron para extraer el útero por una incisión en la parte media del cuerpo, posteriormente el útero fue seccionado para extraer los huevos. Los huevos se sometieron a centrifugación a una velocidad de 600g por 5 minutos para eliminar el exceso de contaminantes. El botón de huevos sedimentados fueron colocados en cajas Petri con SSF formolada al 2% y se incubaron en una estufa bacteriológica a una temperatura entre 20 y 22 °C durante 28 días para lograr el desarrollo de la larva 2 pasiva infectante. Al término del proceso se verificó la viabilidad de los cultivos mediante la observación al microscopio del movimiento larvario dentro de los huevos. La estimación de huevos en el inóculo se realizó contando al microscopio 10 veces el total de huevos larvados

presentes en 50 μ L de cada cultivo, depositados en un portaobjetos, se sacó el promedio y se multiplicó por 20, el resultado fue el número de huevos larvados por mL de medio.

Infeción experimental.

Se utilizaron 43 ratas que fueron divididas en dos grupos experimentales, cada uno con 20 ratas y uno con control y testigo de 3 animales. Los grupos se inocularon directamente por la tráquea, de modo que fueron sedados por medio de xilazina haciendo una incisión en la piel a la altura de la tráquea de aproximadamente 2 cm, por la que se depositó el volumen de suspensión con 50 y 100 huevos larvados de *Toxocara canis* respectivamente. Los animales se mantuvieron en observación durante los primeros días junto con la aplicación de timerosal como lavado antiséptico. Posteriormente se sacrificaron 5 animales de cada grupo a los días 5, 10, 30, 60, obteniéndose por disección los pulmones y que fueron fijados con formol para su procesamiento histopatológico.

Procesamiento histopatológico.

Se realizaron cortes transversales a la altura de los bronquios primarios de los pulmones de cada rata para su posterior tinción con hematoxilina y eosina, tricrómica de Van Gieson, naranja de acridina, azul de toluidina y cromotropo 2R para evaluar las alteraciones inducidas, además de varios cortes blanco para su uso en inmunohistoquímica mediante el método ABC (Avidin-Biotin Complex) para demostrar la presencia de los TES. Llevando a cabo el procedimiento que se describe a continuación:

1. Fijación: Las muestras se fijaron utilizando formol al 10%
2. Deshidratación: Las muestras se deshidrataron utilizando alcoholes de menor a mayor concentración (70, 80, 96, y 100%) con su posterior aclaramiento mediante el uso de xilol
3. Infiltración e inclusión en parafina: Se llevó a cabo el proceso para la formación de bloques para posteriormente llevar a cabo los cortes histológicos, con un espesor de 5 μ m.
4. Desparafinado: Las muestras se incubaron durante 30 minutos en estufa bacteriológica a 60°C para fundir la parafina; posteriormente se sometieron a 3 baños de xilol de 15, 10 y 5 minutos cada uno, en vasos coplin.
5. Hidratación: Después del desparafinado se hidrataron las muestras utilizando alcoholes de mayor a menor concentración (100, 96, 80 y 70%) de 5 minutos cada uno y llevándolos hasta PBS durante 15 minutos.

6. Tinción de muestras con hematoxilina y eosina, mostrando el daño provocado y la composición celular de los infiltrados.
7. Tinción de muestras con la técnica Tricrómica de Van Gieson, evidenciando la formación de colágeno debido al proceso fibrótico.
8. Tinción de muestras con naranja de acridina, para así evidenciar las células que se encuentren en apoptosis.
9. Tinción azul de toluidina, mostrando la presencia de los mastocitos en los infiltrados celulares.
10. Tinción con cromotropo 2R, evidenciando los infiltrados de células eosinofílicas.
11. Proceso Inmunohistoquímico: Todos los pasos de este proceso se desarrollaron en cámaras húmedas, utilizando el kit inmunohistoquímico Immunoperoxidase Secondary Detection System. Merck Millipore IHC Select, tal como se describe en el siguiente listado:
 - a) Recuperamiento antigénico con tripsina al 0.01% durante 15 minutos
 - b) Tres lavados con PBS-T por 5 minutos cada uno en agitación constante.
 - c) Bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% por 20 minutos.
 - d) Tres lavados con PBS-T por 5 minutos cada uno en agitación constante.
 - e) Bloqueo de la actividad de la biotina endógena, utilizando ovoalbúmina en una solución PBS-T por 30 minutos.
 - f) Tres lavados con PBS-T por 5 minutos cada uno en agitación constante.
 - g) Saturación de la avidina con biotina utilizando leche comercial al 5% enriquecida con biotina por 30 minutos.
 - h) Tres lavados con PBS-T por 5 minutos cada uno en agitación constante.
 - i) Bloqueo de la unión inespecífica del anticuerpo secundario, con suero normal de cabra por 30 minutos.
 - j) Tres lavados con PBS-T por 5 minutos cada uno en agitación constante.
 - k) Incubación del anticuerpo primario (Suero policlonal anti-*T.canis*) overnight a 4°C
 - l) Tres lavados con PBS-T por 5 minutos cada uno en agitación constante.
 - m) Incubación del anticuerpo secundario de cabra anti conejo marcado con biotina por 10 minutos.
 - n) Tres lavados con PBS-T por 5 minutos cada uno en agitación constante.
 - o) Incubación con el complejo enzimático estreptoavidina-peroxidasa, por 10 minutos.
 - p) Un solo lavado con TBS-T por 5 minutos en agitación constante.
 - q) Revelado de las muestras empleando el cromógeno DAB (3,3' diaminobenzidina), por 30 segundos.
 - r) Un solo lavado con TBS-T por 5 minutos en agitación constante.

- s) Contraste mediante el uso de hematoxilina de Harris por 2 minutos.
12. Deshidratación: Después de terminar la tinción con hematoxilina y el proceso inmunohistoquímico, se deshidrataron las muestras utilizando alcoholes de menor a mayor concentración (70, 80, 96 y 100%) de 5 minutos cada uno y posteriormente se aclararon con dos baños de xilol de 5 minutos cada uno.
13. Montaje: Para la conservación de las muestras se montaron con el uso del polímero Entelan y cubreobjetos.

Interpretación de los resultados obtenidos.

Las preparaciones obtenidas fueron analizadas para obtener imágenes fotográficas que mostrarán evidencias de la presencia de los antígenos de secreción-excreción en el material procesado para inmunohistoquímica o alteraciones tisulares en los tejidos pulmonares de cada grupo experimental para hacer una descripción detallada de las alteraciones y determinar en base al grado de deterioro la correlación con la cantidad de huevos inoculados. Además se realizaron cuadros descriptivos de las lesiones en los individuos del mismo grupo a las distintas fechas de sacrificio para evaluar la evolución de las lesiones, así como cuadros contrastando la severidad de las lesiones en base al inóculo administrado a los diferentes grupos en las diferentes fechas de sacrificio.

Resultados.

Tejidos de los Grupos Control y Testigo con las distintas Técnicas Histológicas.

La estructura de los tejidos procesados en el grupo control no inoculado y en el testigo inoculado con agua inyectable, presentó características normales por lo que se confirma la ausencia de efectos asociados a factores externos que afecten los resultados. (Figura 10, 11 y 12.) Se inocularon animales con huevos larvados por vía oral mostrando la migración normal de larvas por los pulmones y en estos tejidos se demostró la presencia de los organismos y reacciones positivas en inmunohistoquímica a su presencia, lo cual muestra la capacidad del procedimiento para detectar los antígenos somáticos así como los de excreción y secreción de la larva. (Figura 9)

Inmunohistoquímica.

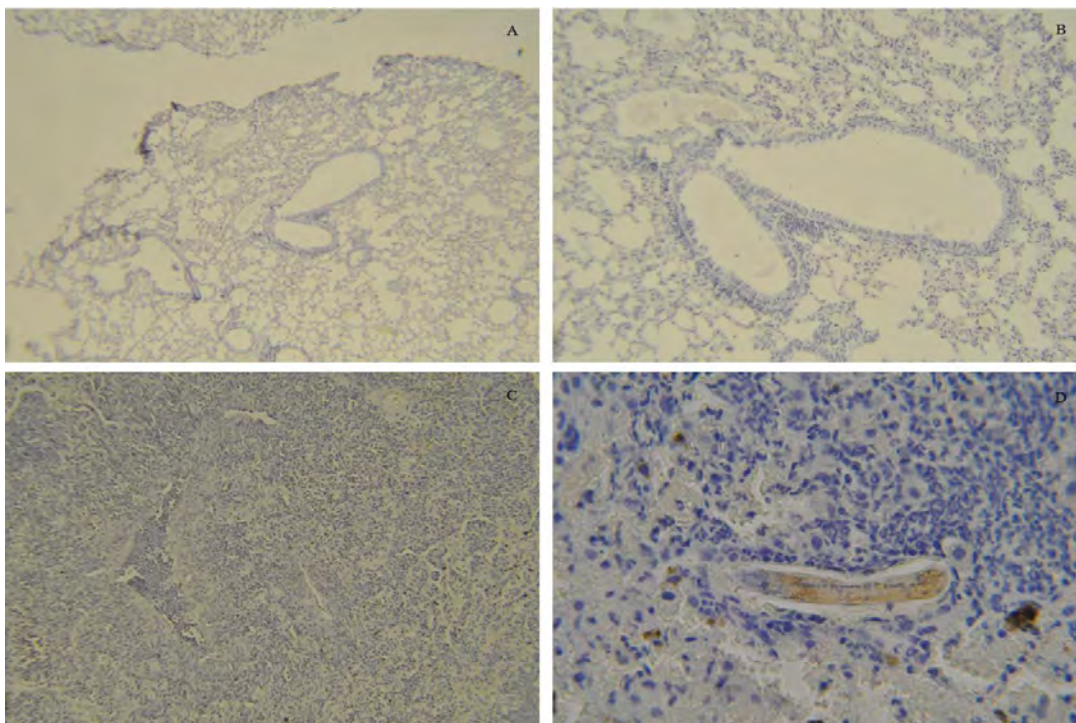


Figura No. 9. Fotomicrografías de cortes histológicos de pulmón de rata. A) Rata testigo inoculada con agua inyectable, observándose la ausencia de marcaje contra los antígenos de secreción excreción, además de que se observa el tejido sin daño tanto en el bronquiolo como en los alveolos que lo circundan (x40). B) Amplificación de la zona anterior (x100). C) Rata control negativo de ensayo inoculada con *Toxocara canis* donde se muestra la ausencia de marcaje debido a que no se utilizó el Ab primario y descartando reacciones inespecíficas (x100). D) Rata control positivo del ensayo inoculada con *Toxocara canis* donde se muestra la presencia de una larva marcada al igual que los antígenos alrededor de esta (x400).

Tejidos teñidos con Hematoxilina-Eosina.

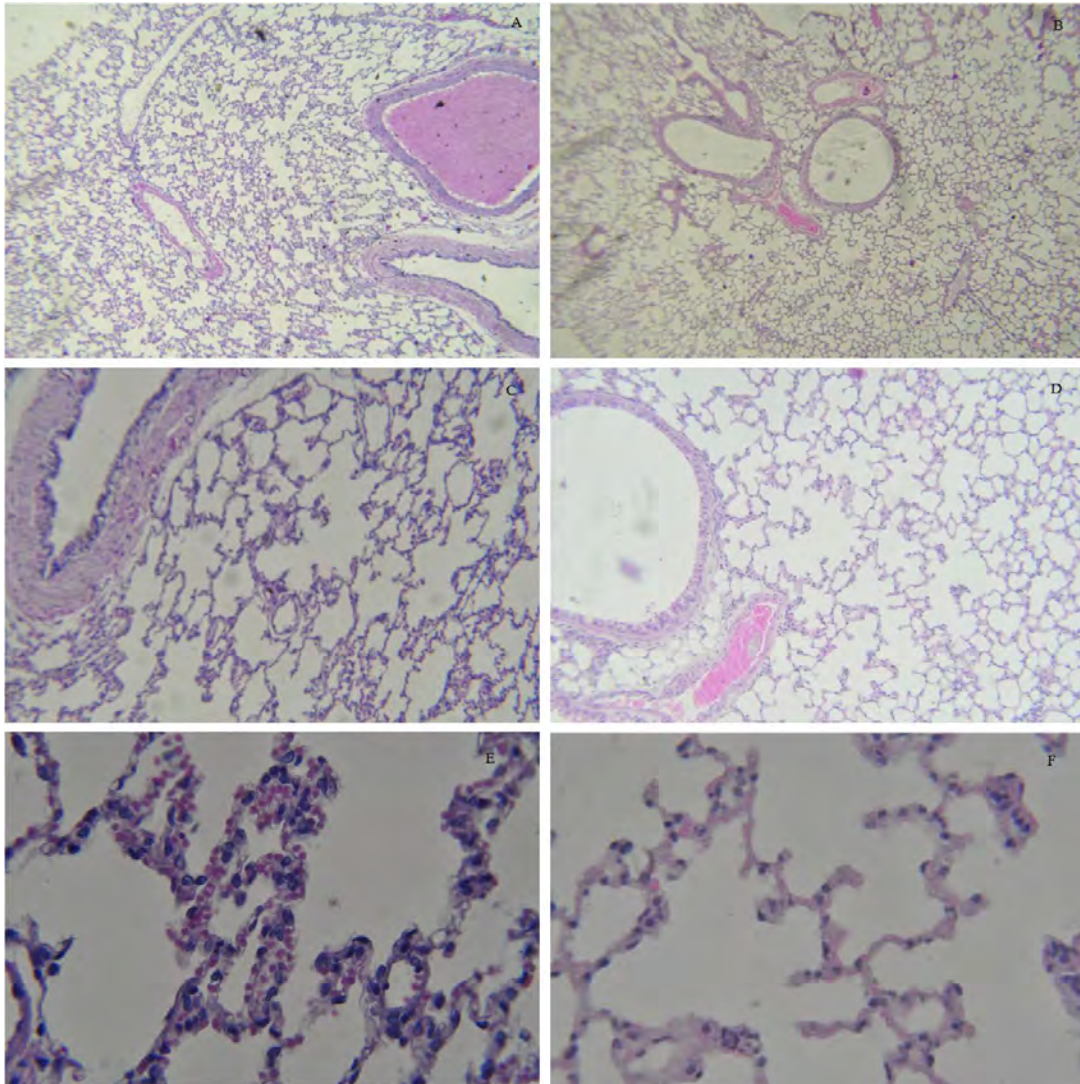


Figura No. 10. Fotomicrografías de cortes histológicos de pulmón de rata. A) Rata control sin inocular donde se muestra la ausencia de daño al tejido pulmonar debido a que no se llevó a cabo ningún proceso de infección (x40). B) Rata testigo inoculada con agua inyectable, donde se muestra la ausencia de daño al tejido pulmonar debido a que no se llevó a cabo ningún proceso de infección (x40). C) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso A, observándose más a detalle el tejido pulmonar, sin infiltrado celular o engrosamiento alveolar (x100). D) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso B, observándose más a detalle el tejido pulmonar, sin infiltrado celular o engrosamiento alveolar (x100). E) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso C, observándose más a detalle los alveolos en una condición normal (x400). F) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso E, observándose más a detalle los alveolos en una condición normal (x400).

Tejidos teñidos con la tinción Tricrómica de Van Gieson.

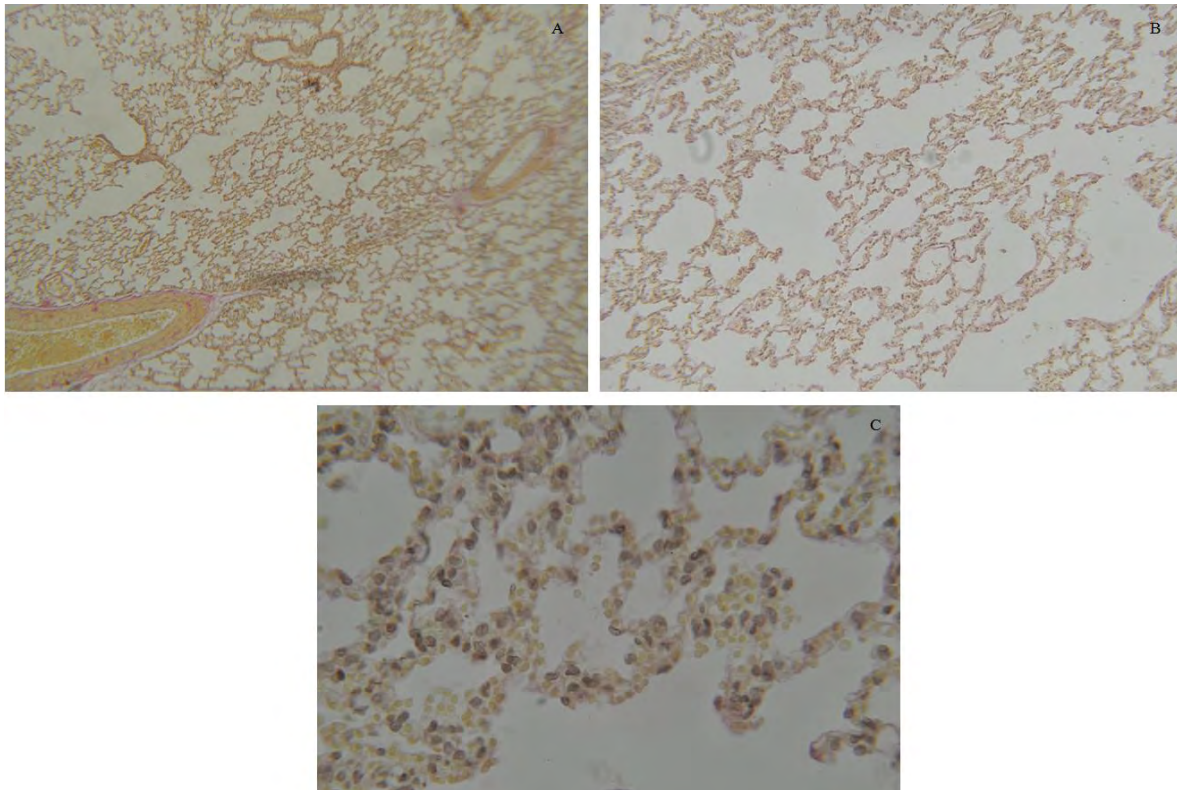


Figura No. 11. Fotomicrografías de cortes histológicos de pulmón de rata. A) Rata control sin inocular, donde se muestra el parénquima pulmonar teñido de color amarillo debido a que no hay síntesis de colágeno que muestre un proceso de reparación del tejido. Sólo se observa las zonas perivasculares de coloración roja debido a que la membrana basal que lo compone contiene fibras de colágeno (x40). B) Rata control sin inocular, donde se muestran los alveolos sin engrosamiento e infiltrado y con coloración amarillenta (x100). C) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso A, observándose más a detalle el tejido pulmonar, y la coloración que posee (x400).

Tejido teñido con Naranja de Acridina.

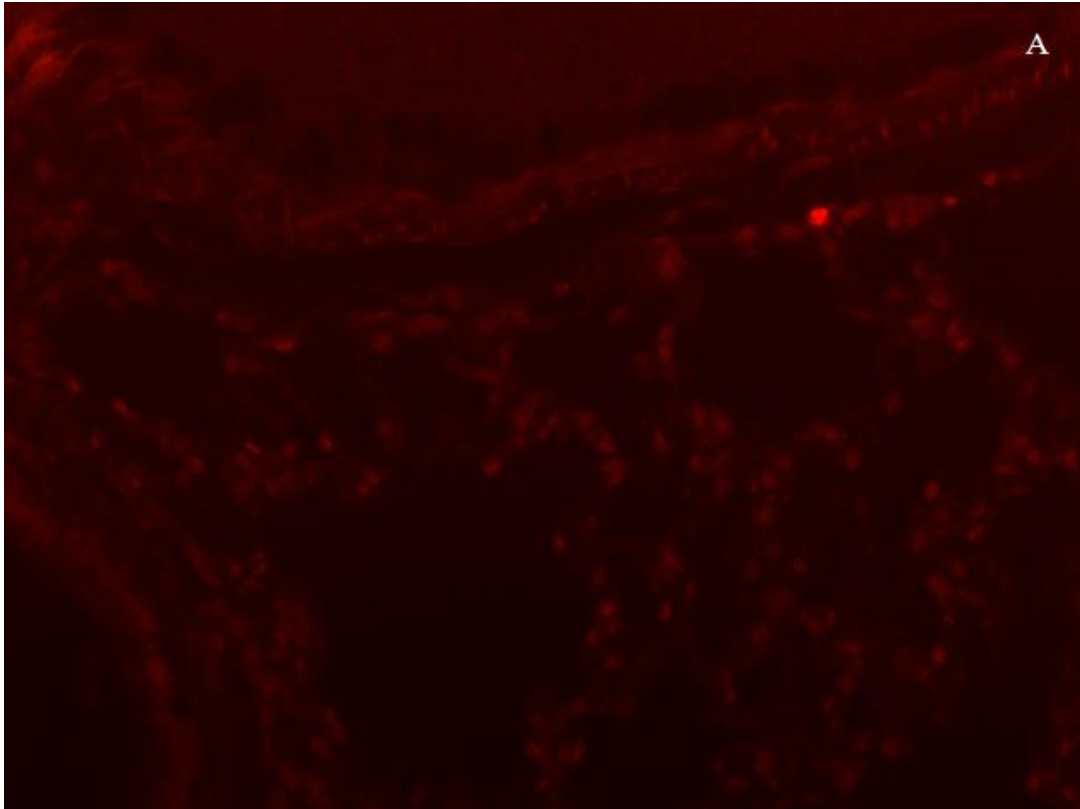


Figura No. 12. Fotomicrografía de corte histológico de pulmón de rata. A) Rata control sin inocular, donde se muestra solamente una célula en proceso apoptótico en el lado derecho superior de la imagen, esto debido a que de igual manera es un proceso fisiológico (x400).

Descripción de las lesiones microscópicas mediante las tinciones histológicas.

Día 5 postinoculación.

Animales inoculados con 50 huevos.

Se observaron áreas de inflamación incipiente con engrosamiento alveolar y perivascular principalmente a nivel peribronquial probablemente ligadas a la difusión de los antígenos desde las vías aéreas al parénquima, el componente celular observado incluyó a los neutrófilos y macrófagos (Figura 14: A, C y E). La presencia de eosinófilos en esta etapa fue escasa, (Figura 18: A) mientras que en el tejido conjuntivo adyacente a los bronquios hubo un incremento en los mastocitos con respecto al grupos control y testigo (Figura 19: A). Se detectó la presencia de TES concentrados en una zona no tan amplia del parénquima cercano a dos bronquiolos siendo uno de estos terminal (Figura 13: A, B y C).

Animales inoculados con 100 huevos.

Se observaron zonas incipientes de engrosamiento alveolar principalmente a nivel peribronquial debido a la difusión de los antígenos desde las vías aéreas al parénquima, al igual que a nivel perivascular por la extravasación de las células de la primera línea de defensa, como lo son los neutrófilos y macrófagos, también se encontraron macrófagos espumosos debida a la alta fagocitosis de productos antigénicos (Figura 14: B, D y F). La presencia de los eosinófilos en esta fecha de sacrificio fue escasa, (Figura 18: B) mientras que en el tejido conjuntivo adyacente a los bronquios hubo un incremento notorio en los mastocitos respecto al grupo control y testigo (Figura 19: B). En este grupo y fecha no se detectó la presencia de TES en las porciones de tejidos estudiados.

Inmunohistoquímica.

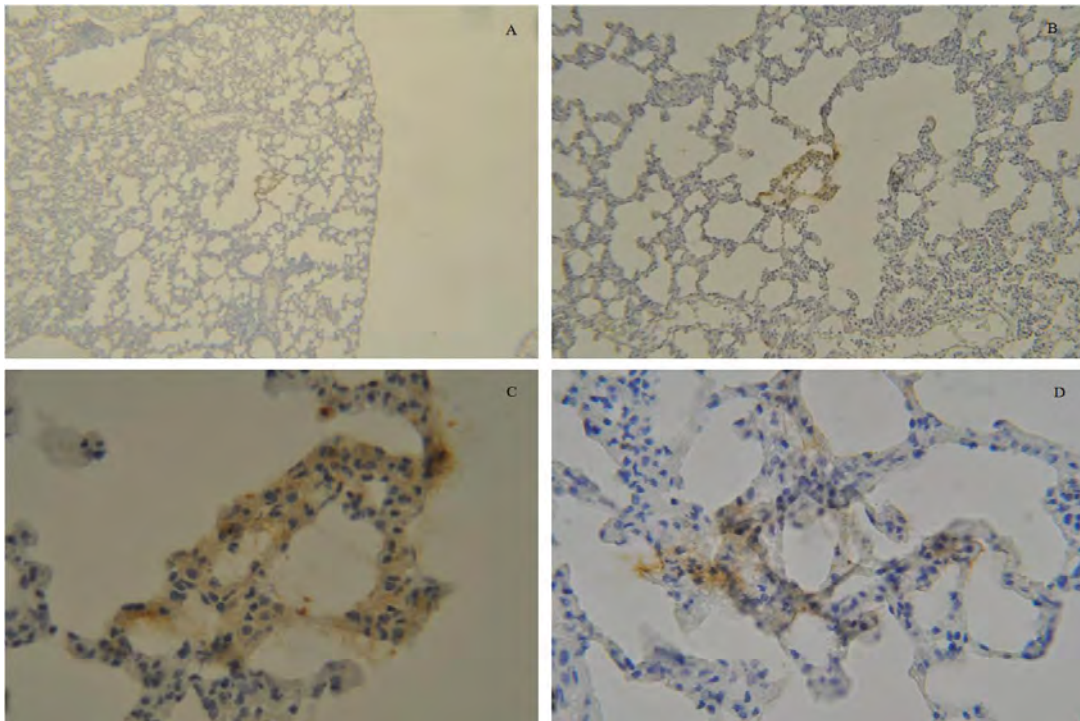


Figura No. 13. Fotomicrografías de cortes histológicos de pulmón de rata. A) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 5 pi. Se observa la presencia de marcaje de los antígenos que difundieron a través de los bronquios u bronquiolos. No hay presencia de daño o de infiltrado celular alrededor de la marca (x40). B) Amplificación de la zona anterior (x100). C) Amplificación de la zona anterior. Observándose más a detalle el marcado antigénico (x400). D) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 60 pi. Se observa la presencia de marcaje de los antígenos que difundieron a través de los bronquios u bronquiolos. No hay presencia de daño o de infiltrado celular alrededor de la marca (x400).

Tejidos teñidos con Hematoxilina-Eosina.

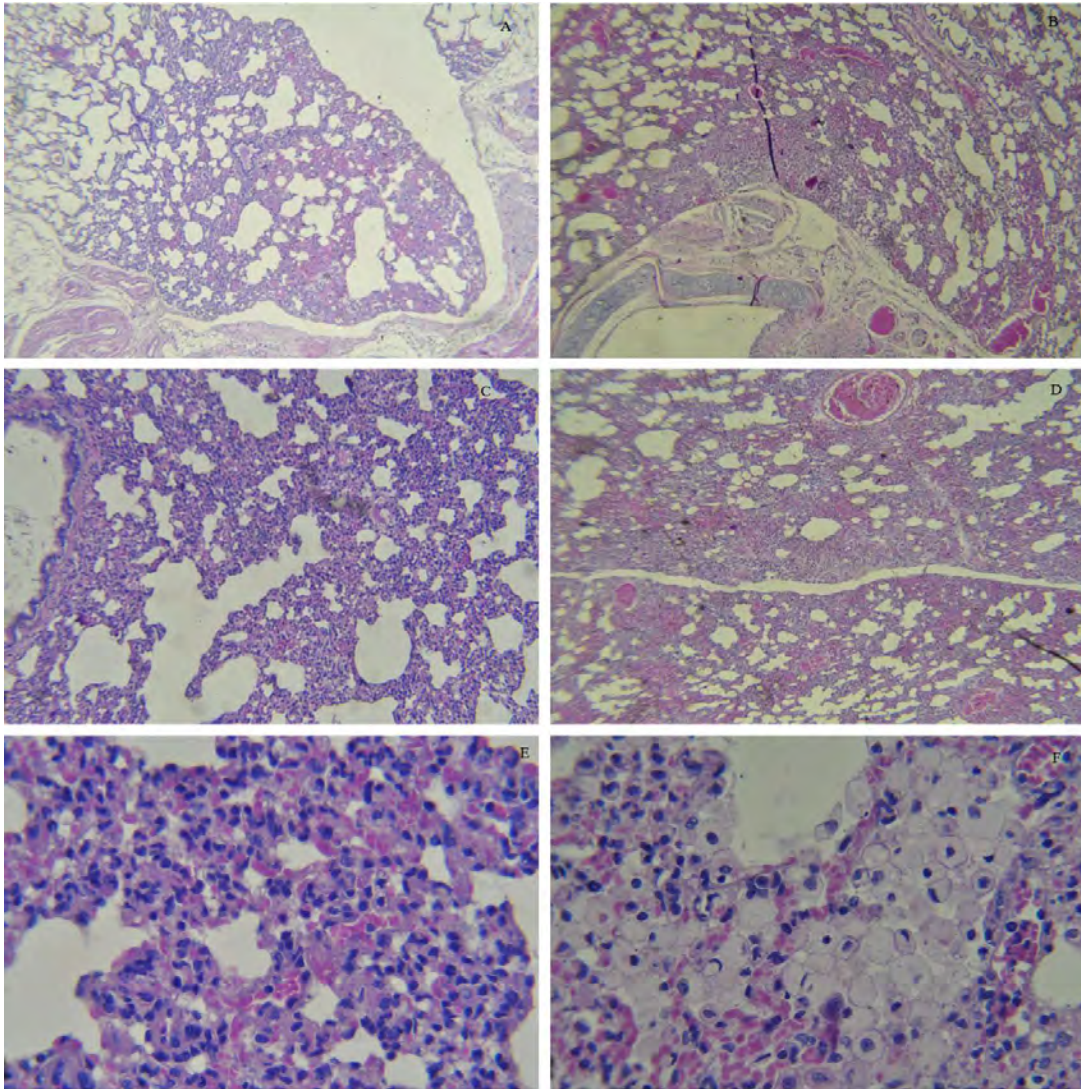


Figura No. 14. Fotomicrografías de cortes histológicos de pulmón de rata. A) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 5 pi. Se observa de manera incipiente el engrosamiento alveolar (x40). B) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 5 pi. Se observa alrededor del bronquio zonas incipientes de engrosamiento alveolar (x40). C) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 5 pi. Se observa de manera más detallada el engrosamiento alveolar cerca de un bronquiolo (x100). D) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 5 pi. Se observa de manera más detallada el engrosamiento alveolar, donde además se observa vasos sanguíneos con infiltrado celular, ocasionado por la llegada de células inflamatorias a la zona de daño (x100). E) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso C, observándose más a detalle el engrosamiento alveolar así como células mononucleares y polimorfonucleares (x400). F) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 5 pi. Se observa de manera más detallada el infiltrado en los alveolos, predominantemente por macrófagos espumosos (x400).

Tejidos teñidos con la tinción Tricrómica de Van Gieson.

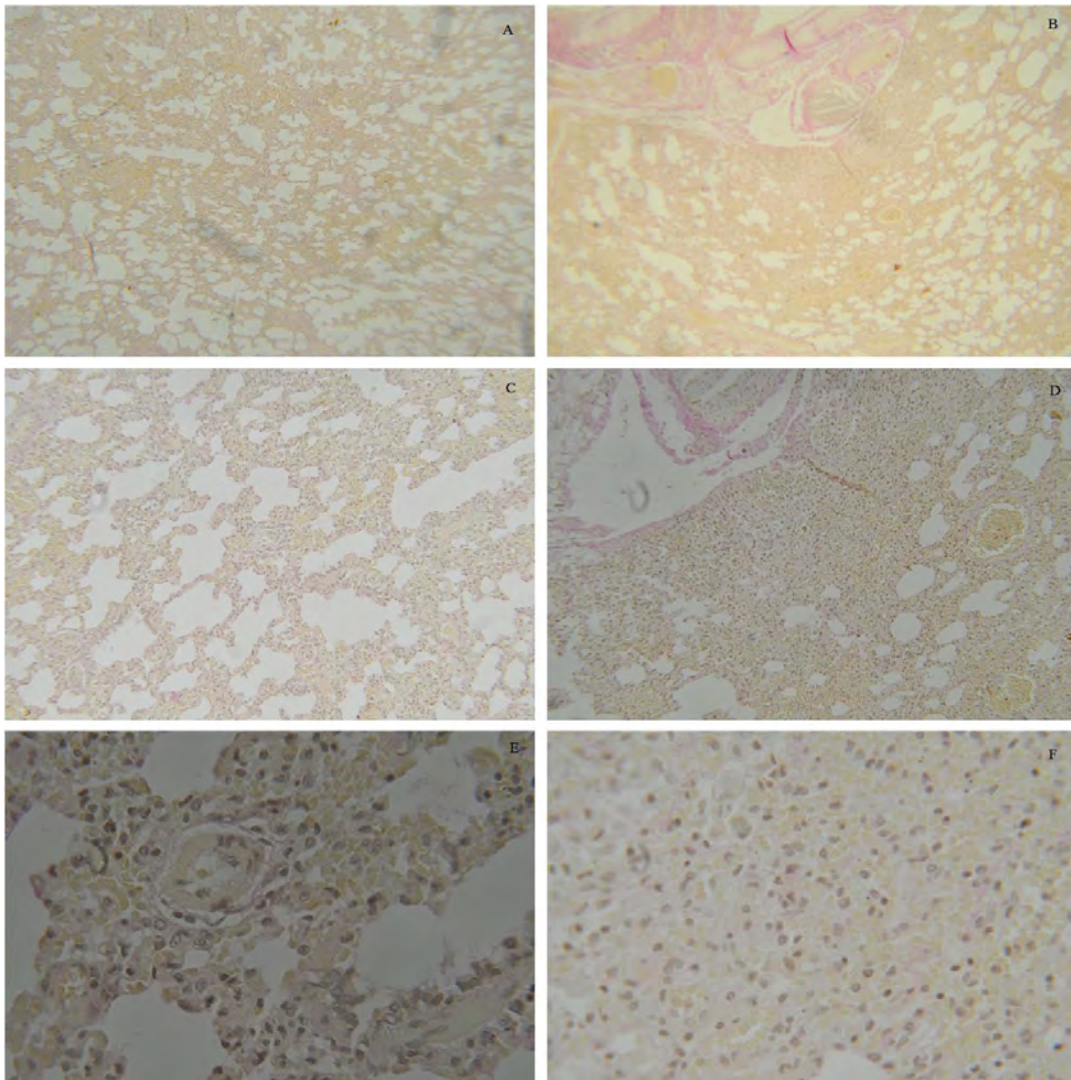


Figura No. 15. Fotomicrografías de cortes histológicos de pulmón de rata. A) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 5 pi. Se muestra el parénquima pulmonar teñido de color amarillo debido a que no hay síntesis de colágeno que muestre un proceso de reparación del tejido (x40). B) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 5 pi. Se muestra el parénquima pulmonar teñido de color amarillo debido a que no hay síntesis de colágeno que muestre un proceso de reparación del tejido. Sólo se observa el cartilago del bronquio de coloración roja debido a que en parte de su composición contiene fibras de colágeno (x40). C) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso A, observándose más a detalle el tejido pulmonar, y la coloración que posee (x100). D) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso B, observándose más a detalle el tejido pulmonar, y la coloración que posee, de igual manera solo se observa la coloración roja en la zona del bronquio (x100). E) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso C, observándose más a detalle el tejido pulmonar, y la coloración que posee (x400). F) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso D, observándose más a detalle el tejido pulmonar, y la coloración que posee, siendo esta tenue de color rosado (x400).

Día 10 postinoculación.

Animales inoculados con 50 huevos.

Se detectan en los tejidos de estos animales zonas más extensas con engrosamiento alveolar peribronquial al igual que perivascular, con presencia en estos espacios de neutrófilos pero con predominancia de macrófagos (Figura 17: A, C y E). Se incrementó la presencia de eosinófilos respecto a los animales del grupo sacrificado el día 5 pero comparado con los hallazgos de días posteriores se considera aún como de una baja concentración de células, (Figura 18: C) en tanto la concentración de mastocitos localizados en el tejido conjuntivo adyacente a los bronquios se mantuvo estable (Figura 19: C). En estos tejidos se detectó una ligera presencia de depósitos de colágeno de forma incipiente (Figura 20: A, C y E). En estas muestras no se detectó la presencia de TES en el ensayo de inmunohistoquímica.

Animales inoculados con 100 huevos larvados.

Se observaron mayores zonas inflamatorias a nivel peribronquial y perivascular con engrosamiento alveolar, en una mayor proporción que los tejidos de los animales de la fecha previa de sacrificio, en estas zonas se observó un predominio de células mononucleadas y polimorfonucleares como neutrófilos y macrófagos (Figura 17: B, D y F). La concentración de eosinófilos en esta fecha de sacrificio aumentó en comparación a la anterior pero de una forma muy ligera, (Figura 18: D) en tanto la concentración de mastocitos presentó una notable disminución en este grupo de animales (Figura 19: D). La presencia de colágeno en el tejido tuvo su pico máximo en esta dosis utilizada, pero de manera general durante todo el periodo experimental nunca se sobrepasó el índice de 1 en nuestro score propuesto, por lo que descartamos la presencia de un proceso de reparación. (Figura 20: B, D y F) Se detectó la presencia de TES concentrados en una pequeña área del BALT situada de manera colindante con el epitelio del bronquio (Figura 16).

Inmunohistoquímica.

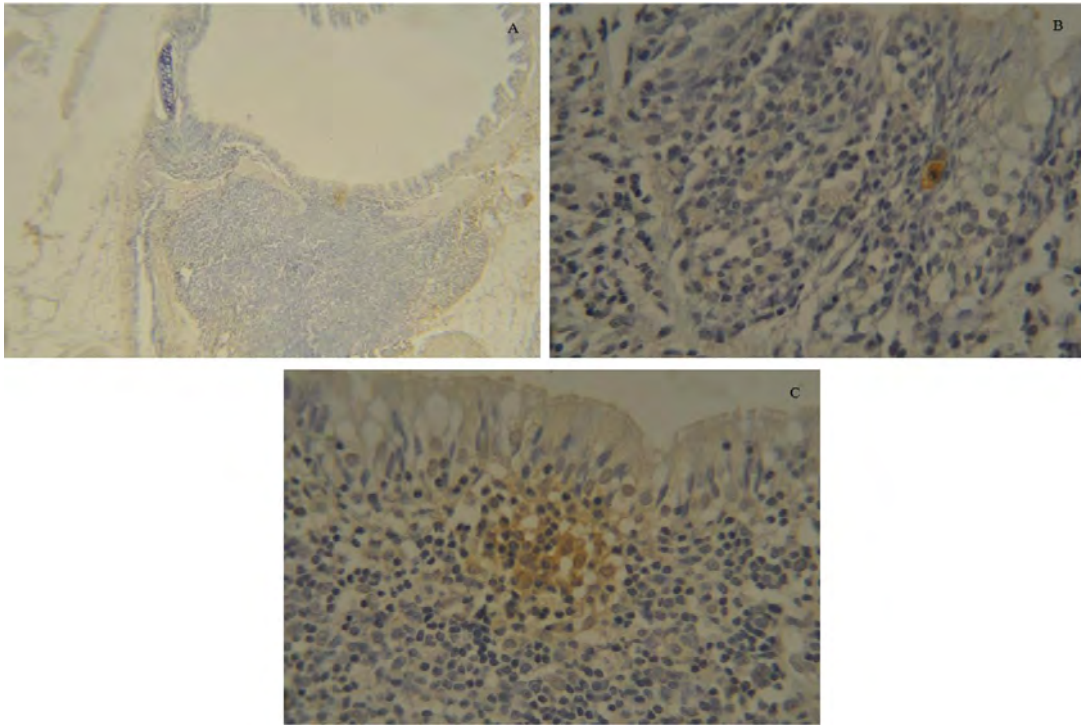


Figura No. 16. Fotomicrografías de cortes histológicos de pulmón de rata. A) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 10 pi. Se observa la presencia de marcaje de los antígenos que difundieron a través del bronquio, y que se encuentra en la zona del BALT (x40). B) Amplificación de la zona anterior del extremo superior izquierdo, donde se observa el corte transversal de una larva marcada (x400). C) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso A, observándose más a detalle el marcado antigénico, al igual que las células linfoides que se encuentran en el BALT (x400).

Tejidos teñidos con Hematoxilina-Eosina.

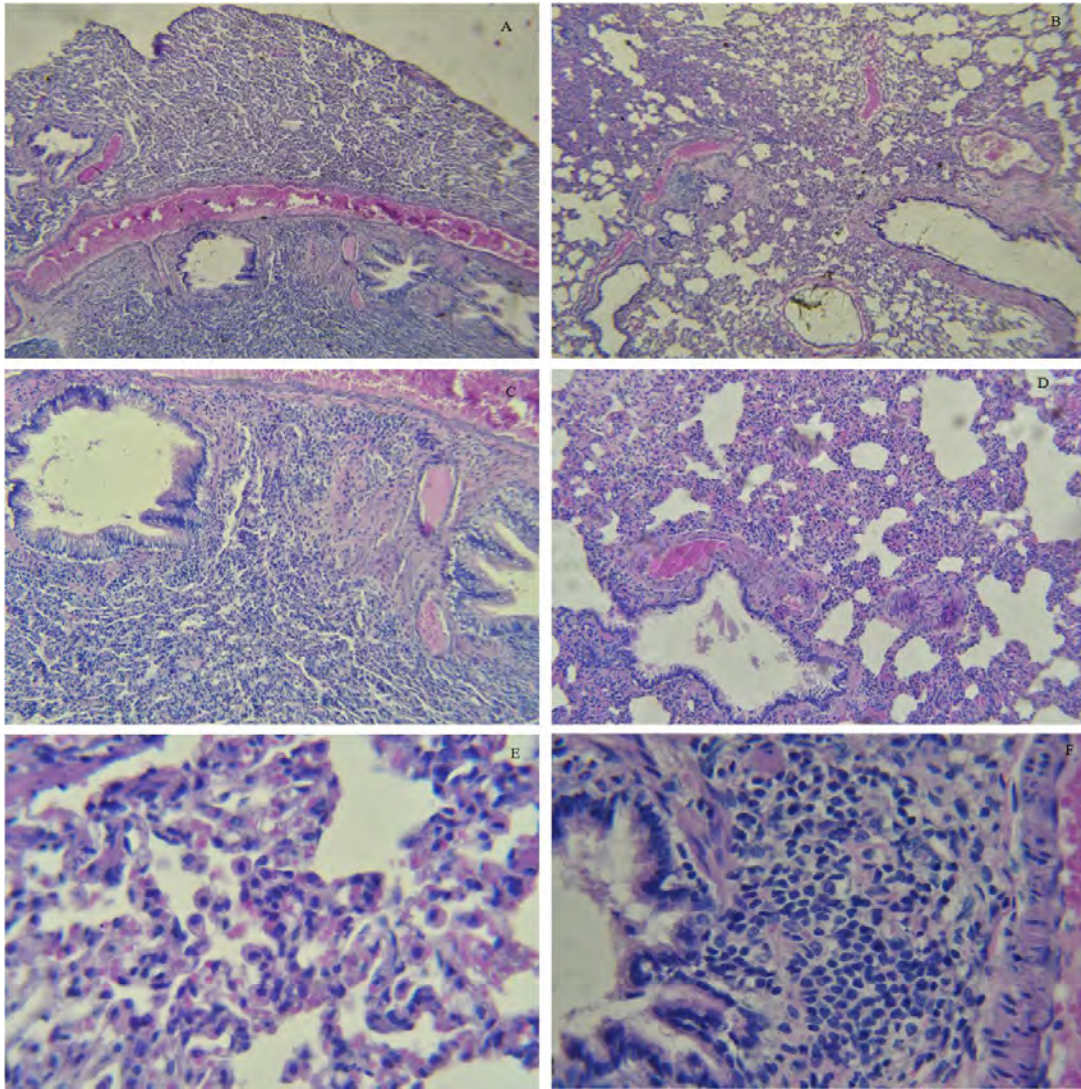


Figura No. 17. Fotomicrografías de cortes histológicos de pulmón de rata. A) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 10 pi. Se observa la pérdida total de los alveolos, y un gran infiltrado celular cerca de los bronquiolos (x40). B) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 10 pi. Se observa alrededor de los bronquiolos zonas con engrosamiento alveolar (x40). C) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso A, observándose más a detalle el engrosamiento alveolar así como la infiltración celular (x100). D) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 10 pi. Se observa de manera más detallada el engrosamiento alveolar, además de observar un vaso sanguíneo con infiltrado celular, ocasionado por la llegada de células inflamatorias a la zona de daño (x100). E) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 10 pi. Observando macrófagos y polimorfonucleares en el infiltrado celular (x400). F) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 10 pi. Se observa de manera más detallada adyacente a un bronquiolo las células linfoides pertenecientes al BALT (x400).

Eosinófilos.

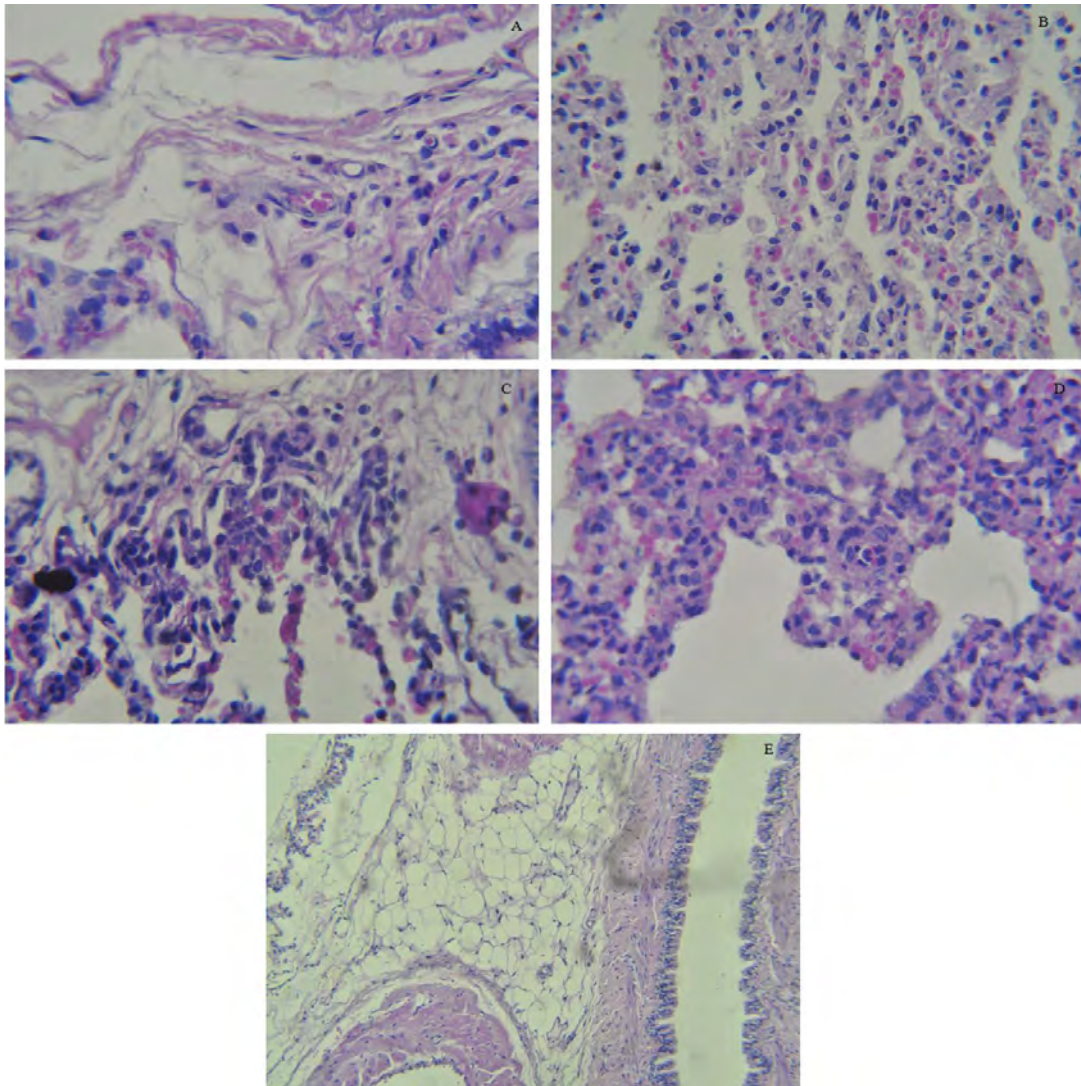


Figura No. 18. Fotomicrografías de cortes histológicos de pulmón de rata. A) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 5 pi. Se observan algunos eosinófilos en la zona de tejido conectivo adyacente a los bronquios (HE, x400). B) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 5 pi. Se observa un eosinófilo en la zona del parénquima pulmonar (HE, x400). C) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 10 pi. Se observan algunos eosinófilos en la zona de tejido adyacente a un bronquio (HE, x400). D) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 10 pi. Se observa un eosinófilo en la zona del parénquima pulmonar (HE, x400). E) Rata control sin inocular donde se muestra la ausencia de eosinófilos en la zona de tejido conectivo adyacente a los bronquios, debido a que no se llevó a cabo ningún proceso de infección (HE, x100).

Mastocitos.

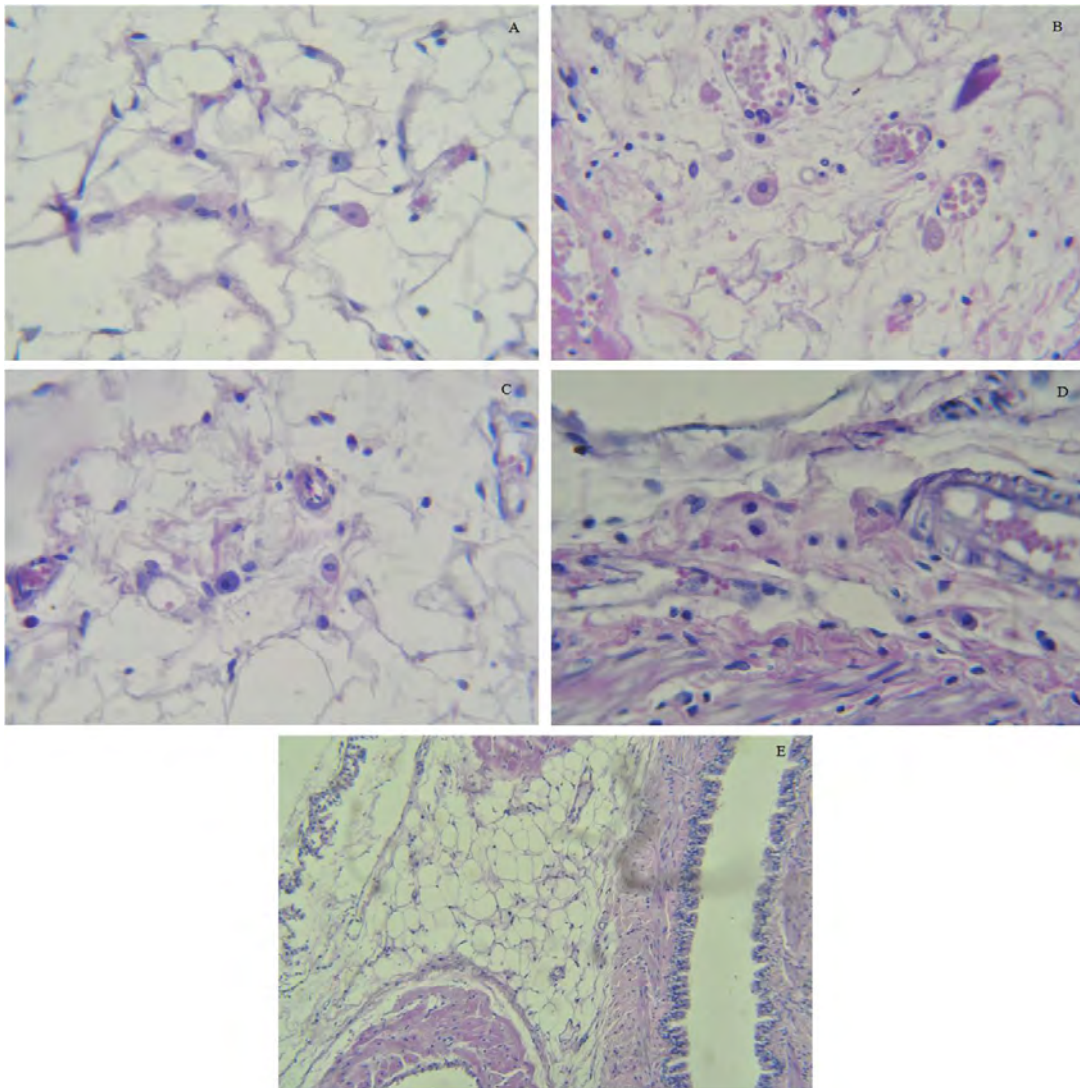


Figura No. 19. Fotomicrografías de cortes histológicos de pulmón de rata. A) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 5 pi. Se observan varios mastocitos en la zona de tejido conectivo adyacente a los bronquios (HE, x400). B) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 5 pi. Se observan varios mastocitos y vasos sanguíneos en la zona de tejido conectivo adyacente a los bronquios (HE, x400). C) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 10 pi. Se observan varios mastocitos en la zona de tejido conectivo adyacente a los bronquios (HE, x400). D) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 10 pi. Se observan varios mastocitos en la zona de tejido conectivo adyacente a los bronquios (HE, x400). E) Rata control sin inocular donde se muestra la ausencia de mastocitos en la zona de tejido conectivo adyacente a los bronquios, debido a que no se llevó a cabo ningún proceso de infección (HE, x100).

Tejidos teñidos con la tinción Tricrómica de Van Gieson.

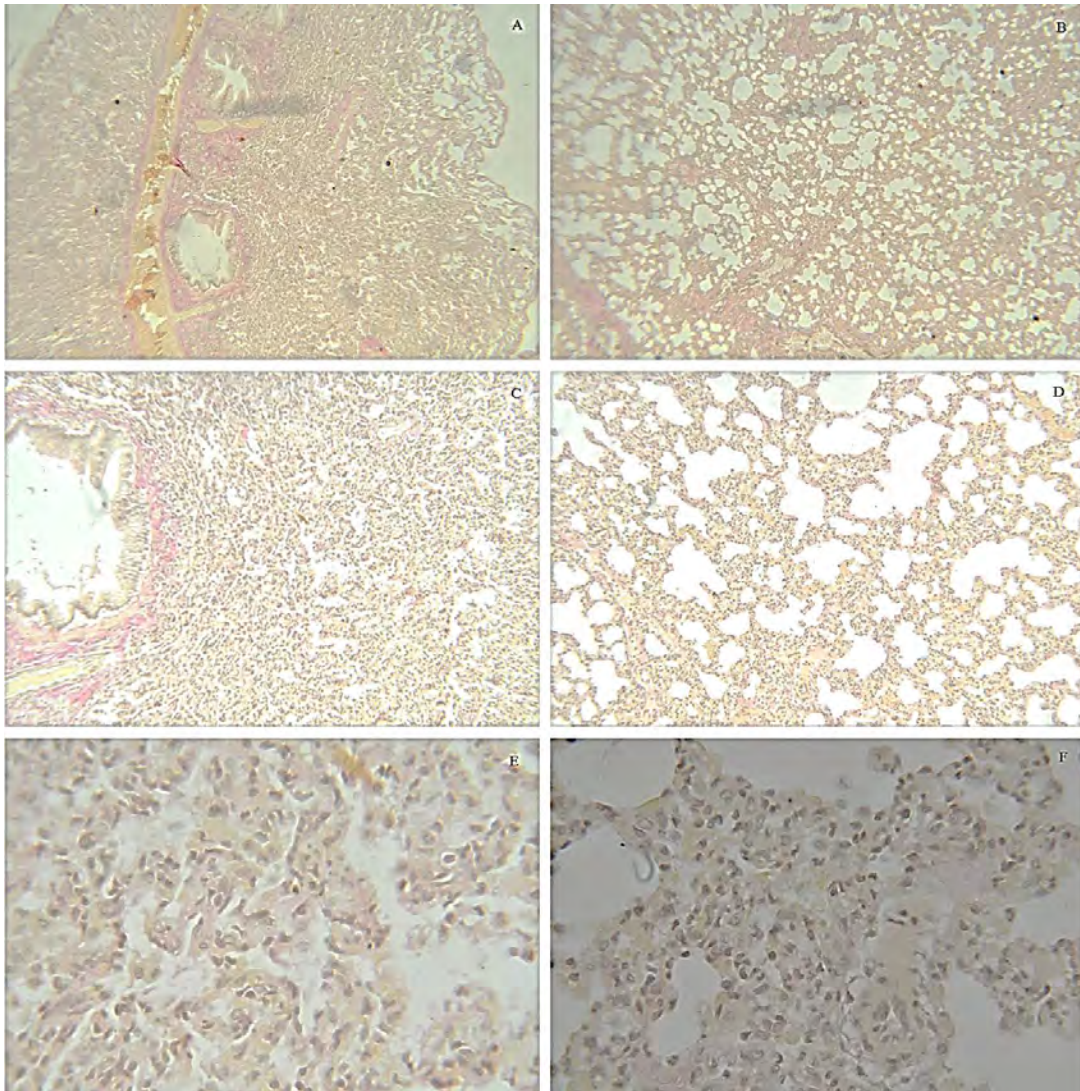


Figura No. 20. Fotomicrografías de cortes histológicos de pulmón de rata. A) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 10 pi. Se muestra el parénquima pulmonar teñido de color amarillo, solamente se observa coloración roja las aéreas perivasculares y bronquiolares (x40). B) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 10 pi. Se muestra el parénquima pulmonar teñido de color amarillo, sólo se observa la zona perivascular de color rojo (x40). C) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso A, observándose más a detalle el tejido pulmonar, y la coloración que posee (x100). D) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso B, observándose más a detalle el tejido pulmonar, y la coloración que posee (x100). E) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso C, observándose más a detalle el tejido pulmonar, y la coloración que posee, siendo esta ligeramente tenue de color rosado (x400). F) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso D, observándose más a detalle el tejido pulmonar, y la coloración que posee, siendo esta tenue de color rosado (x400).

Tejidos teñidos con Naranja de Acridina.

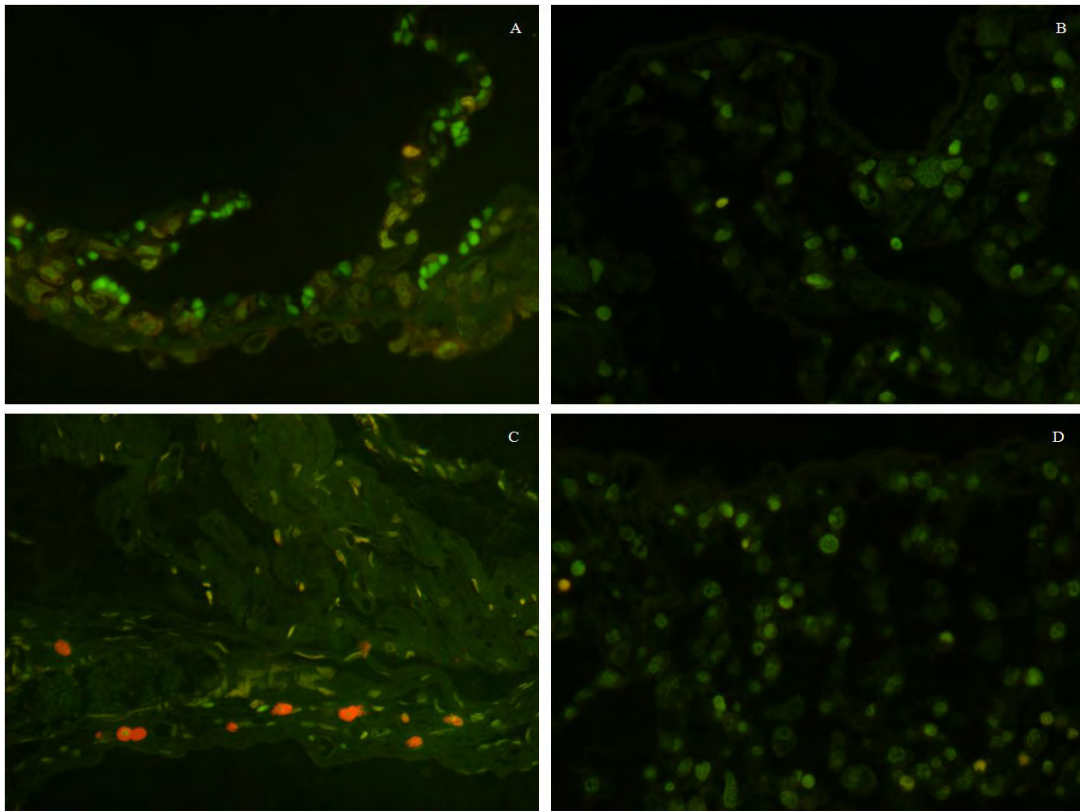


Figura No. 21. Fotomicrografías de cortes histológicos de pulmón de rata. A) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 5 pi. Se observan los alveolos sin daño y no se encuentran células en estado apoptótico (x400). B) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 5 pi. No se encuentran células en estado apoptótico, solamente se muestra la presencia de dos mastocitos en la parte media del lado derecho de la imagen (x400). C) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 10 pi. No se encuentran células en estado apoptótico, solamente se muestra la presencia de varios mastocitos en coloración anaranjada (x400). D) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 10 pi. Se muestran células polimorfonucleares, así como células que se encuentran en proceso de autólisis en la parte inferior derecha de la imagen, ya que muestran el núcleo fragmentado y su citoplasma no se encuentra acinturado, esto debido al proceso necrótico. No se encuentran células en estado apoptótico (x400).

Día 30 postinoculación.

Animales inoculados con 50 huevos.

Se observó un gran aumento en la aparición de zonas con engrosamiento y con una aumentada intensidad alveolar igualmente en los niveles peribronquial y perivascular, conteniendo en estos infiltrados celulares linfocitos, macrófagos (Figura 22: A, C y E) al igual que eosinófilos con un aumento súbito de esta estirpe celular tanto en el parénquima pulmonar como en el tejido conectivo adyacente a bronquios (Figura 27: A). Hubo un ligero incremento de la presencia de mastocitos en tejido conjuntivo adyacente a los bronquios en comparación con los animales de la fecha previa de sacrificio (Figura 28: A). No se detectó la presencia de TES en los tejidos estudiados.

Animales inoculados con 100 huevos.

Se observó un gran aumento en la aparición de zonas con engrosamiento y con una aumentada intensidad alveolar tanto a nivel peribronquial como a nivel perivascular, conteniendo en estos infiltrados linfocitos, macrófagos, muchos de estos últimos de tipo espumoso así como una abundancia de macrófagos espumosos por la alta ingestión de productos antigénicos, (Figura 22: B, D y F) al igual que eosinófilos presentando un súbito incremento tanto en el parénquima pulmonar como en el tejido conectivo adyacente a bronquios (Figura 27: B). La presencia de los mastocitos localizados en tejido conjuntivo adyacente a los bronquios aumentó de forma importante en este grupo experimental fue donde más se observó su presencia (Figura 28: B). La concentración de colágeno se mantuvo constante respecto a los tejidos del grupo sacrificado en la fecha previa (Figura 23: B, D y F). No se detectó en estos tejidos estudiados la presencia de TES.

Tejidos teñidos con Hematoxilina-Eosina.

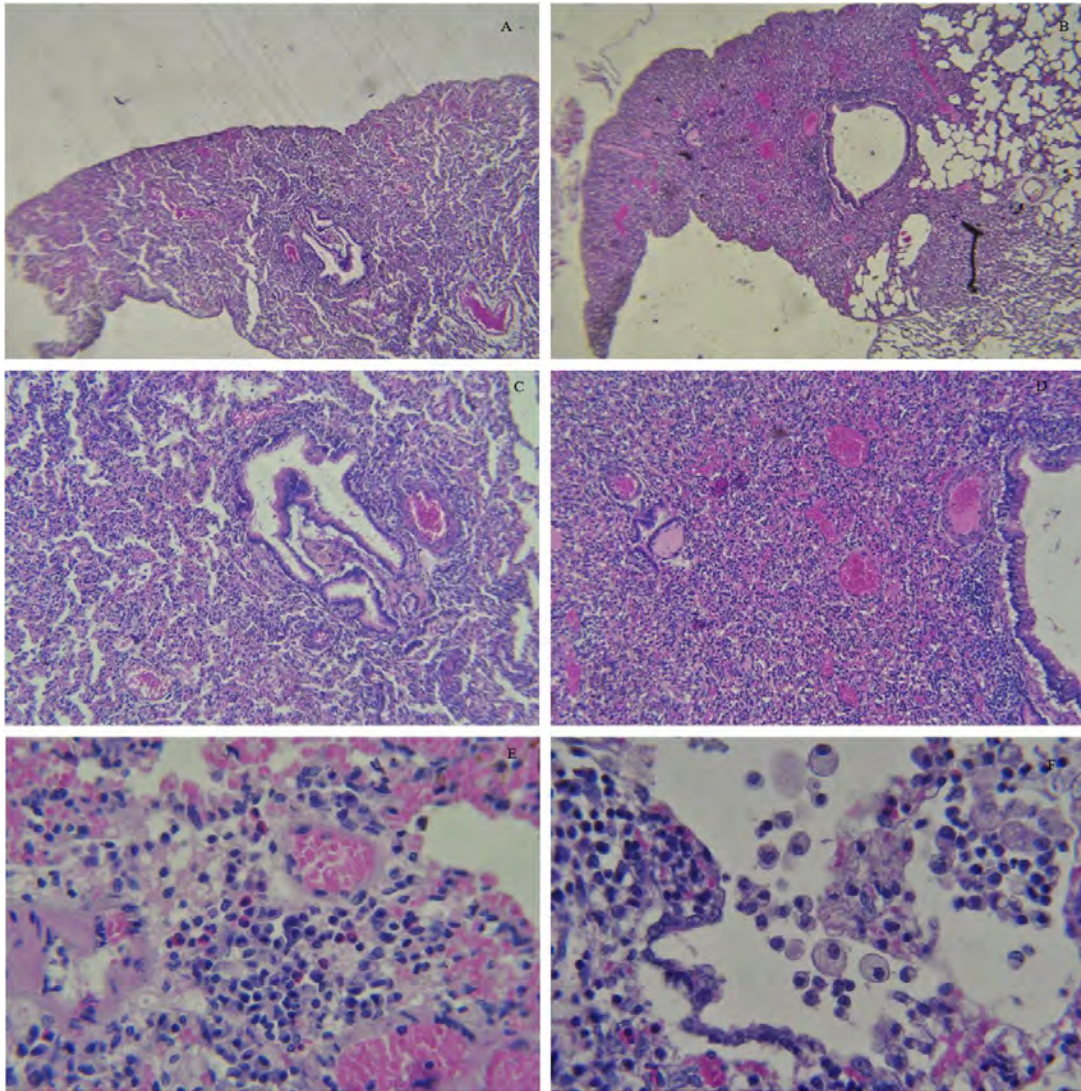


Figura No. 22. Fotomicrografías de cortes histológicos de pulmón de rata. A) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 30 pi. Se observa un gran engrosamiento de los septos alveolares que circundan al bronquiolo (x40). B) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 30 pi. Se observa alrededor del bronquiolo pérdida total de los alveolos (x40). C) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso A, observándose más a detalle el engrosamiento alveolar (x100). D) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso B, se observa de manera más detallada la totalidad del engrosamiento alveolar, además de varios vasos sanguíneos por los cuales se dio paso a la extravasación celular (x100). E) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 30 pi. Observando en la periferia del vaso sanguíneo infiltrado mononuclear, al igual eosinófilos característicos de la infección (x400). F) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 30 pi. Se observa de manera más detallada el infiltrado celular compuesto por macrófagos, monocitos y algunos eosinófilos (x400).

Tejidos teñidos con la tinción Tricrómica de Van Gieson.

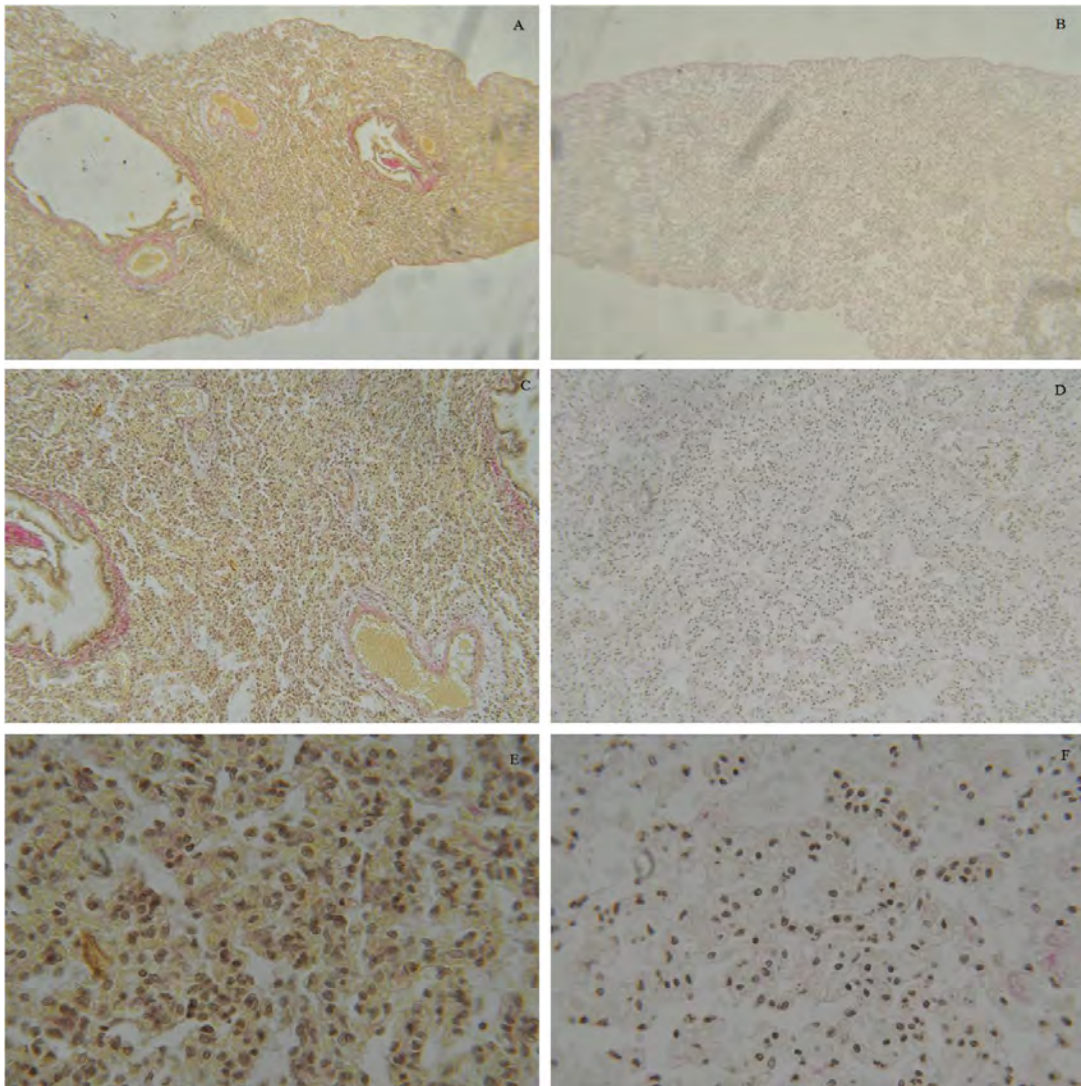


Figura No. 23. Fotomicrografías de cortes histológicos de pulmón de rata. A) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 30 pi. Se muestra el parénquima pulmonar teñido de color amarillo, solamente se observa de coloración roja las aéreas perivasculares y bronquiolares (x40). B) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 30 pi. Se muestra el parénquima pulmonar teñido con una coloración ligeramente rosa (x40). C) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso A, observándose más a detalle el tejido pulmonar, y la coloración que posee (x100). D) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso B, observándose más a detalle el tejido pulmonar, y la coloración que posee (x100). E) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso C, observándose más a detalle el tejido pulmonar, y la coloración que posee, siendo esta totalmente de color amarillo (x400). F) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso D, observándose más a detalle el tejido pulmonar, y la coloración que posee, siendo esta ligeramente de color rosado (x400).

Día 60 postinoculación.

Animales Inoculados con 50 huevos.

Las lesiones observadas presentaron una ligera disminución en su magnitud, pero aún así se observaron zonas de engrosamiento con una aumentada intensidad alveolar ya no solamente peribronquiales ni perivasculares, por lo que proponemos que este efecto puede deberse a que se alcanzó una meseta la concentración de los productos liberados por las larvas, sin embargo, esto sólo podría comprobarse ampliando el tiempo de infección para determinar si realmente se alcanzó una meseta o si se trata del inicio de la disminución del daño. Dentro de estos infiltrados celulares predominaron linfocitos, macrófagos (Figura 26: A, C y E) al igual que eosinófilos en menor proporción, pero que siguen siendo abundantes (Figura 27: C). La presencia de los mastocitos localizados en tejido conjuntivo adyacente a los bronquios disminuyó en comparación con el valor registrado del grupo sacrificado a los 30 días, pero de manera general podemos ver que durante todo el periodo experimental el intervalo de variación fue muy estrecho, por lo que su presencia se mantuvo constante durante el proceso infectivo (Figura 28: C). La presencia de colágeno se vio aumentada en esta fecha de sacrificio la cual se evidenció por el aumento de la coloración rosada en el parénquima pulmonar, pero observando el comportamiento de la aparición de colágeno durante todo el proceso experimental vemos que no supera el índice de 1 del score propuesto por lo que descartamos la presencia de un proceso de reparación (Figura 29: A, C y E). Se encontraron algunas células en estado apoptótico en una zona con un ligero engrosamiento alveolar (Figura 30: C). Se detectó una ligera presencia de TES concentrados en una zona reducida en el parénquima pulmonar (Figura 13: D).

Animales inoculados con 100 huevos.

Se observó un gran aumento en el daño, ya que en la gran mayoría del tejido estudiado se encontraba en su totalidad con engrosamiento alveolar abarcando tanto zonas peribronquiales y perivasculares como del parénquima pulmonar, conteniendo en estos infiltrados linfocitos, macrófagos (Figura 26: B, D y F) al igual que eosinófilos cuya cantidad se vio disminuida, aunque sigue siendo notoria su presencia tanto en el parénquima pulmonar como en la zona de tejido conectivo adyacente a los bronquios (Figura 27: D). La presencia de mastocitos tuvo una considerable disminución en los tejidos de los animales de esta fecha de sacrificio (Figura 28: D). Se encontraron algunas células en estado apoptótico pertenecientes al parénquima pulmonar (Figura 30: D). Se detectó la presencia de TES distribuidos de manera adyacente a las vías aéreas (Figuras 24 y 25).

Inmunohistoquímica.

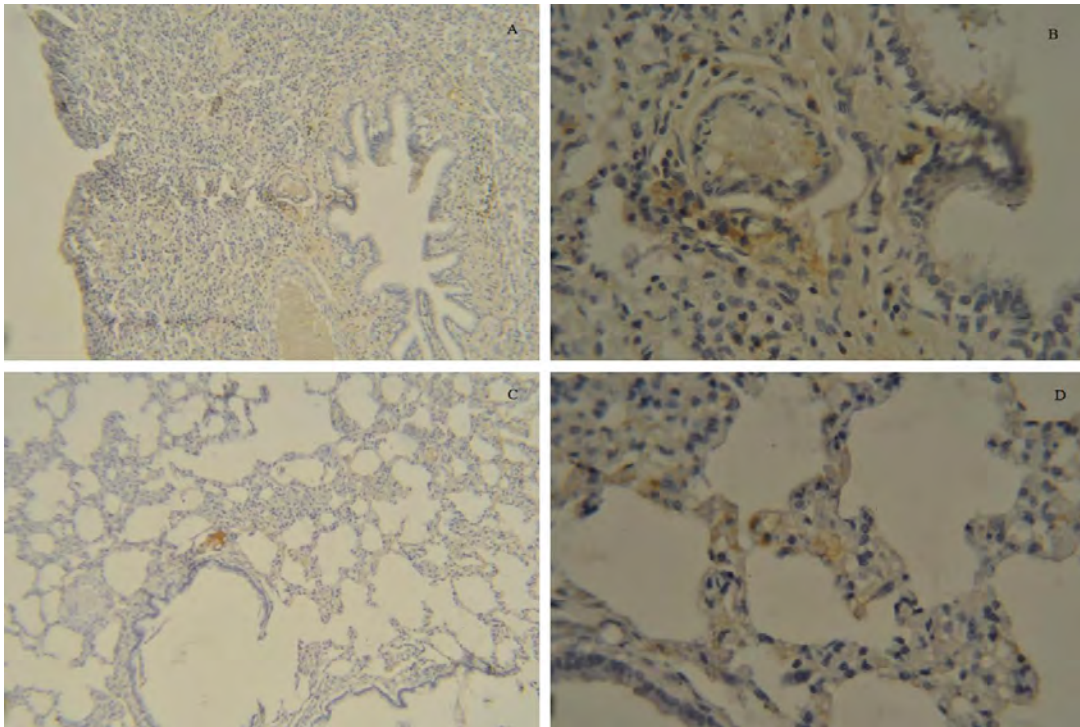


Figura No. 24. Fotomicrografías de cortes histológicos de pulmón de rata. A) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 60 pi. Se observa la presencia de marcaje de los antígenos que difundieron a través del bronquiolo adyacente, además de la pérdida de los alveolos (x100). B) Amplificación de la zona anterior, observándose más a detalle el marcado antigénico (x400). C) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 60 pi. Se observa la presencia de marcaje de los antígenos que difundieron a través del bronquiolo, con un ligero infiltrado celular cerca del marcaje (x100). D) Amplificación de la zona anterior, observándose más a detalle el marcado antigénico (x400).

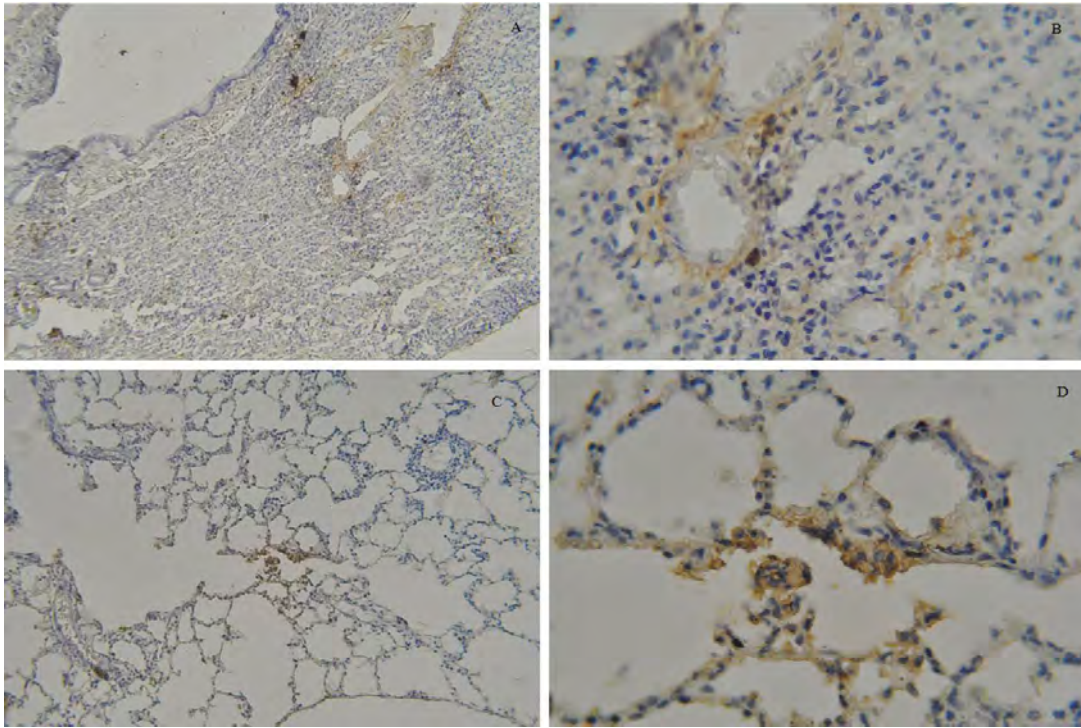


Figura No. 25. Fotomicrografías de cortes histológicos de pulmón de rata. A) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 60 pi. Se observa la presencia de marcaje de los antígenos que difundieron a través del bronquiolo adyacente, además de la pérdida de los alveolos (x100). B) Amplificación de la zona anterior, observándose más a detalle el marcado antigénico (x400). C) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 60 pi. Se observa la presencia de marcaje de los antígenos que difundieron, no hay presencia de daño o de infiltrado celular alrededor de la marca (x100). D) Amplificación de la zona anterior, observándose más a detalle el marcaje antigénico (x400).

Tejidos teñidos con Hematoxilina-Eosina.

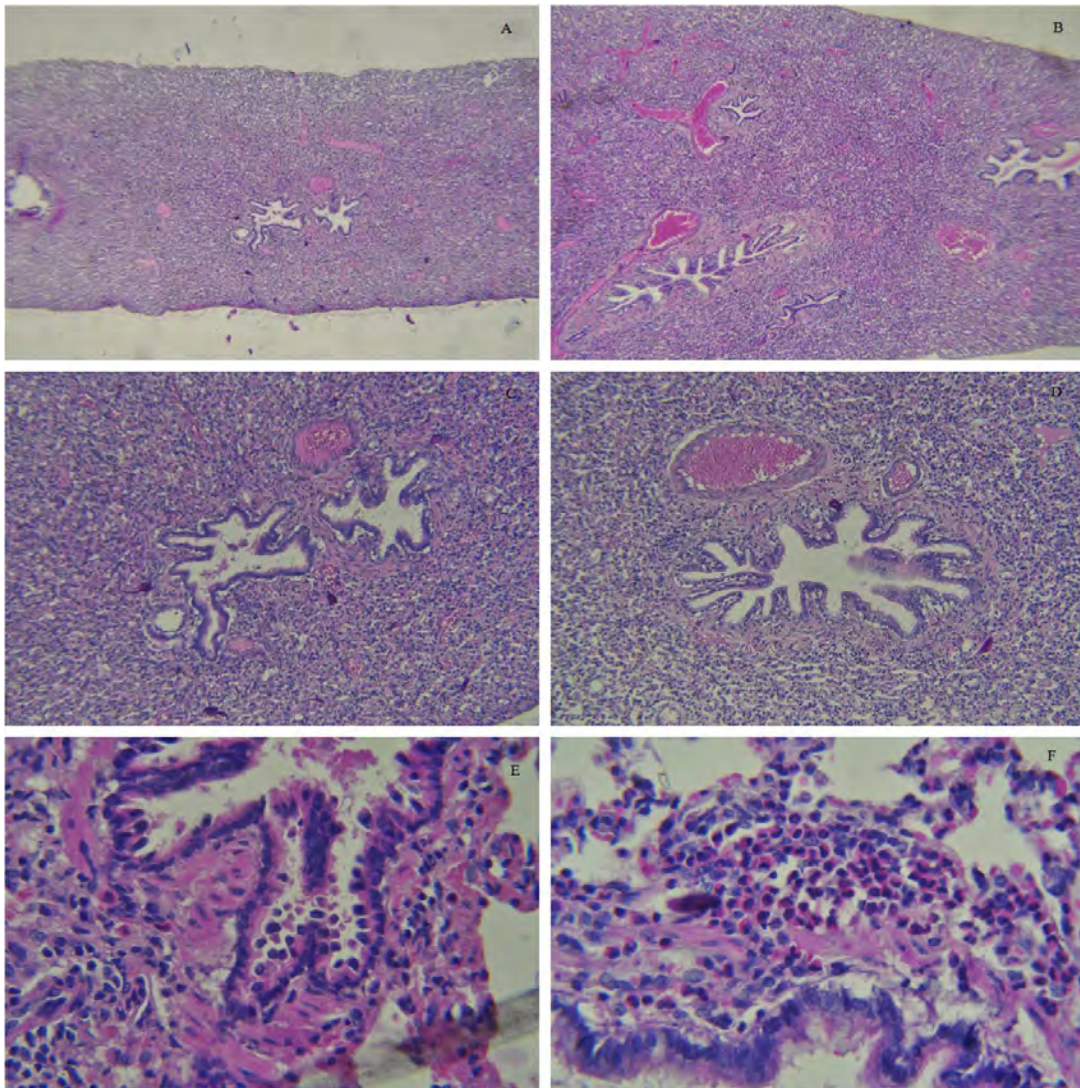


Figura No. 26. Fotomicrografías de cortes histológicos de pulmón de rata. A) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 60 pi. Se observa una pérdida total de los alveolos, además de varios vasos sanguíneos y bronquiolos (x40). B) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 60 pi. Se observa una pérdida total de los alveolos, además de varios vasos sanguíneos y bronquiolos (x40). C) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso A, observándose más a detalle el engrosamiento alveolar (x100). D) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso B, se observa de manera más detallada la totalidad del engrosamiento alveolar, además de varios vasos sanguíneos por los cuales se dio paso a la extravasación celular (x100). E) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 60 pi. Observando el infiltrado celular que se encuentra adyacente al bronquiolo así como en la luz de este. Se muestran células mononucleares así como eosinófilos (x400). F) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 60 pi. Se observa de manera más detallada el infiltrado celular adyacente al bronquiolo con predominancia de eosinófilos (x400).

Eosinófilos.

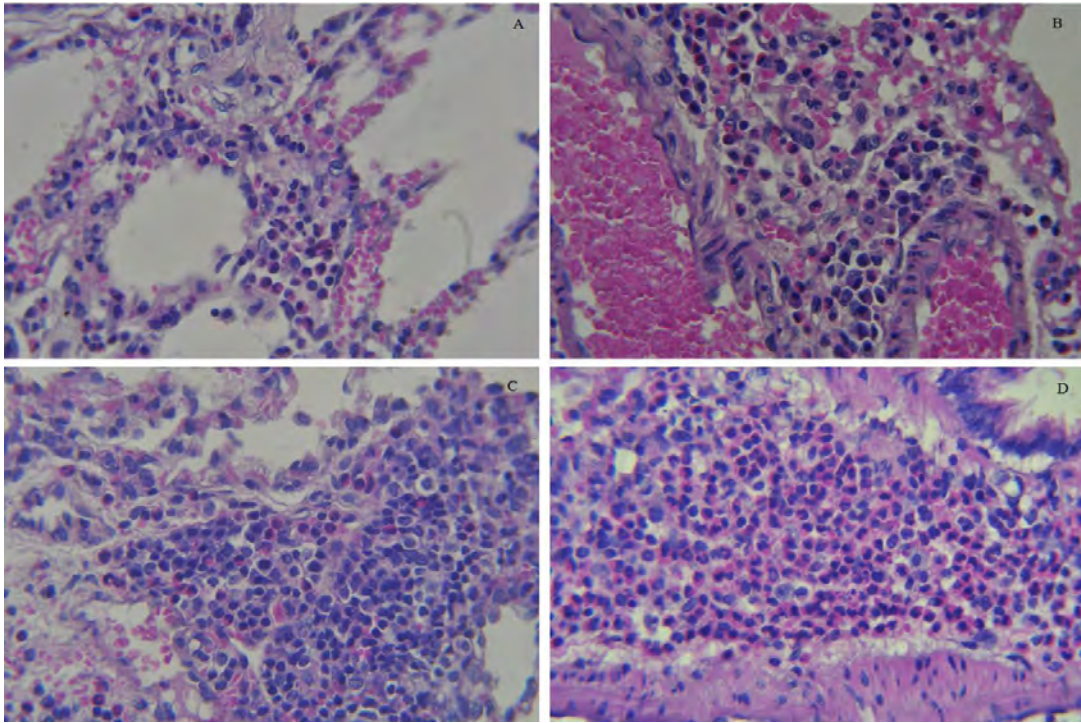


Figura No. 27. Fotomicrografías de cortes histológicos de pulmón de rata. A) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 30 pi. Se observa un infiltrado eosinofílico en la zona del parénquima pulmonar (HE, x400). B) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 30 pi. Se observa un infiltrado eosinofílico en la zona del parénquima pulmonar adyacente a un vaso sanguíneo por donde se dio la extravasación de estos (HE, x400). C) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 60 pi. Se observa un infiltrado eosinofílico en la zona adyacente a un bronquio (HE, x400). D) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 60 pi. Se observa un intenso infiltrado eosinofílico en la zona adyacente a un bronquio (HE, x400).

Mastocitos.

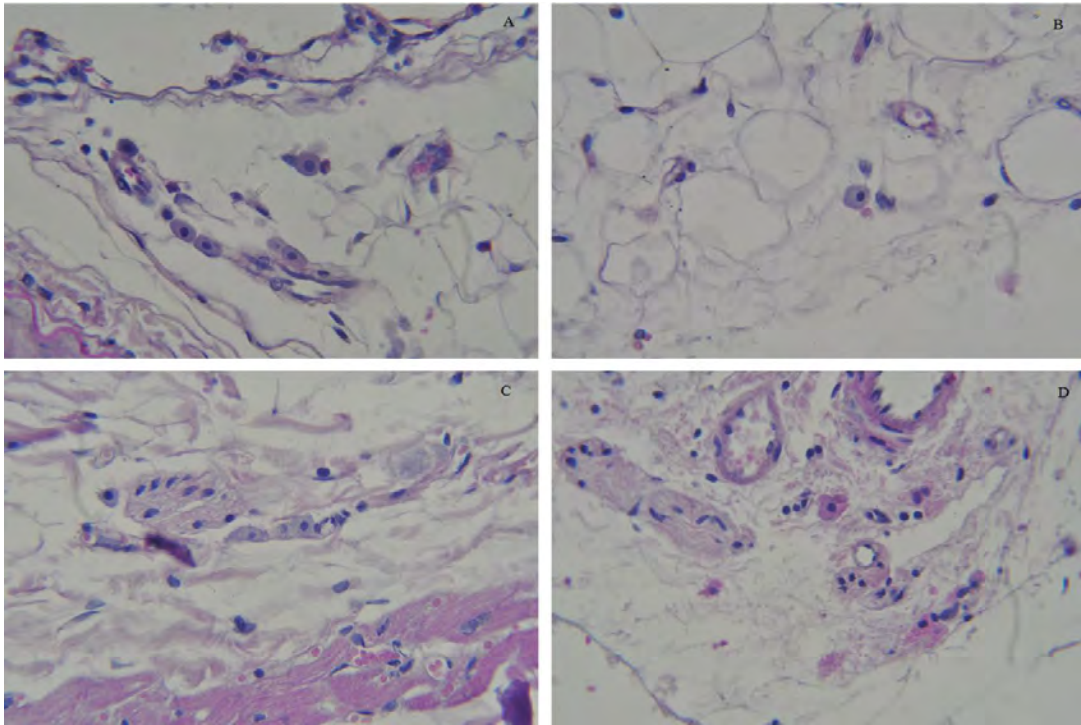


Figura No. 28. Fotomicrografías de cortes histológicos de pulmón de rata. A) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 30 pi. Se observan varios mastocitos en la zona de tejido conectivo adyacente a los bronquios (HE, x400). B) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 30 pi. Se observa un mastocito en la zona de tejido conectivo adyacente a los bronquios (HE, x400). C) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 60 pi. Se observan varios mastocitos algunos de ellos degranulados, en la zona de tejido conectivo adyacente a los bronquios (HE, x400). D) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 60 pi. Se observan varios mastocitos algunos de ellos ya degranulados, en la zona de tejido conectivo adyacente a los bronquios (HE, x400).

Tejidos teñidos con la tinción Tricrómica de Van Gieson.

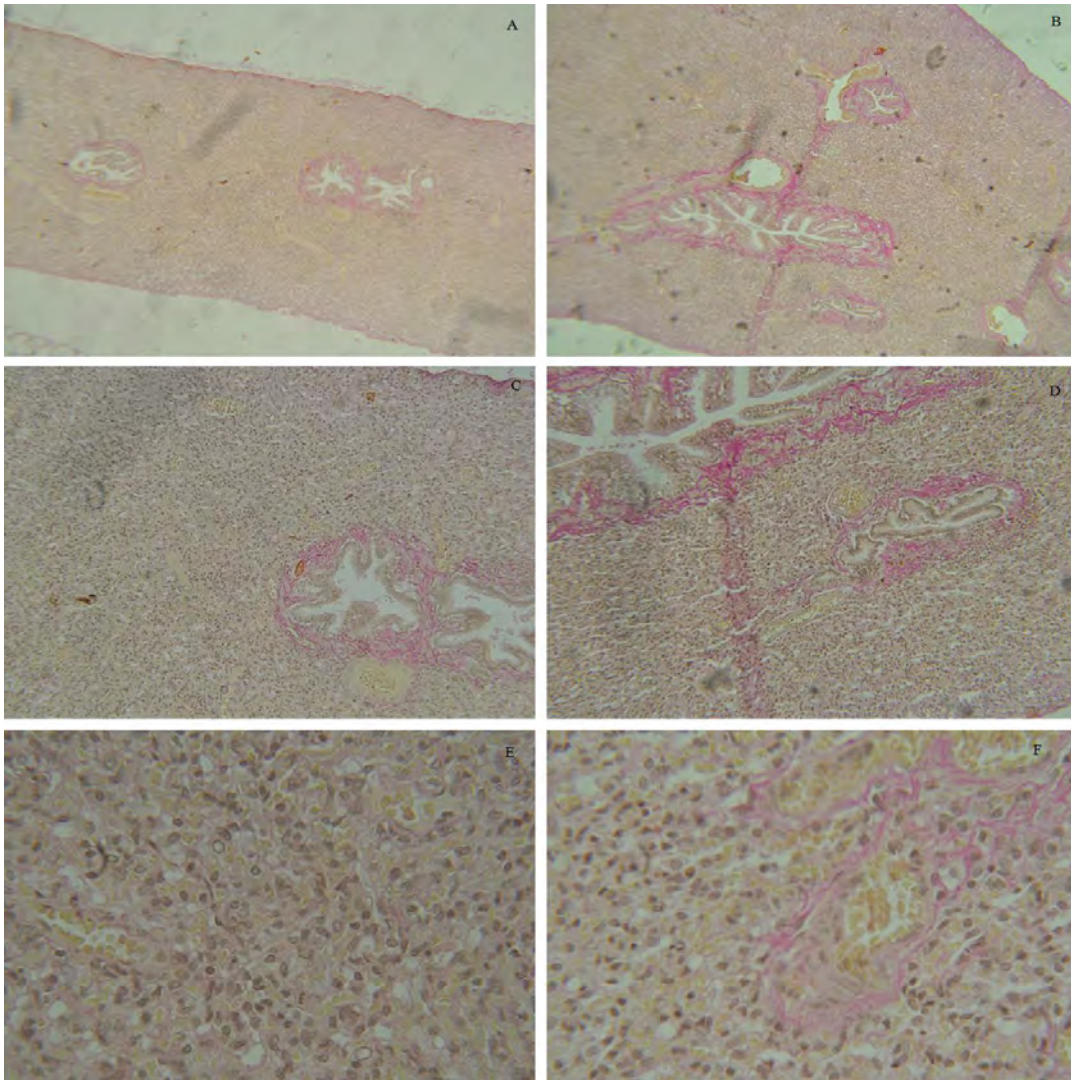


Figura No. 29. Fotomicrografías de cortes histológicos de pulmón de rata. A) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 60 pi. Se muestra el parénquima pulmonar teñido de color rosa, siendo más ligero en la zona central del lóbulo pulmonar. Se observa de coloración roja las aéreas y bronquiolares (x40). B) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 60 pi. Se muestra el parénquima pulmonar teñido de color rosa, siendo más ligero en la zona central del lóbulo pulmonar. Se observa de coloración roja las aéreas y bronquiolares (x40). C) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso A, observándose más a detalle el tejido pulmonar, y la coloración que posee (x100). D) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso B, observándose más a detalle el tejido pulmonar, y la coloración que posee (x100). E) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso C, observándose más a detalle el tejido pulmonar, y la coloración que posee, siendo esta totalmente de color ligeramente rosa (x400). F) Amplificación de la fotografía mostrada en el inciso D, observándose más a detalle el tejido pulmonar, y la coloración que posee, siendo esta ligeramente de color rosado, se puede comparar la intensidad del color con la zona perivascular que se encuentra en el mismo campo (x400).

Tejidos teñidos con Naranja de Acridina.

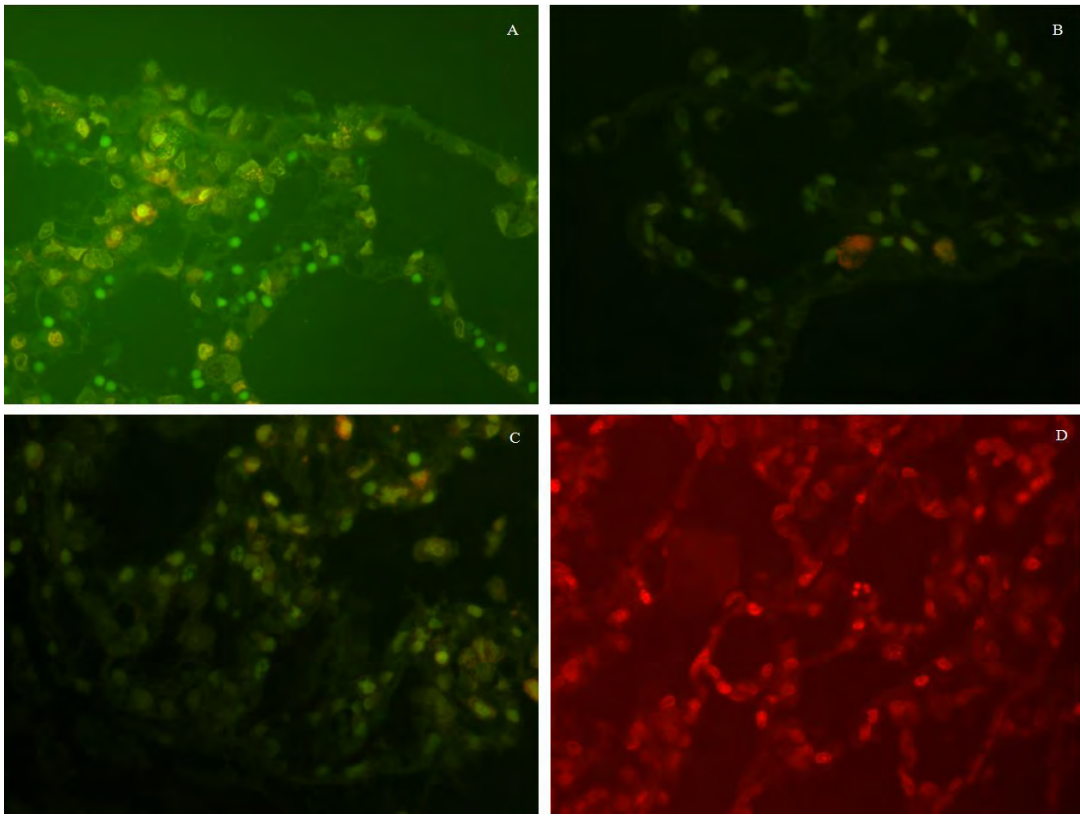


Figura No. 30. Fotomicrografías de cortes histológicos de pulmón de rata. A) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 30 pi. Se observan mastocitos en el parénquima pulmonar, no se encuentran células en estado apoptótico (x400). B) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 30 pi. Se observan mastocitos en el parénquima pulmonar, no se encuentran células en estado apoptótico (x400). C) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 60 pi. Se muestran algunas células en estado apoptótico en la parte media de la imagen, ya que muestran el núcleo fragmentado y su citoplasma se encuentra acinturado (x400). D) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 60 pi. Se muestran algunas células en estado apoptótico en la parte media de la imagen, ya que muestran el núcleo fragmentado y su citoplasma se encuentra acinturado (x400).

La tinción naranja de acridina se usa un fluorocromo que actúa como agente intercalante, interaccionando tanto con DNA como RNA. Su absorción de luz es máxima a 500 nm y emite una fluorescencia de color verde a 520 nm. En este caso se describen las células en estado apoptótico por la morfología celular, en lugar de la longitud de onda que emitan. Se presentan fotomicrografías en color rojo debido al filtro utilizado en el microscopio de fluorescencia.

Tejidos teñidos con Azul de Toluidina y Cromotropo 2R.

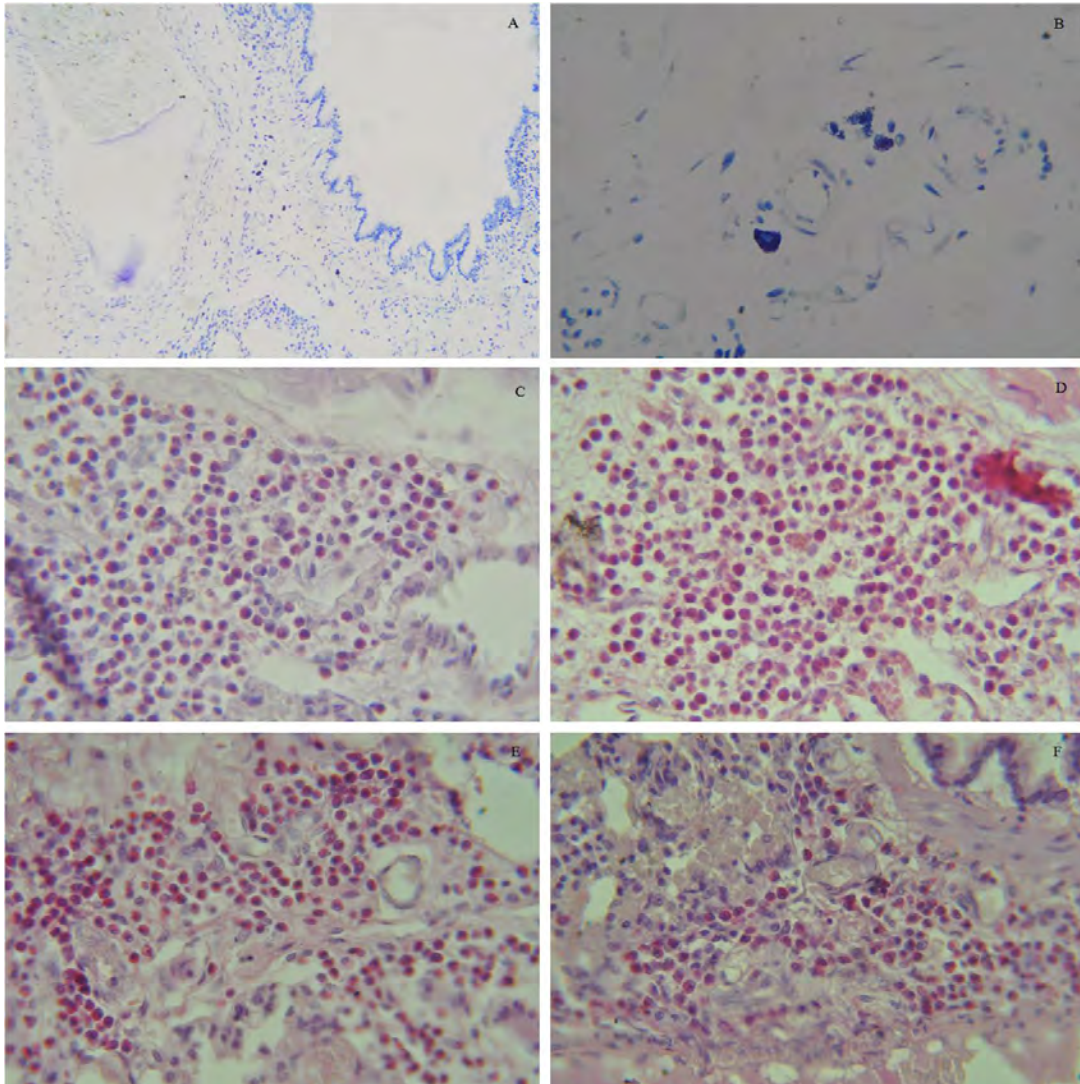


Figura No. 31. Fotomicrografías de cortes histológicos de pulmón de rata. A) Se observa la presencia de mastocitos en el tejido conectivo adyacente a los bronquios (AT, x40). B) Se observa la presencia de mastocitos, algunos degranulados en el tejido conectivo adyacente a los bronquios (AT, x400). C y D) Rata inoculada con 50 huevos y sacrificada al día 30 pi. Se observa un intenso infiltrado eosinofílico en el tejido conectivo adyacente a un bronquio (C2R, x400). E) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 60 pi. Se observa un intenso infiltrado eosinofílico en la zona del parénquima pulmonar (C2R, x400). F) Rata inoculada con 100 huevos y sacrificada al día 60 pi. Se observa un intenso infiltrado eosinofílico en la zona del parénquima pulmonar adyacente a un bronquiolo (C2R, x400). Los incisos A y B, teñidos con azul de toluidina solamente son intencionados con la finalidad de comprobar que sean mastocitos, ya que sus gránulos reaccionan con este colorante.

Gráficos de los parámetros evaluados cualitativamente.

Intensidad del Daño.

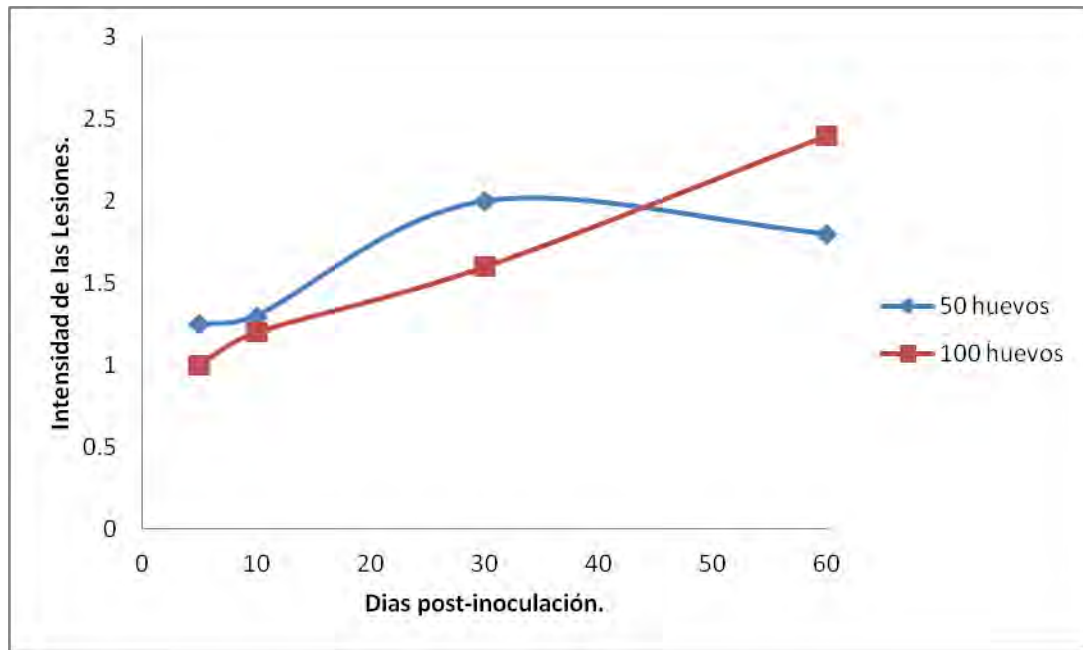


Figura No. 32. Grafica comparativa de la evolución de la intensidad de las lesiones en dos grupos experimentales inoculados con diferentes dosis de huevos. (Los datos obtenidos se expresan mediante el siguiente score: 0 = Ausente, 1 = Leve, 2 = Moderado, 3 = Severo.)

A los 5 y 10 días post-inoculación no se observa mucha diferencia entre ambos grupos experimentales, sin embargo, a partir de los 30 días post-inoculación se observa claramente que el grupo experimental inoculado con 50 huevos alcanza el mayor grado de daño de acuerdo al score empleado y a los 60 días post-inoculación se observa un declive en la intensidad del daño que puede asociarse al inicio de una etapa de reparación. En el grupo experimental inoculado con 100 huevos se observa un aumento progresivo en el daño desde el inicio, dados los tiempos experimentales establecidos no se observa un punto en el que la intensidad del daño comience a disminuir para dar paso a una etapa de reparación.

Mastocitos.

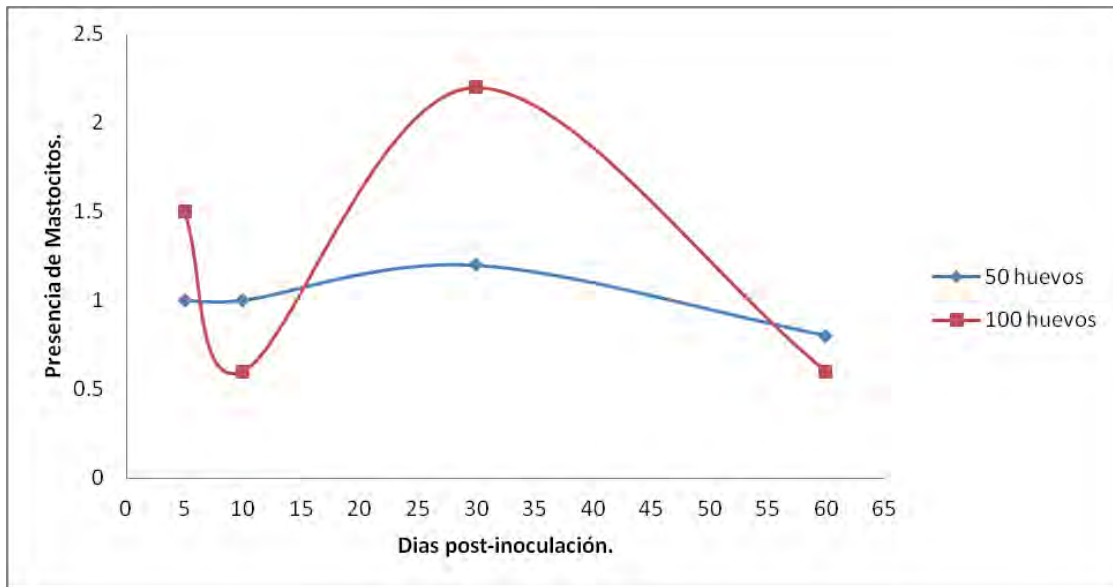


Figura No. 33. Grafico comparativo de la presencia de mastocitos en dos grupos experimentales inoculados con distintas cantidades de huevos. (Los datos obtenidos se expresan mediante el siguiente score: 0 = Ausente, 1 = Leve, 2 = Moderado, 3 = Severo.)

En el gráfico se puede observar que, en el grupo inoculado con 50 huevos, a lo largo del periodo experimental no hubo variaciones muy marcadas en la presencia de dicha población celular. En cambio, en el grupo experimental inoculado con 100 huevos se observan variaciones que pueden deberse a la degranulación de dichas células. No hay una tendencia definida en el comportamiento de esta población celular.

Eosinófilos.

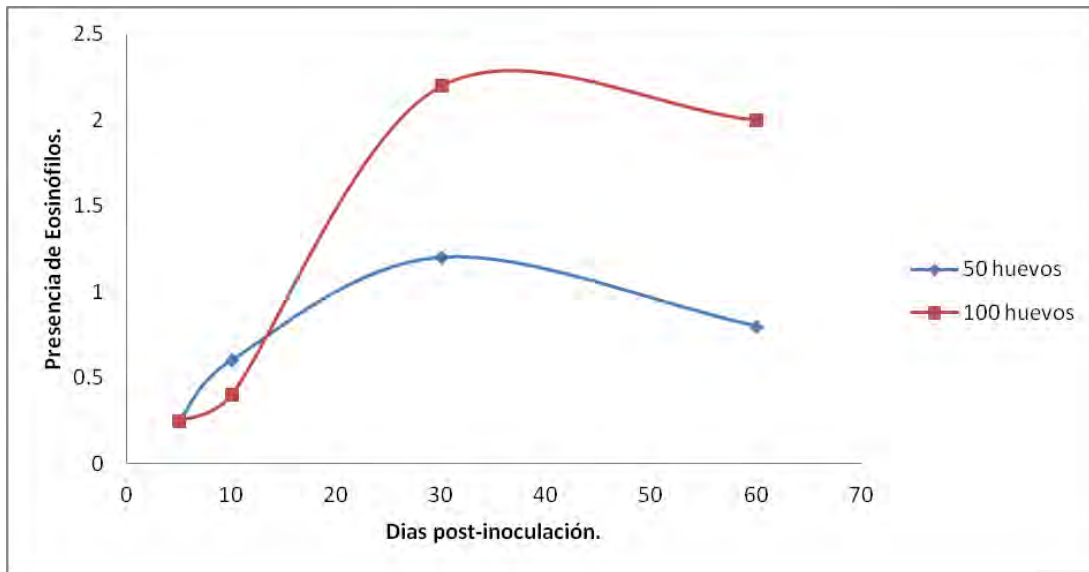


Figura No. 34. Densidad de eosinófilos presentes en el tejido pulmonar. (Los datos obtenidos se expresan mediante el siguiente score: 0 = Ausente, 1 = Leve, 2 = Moderado, 3 = Severo.)

En este grafico se observa claramente la tendencia en ambos grupos al aumento de la población de eosinófilos. Esto se debe a que esta población celular en particular se encuentra asociada a las infecciones parasitarias. Se alcanza un pico máximo a los 30 días post-inoculación y posteriormente hay un descenso de dicha población celular pero debido al tiempo de duración del experimento no podemos determinar si en algún punto regresan a los valores iniciales una vez que el sistema inmune ha logrado eliminar los antígenos.

Presencia de Colágeno.

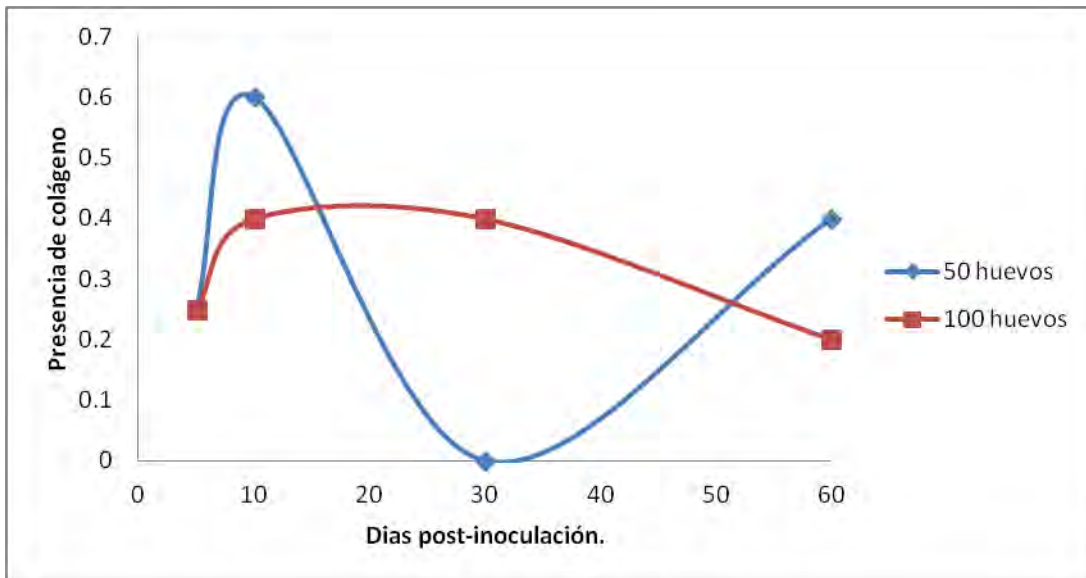


Figura No. 35. Grafico comparativo de la variación del colágeno presente en el tejido pulmonar en dos grupos experimentales inoculados con distintas dosis de huevos. (Los datos obtenidos se expresan mediante el siguiente score: 0 = Ausente, 1 = Leve, 2 = Moderado, 3 = Severo.)

Inicialmente en ambos grupos presentan una proporción de colágeno similar. A los 10 días el grupo experimental inoculado con 50 huevos presenta un pico mayor indicando que hay mayor presencia de colágeno posiblemente asociada a un mayor índice de reparación a comparación del grupo inoculado con 100 huevos. Al día 30 se observa la mayor diferencia entre ambos grupos experimentales, co-relacionando esto con lo observado con la técnica de HE podemos suponer que el descenso de colágeno en el grupo experimental inoculado con 50 huevos se debe a que en esta etapa del proceso es el pico máximo de daño y los intentos del tejido por repararse no son suficientes para alcanzar un equilibrio y se ve superado por la destrucción del mismo ocasionada por la respuesta inmune, en cambio a los 60 días post-inoculación se observa un incremento en la presencia de colágeno lo cual puede significar que al empezar a disminuir la intensidad de la respuesta inmune la reparación del tejido va incrementando. En cuanto al grupo experimental inoculado con 100 huevos se observa claramente un decremento en la presencia de colágeno, si relacionamos esto con lo observado en la tinción con HE, en cuyo caso no se observa el pico máximo, el colágeno irá disminuyendo de manera gradual hasta que la respuesta inmune disminuya y de paso a un proceso de reparación. Debido al tiempo de experimentación no se puede observar este momento en particular pero la tendencia del grafico indica un comportamiento de ese tipo.

Discusión.

Toxocara canis es un parásito que se presenta con mucha frecuencia en los cánidos y que por su alta capacidad zoonótica representa un riesgo para la salud humana, causando diversas alteraciones asociadas al síndrome de larva *migrans* visceral u ocular y la toxocariosis oculta en las que son ostensibles lesiones viscerales y musculares derivadas de la migración y asentamiento final de los estadios larvarios en tejidos como el muscular esquelético y cerebral, la infección representa un riesgo constante ocasionando lesiones asociadas a la destrucción de los tejidos, la producción de hemorragias y la presentación de procesos inflamatorios que se hacen crónicos debido a la liberación de los antígenos secretores-excretores producidos de forma continua y abundante por las larvas que dejan secuelas en el funcionamiento de los tejidos. Una faceta no estudiada de la toxocariosis es la relacionada con el depósito de los huevos larvados del nematodo en los pasajes respiratorios, la cual se ve facilitada por la contaminación ambiental con materia fecal de animales portadores de los gusanos adultos, los cuáles, liberan con las heces gran cantidad de huevos, y ya en el ambiente desarrollan las fases infectantes que se mantienen viables por períodos prolongados en suelos húmedos o francamente lodosos en los que se integran las heces diluidas y al secarse esta mezcla debido a fuerzas mecánicas esta mezcla es suspendida en el aire facilitando la posibilidad de que los sólidos sean aspirados por animales o humanos, surgiendo el potencial para provocar alteraciones de naturaleza variable que dependerán de la cantidad de estructuras parasitarias aspiradas debido a su elevado potencial antigénico para el hospedador, por lo que este aspecto fue el objeto de estudio para desarrollar este trabajo (Martínez, 2005; Ramírez, 2014; Romero *et al.*, 2014).

La presencia de los huevos larvados en el tejido pulmonar de las ratas con exposición inducida, fue capaz de inducir una serie de cambios tisulares asociados primariamente a una respuesta inflamatoria (como parte de una respuesta inmune), para delimitar la zona expuesta al agente o sus productos. Al comparar las lesiones y la intensidad del daño en el tejido pulmonar, estas resultaron más importantes al final del estudio en el grupo de animales inoculados con 100 huevos larvados, encontrando los efectos más importantes en los grupos de animales sacrificados a los 30 y 60 días pi. ya que prácticamente se duplicó la intensidad y extensión de la inflamación respecto a los animales sacrificados dentro de los primeros 10 días después de haberse depositado las estructuras parasitarias. Se puede considerar que el efecto fue dependiente de la cantidad de huevos larvados que se inocularon; incluso a pesar de no haberlos encontrado en los cortes estudiados se pudo observar toda una serie de alteraciones como fue el engrosamiento de los septos

alveolares y la persistente eosinofilia por citar algunas de unas de estas alteraciones tisulares, que deberán asociarse a la liberación de productos de secreción excreción a través de las diferentes capas que envuelven a las fases infectantes, las cuales aunque podrían eliminarse mediante mecanismos físicos por los pulmones, fueron capaces de difundir los antígenos que indujeron una respuesta que persistió a lo largo de todo el estudio y que ha sido demostrada en diversos trabajos (Alba, 1999; Buendía, 2004; Martínez, 2005) al quedar depósitos de los TES en los tejidos y mantener un estímulo inductor de inflamación en el sitio del evento (Ahmad *et al.*, 2013). Este estímulo inductor de los TES, junto al hecho de haberse inoculado huevos larvados, que al no haber encontrado las condiciones favorables para eclosionar no eclosionaron ni migraron, pero su presencia provocó la presentación de un estímulo antigénico-eosinofílico constante. Esto ocasionó que en nuestros resultados, la eosinofilia comenzara a aumentar a partir del día 5 pi. manteniéndose en constante incremento durante todo el periodo de infección, exceptuando en la última fecha de sacrificio, ya que hubo una ligera disminución la cual podría deberse realmente por la aparición de una meseta que mantenga constantes los niveles de eosinófilos en lugar de una verdadera disminución. Este comportamiento coincide con otros estudios (Pencinali *et al.*, 2005) en los que se muestra que en modelos donde si hay una migración larvaria, los niveles del Regulador de la activación de linfocitos T expresados y secretados (RANTES), la eotaxina, y la cantidad de eosinófilos en el lavado broncoalveolar (BAL) empiezan a incrementar a los 4 días pi. teniendo un pico máximo en el día 11, y que después del día 15 estos valores comienzan a disminuir, esto debido a que la migración larvaria se lleva a cabo en dos fases, siendo que para después del día 14-15 pi. las larvas comienzan a acumularse tanto en el tejido cerebral como en el músculo esquelético, por lo que se elimina el estímulo en el tejido pulmonar (Pencinali *et al.*, 2005).

En esta helmintiasis como en muchas otras, el componente celular de la respuesta está ligado a un perfil inmunológico de tipo Th2. Esta respuesta ocurre en dos etapas; la primera de ellas ocurre de manera rápida y es iniciada por células cebadas, estas liberan mediadores preformados que son almacenados en los gránulos citoplasmáticos, dentro de los que incluyen histamina, heparina, proteasas y factores quimiotácticos para neutrófilos y eosinófilos. Posteriormente hay una síntesis de *novo* y secreción de mediadores secundarios como el factor activador de plaquetas, prostaglandinas y leucotrienos, los cuales también juegan un papel importante en el reclutamiento y concentración local de eosinófilos; además algunos de sus efectos biológicos son inducir la contracción del músculo liso de los bronquios, incrementar la permeabilidad vascular y secreción de moco que se asocia a los trastornos observados en la periferia de los pasajes respiratorios de los animales expuestos. La segunda fase se caracteriza por el reclutamiento de eosinófilos, macrófagos

y linfocitos (Buendía, 2004). Estos linfocitos corresponden al tipo CD4⁺ y se caracterizan por producir un panel de citocinas que incluyen la IL-4, -5, -6, -10 y -12 que asociadas a la aparición del tejido necrótico son capaces de inducir aún más la proliferación celular leucocitaria (Alba, 1999). El papel de la IL-5 es de gran importancia ya que es el mayor regulador de la eosinofilia, mediando su proliferación, comportamiento y maduración, las cuales tienen como principal papel la unión con los antígenos y de esta manera liberar sus gránulos citotóxicos (Alba, 1999., Kwung *et al.*, 2003; Takamoto *et al.*, 1997). Otros eventos asociados a este proceso incluyen la secreción de grandes cantidades de IgE e IgG, que aun cuando se producen en grandes cantidades carecen de efectos para eliminar al parásito puesto que hay estudios que han demostrado que no hay correlación entre el nivel de IgG₁ con la disminución de las larvas recuperadas debido al desprendimiento de los TES que forman la epicutícula, y por el contrario se ha demostrado que cuando estos productos quedan depositados en los tejidos su presencia se asocia al desarrollo exacerbado de la respuesta inflamatoria. (Kwung *et al.*, 2003; 2013).

En los tejidos de los animales usados en este estudio se observaron cambios que son compatibles a la presencia de los huevos larvados del parásito en los pasajes respiratorios y comparables a los observados en el parénquima pulmonar cuando ocurre el desplazamiento migratorio normal en los hospedadores paraténicos que ha sido descrito en la literatura (Buendía, 2004; López *et al.*, 2013; Martínez, 2005) y que se atribuye particularmente al depósito y difusión de los TES que son liberados continuamente por los estadios larvarios. Al inicio de las observaciones en los tejidos de los animales empleados en este estudio se observó un gran predominio de mastocitos, neutrófilos y macrófagos y conforme avanzó el tiempo se incrementaron las concentraciones de eosinófilos, lo que nos muestra de manera indirecta que hay una mayor producción de IL-5, siendo esto congruente con las dos fases que se describen en la literatura (Buendía, 2004).

Los cambios observados en el tejido pulmonar son producidos particularmente por los TES que se difunden a través de las envolturas y tienen la capacidad de inducir un efecto mitogénico sobre los linfocitos que en función a las citocinas liberadas por estas células durante la interacción, ocasionan un incremento importante en la presencia de células inmunológicas, debido a su reclutamiento y estimulando su permanencia a nivel local, lo cual se asocia al desarrollo de una inflamación sostenida (Alba, 1999). Esto explica también porque aun cuando no se detectó físicamente ningún huevo larvado en los tejidos que se estudiaron se observó la evolución de una respuesta inflamatoria que gradualmente se fue incrementando y pudo evidenciarse con la

inmunohistoquímica al principio y al final del estudio con la presencia de TES que difundieron en el tejido pulmonar para provocarla, lo cual confirma que desde este punto es factible inducir una respuesta inmune contra el parásito; la llegada y depósito de los huevos larvados de este parásito a los pasajes respiratorios, y a pesar de que no se presente la eclosión de las larvas contenidas en estos debido a que no se encuentran las condiciones propicias del ambiente son capaces de liberar antígenos, y que aunque mediante el moco y la expectoración estas estructuras podrían llegar a ser expulsadas de forma rápida, el tiempo de permanencia aun siendo breve permite la estimulación suficiente para desencadenar la serie de cambios observados (figuras no. 14-17; Ahmad *et al.*, 2011; Alba, 1999; Kwung *et al.*, 2003). Los TES son importantes productos metabólicos de los nematodos, ya que de ellos depende su capacidad inmunoevasora y la posibilidad de sobrevivir en el cuerpo de los hospedadores. En el caso de *Toxocara canis* existen varios grupos de estos antígenos con propiedades enzimáticas, mimetizantes y de adherencia que le brindan al nematodo una elevada eficiencia en este sentido y que definitivamente están asociados al desarrollo de importantes alteraciones tisulares (Martínez, 2014). Como ya se mencionó, la eosinofilia es una característica importante en la evolución de las infecciones producidas por las larvas de *T. canis* al igual que en otras helmintiasis, pero que en el caso de las larvas de *T. canis* este tiene la capacidad de resistir al ataque que es orquestado por los eosinófilos desprendiendo su epicutícula continuamente para dejar una estela de células inflamatorias a su paso cuando se trata de tejidos de tránsito y la superposición de grandes concentraciones de estos componentes cuando las larvas se estacionan desencadenando la formación de estructuras granulomatosas que llegan incluso a la calcificación. Este mecanismo de supervivencia dependiente de los TES es de suma importancia ya que se han reportado estudios (Maizels, 2013) en ratones transgénicos que sobreexpresan IL-5, conduciendo de esta manera a una elevada eosinofilia, y que infectados con *T. canis*, las larvas no se ven comprometidas; mientras que en la infección con el nematodo *Nippostrongylus brasiliensis*, en el mismo modelo biológico, este resulta eliminado; pero que en el caso de una coinfección con *N. brasiliensis* junto con los antígenos de secreción y excreción purificados de *T. canis*, la supervivencia de *Nippostrongylus* se ve aumentada, resaltando así la actividad inmunoevasora de los TES. No obstante al ser estos una mezcla compleja de diversos componentes moleculares, se necesita realizar nuevos estudios que permitan elucidar más en el conocimiento y caracterización de los efectos inmunomoduladores que poseen (Maizels, 2013). De igual manera es importante reconocer que *T. canis* está adaptado hacia su hospedador definitivo antes que a un hospedador intermediario o accidental y que está "mala adaptación" hacia al hospedador puede hacer que reaccione de una manera más violenta generando una mayor patología (Maizels, 2013). Mientras que en los perros se da un comportamiento dual, siendo un hospedador definitivo como

intermediario dependiendo de la edad que tengan estos, y que en el caso de las perras gestantes las larvas son reactivadas por mecanismos hormonales, desarrollándose los mismos efectos patogénicos que son capaces de llegarse a manifestar durante periodos muy prolongados, además de que se pueden ir liberando de manera gradual a la descendencia (González, 2009).

Como podemos ver, dentro de los primeros 10 días se observaron zonas incipientes con engrosamiento de los septos alveolares que en cuyos infiltrados celulares predominaron los neutrófilos, macrófagos y linfocitos. Posteriormente en las lesiones a partir de los días 30 y 60 pi, se observó un aumento notorio tanto en la intensidad como en la aparición de zonas con engrosamiento de los septos alveolares, destacando en la composición de los infiltrados eosinófilos, macrófagos y linfocitos mientras que en los septos alveolares las zonas de engrosamiento mayor, se encontraban en la periferia de las vías aéreas tanto en bronquios como bronquiolos, gracias a que los huevos larvados se depositaron en la luz de estos (figuras 9, 19-22; Alba, 1999). Durante el periodo de infección no se observó un proceso de cicatrización o reparación de las lesiones (esto significa que el proceso iba a continuar), al no encontrar un incremento de colágeno que incrementara la matriz extracelular, descartando de esta manera la formación de tejido fibroso en los pulmones de las ratas; por lo que el periodo que de observación definido previamente no fue el suficiente para que se llevara a cabo este proceso (figuras 10, 28-31; Ming *et al.*, 2008). De igual manera se observó una mayor cantidad de células cebadas en los pulmones de los animales infectados en comparación con los testigos, pero estas diferencias fueron irregulares en los diferentes periodos de sacrificio, lo que probablemente puede deberse a que muchas de estas células se estaban degranulando durante el proceso de la infección (figuras 11, 23 y 24; Buendia, 2004). Se ha visto que en las infecciones por patógenos hay un aumento en el proceso de apoptosis, este proceso apoptótico se ha estudiado en infecciones parasitarias donde las larvas se encuentran de forma libre a nivel tisular y llevando a cabo una interacción de manera directa con los mismos, reportándose que este evento juega un papel especial durante estas infecciones debido a que algunos de estos lo utilizan como una estrategia de supervivencia generando un ambiente inmunoprivilegiado por la estimulación de este proceso en los linfocitos (Duarte *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2014). En este caso donde no existe una interacción directa larva-hospedador, sino que es a través de una cubierta, obtuvimos que este proceso se comenzó a llevar hasta los 60 días pi, lo que nos lleva a plantear que posiblemente esto pueda ser debido a que en este periodo el daño de las lesiones fue el mayor registrado, además de que las dosis utilizadas no fueron muy elevadas, como se ha realizado en otros estudios (Alba, 1999; Buendia, 2004; Martínez, 2005) con una interacción directa entre larva-hospedador y que se ha visto que en el caso de *Toxocara*, es un proceso

dependiente de la concentración larvaria y del tiempo de infección. En este punto es importante recalcar el tipo de interacción que se da en nuestro estudio ya que independientemente de las dosis y tiempo de infección, el resultado obtenido es el reflejo de este tipo de interacción que no ha sido estudiada previamente, lo que nos conlleva a generar una comparación entre los dos distintos fenómenos y que nos permite generar así el planteamiento anterior. Sin embargo sí hay estudios en otros nematodos que dependiendo de la fase del ciclo biológico en que se encuentren puede cambiar la respuesta, ejemplo de ello es el caso de *Brugia malayi* donde, dependiendo del estadio en el que se encuentren el ciclo biológico secretan distintos antígenos que son capaces de inducir e inhibir diferentes tipos de células inmunológicas; dándonos una base de que los comportamientos son exclusivos a las fases evolutivas y la interacción dependiente de esta. Además existe la variable de que el sitio de interacción inicial con el parásito no es físicamente dentro del parénquima de un órgano, si no sobre los pasajes respiratorios, y que en nuestros resultados no se puede diferenciar el tipo celular que llevo a cabo este proceso si es que pertenece a una célula del parénquima pulmonar o es del sistema inmune. No obstante aún es muy poca la información que se conoce sobre la relación entre este proceso y la infección en general por *Toxocara*.

Los resultados del trabajo sugieren que la respuesta inmune que se monta en los pulmones de rata en contra de los huevos larvados de *T. canis* no es de naturaleza protectora. Debido a que no se encuentran indicios de que los huevos larvados fueron eliminados por esta, ya que el daño fue progresivo y al final del estudio no se observó una tendencia a la disminución del proceso. Esto muestra entonces que esta forma de respuesta más que proteger, favorece el desarrollo de daño, ya que la presencia de los infiltrados eosinofílicos en lugar de proteger al hospedador y eliminar al parásito y gracias a los mediadores que secreta, aumenta a la hiperreactividad en las vías respiratorias ocasionando problemas respiratorios y exacerbando el daño que se presenta en alergias así como en el asma (Buendía, 2004).

Debe considerarse que en el caso de los humanos, la exposición ocurre de forma azarosa pudiendo ser una condición continua y la cantidad de huevos inhalados puede variar, pero esta será una condición constante, de manera que los huevos podrán sobrepasar las barreras de defensa de las vías respiratorias altas y contando con muy efectivos sistemas de inmunoevasión se depositarán en los bronquios y bronquiolos, permaneciendo durante un periodo prolongado pudiendo superar las dosis infectivas utilizadas en este estudio. Esto recalca la importancia que tiene esta enfermedad y esta forma diferenciada de afección que se ve reflejada en la repercusión hacia la salud humana, ya que las personas cíclicamente se pueden exponer al contacto con las partículas de polvo

transportando los huevos, que puede ser especialmente importante cuando las personas tienen una intensa exposición en ambientes externos como aquellos que se desempeñan en servicios de limpieza o de la construcción.

Conclusiones y Perspectivas.

- I. La posible inhalación de huevos larvados de *Toxocara canis* y una continua exposición, genera un daño persistente en el tejido pulmonar del hospedador tanto a nivel de los pasajes respiratorios como en las áreas periféricas a estos.
- II. La aspiración de bajas dosis de huevos larvados ocasiona el desarrollo de una forma diferenciada de afectación por la parasitosis ligada al desarrollo de una respuesta inmune de naturaleza no protectora la cual sólo resulta en una serie de alteraciones aún sin una asociación directa con el parásito.
- III. Las lesiones observadas en los animales inoculados con huevos larvados de *Toxocara canis* incluyeron concentraciones crecientes de células cebadas, eosinófilos y linfocitos que se observaron asociados a engrosamiento de los septos alveolares. El incremento gradual se observó a lo largo de los 60 días que duró el estudio y la forma de evolución sugiere que este proceso sigue evolucionando.
- IV. Se demostró mediante la técnica de inmunohistoquímica la presencia de los TES durante todo el período de observación tanto dentro de las zonas que desarrollaron las lesiones cerca de los pasajes respiratorios.
- V. Se caracterizó el comportamiento eosinofílico durante esta forma diferenciada de afectación a nivel de los pasajes respiratorios y sus tejidos periféricos, correlacionando con el comportamiento observado en las infecciones de tipo sistémico inducidas en los diferentes modelos animales considerando que estas células son un indicador de la respuesta inflamatoria e inmune que ocurre contra este organismo en su estado larvario.

Dentro de las perspectivas a este trabajo, se considera que los siguientes puntos serían de gran aporte al estudio de este tipo de afección.

- I. Evidenciar en el tejido pulmonar así como en el lavado broncoalveolar las citocinas que ejercen un efecto quimiotáctico sobre los eosinófilos como lo son la IL-5, RANTES y la eotaxina.
- II. Profundizar en el estudio del rol inmunológico que tienen los TES, detectando poblaciones de linfocitos T reguladores así como el panel de citocinas secretadas por estos, para que de esta manera se puedan proponer nuevos mecanismos por los cuales lleven a cabo su efecto inmunoregulador.

- III. Profundizar mediante técnicas como la tinción de TUNEL, en la importancia que tiene el proceso de apoptosis y su relación a la infección por *Toxocara canis*, elucidando aún más el efecto biológico de los TES.
- IV. Realizar la inoculación de huevos larvados en el tejido pulmonar, utilizando modelos biológicos que permitan el estudio de las alergias, obteniendo una mayor información sobre el papel que juega el parásito en el daño asociado a bronquios.
- V. Se deben crear e implementar nuevos proyectos del sector salud que impacte en la sociedad enfocados a fortalecer los programas y medidas de control sanitario incluyendo la recolección permanente de las heces caninas, que se encuentran tanto en parques como en vías públicas evitando así el desarrollo de focos infecciosos, previniendo el desarrollo de este padecimiento que al tener capacidad zoonótica puede vulnerar la salud humana.

Referencias.

1. Abrahams P.W. (2006). Soil, geography and human disease: a critical review of the importance of medical cartography. *Progress in Physical Geography* 30, 490–512
2. Ahmad A. O., Safinaz H. El-Shourbagy, Rasha H. S. (2011). Kinetics of Foxp3-expressing regulatory cells in experimental *Toxocara canis* infection. *Exp Parasitol.* 127, 454–459
3. Ahmad A.O. (2012). Therapeutic battle against larval toxocariosis: Are we still far behind? *Acta Tropica* 124, 171-178.
4. Ahmad A.O., Ashour D. S, Mohamed D. A. (2013). *Toxocara*-induced hepatic inflammation: Immunohistochemical characterization of lymphocyte subpopulations and Bcl-2 expression. *Exp. Parasitol.* 134, 76–81
5. Ahmad N., Maqbool A., Saeed K., Ashraf K., Qamar M. F. (2011) Toxocariosis, its zoonotic importance and chemotherapy in dogs. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 21(2):, Page: 142-145
6. Akao N., Misato T., Eiji H., Ryoko S., Masumi S.S., Kazuhiro S., Koichiro F. (2003). Cerebellar ataxia due to *Toxocara* infection in mongolian gerbils, *Meriones unguiculatus*. *Vet Parasitol* 113, 229–237
7. Alatorre H. L. (2005). Evaluación por citometría de flujo de algunas poblaciones celulares presentes en bazo, timo y sangre de ratones de la cepa BALB/C infectados con L2 de *Toxocara canis*. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
8. Alba H. F. (1999). Evaluación de un modelo de toxocariosis ocular y sistémica empleando jerbos (*Meriones unguiculatus*). Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
9. Archelli S., Santillan G.I., Fonrougea R., Céspedes G., Burgos L., Radman N. (2014). Toxocariosis: Seroprevalence in abandoned-institutionalized children and infants. *Rev Argent Microbiol.* 46, 3-6
10. Buendia J.J. A. (2004). Determinación de las poblaciones celulares en pulmón de ratones infectados experimentalmente con huevos larvados de *Toxocara canis*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
11. Callister D.M., Alan D. W., Antony P. P., Maizels, R. (2008). Four abundant novel transcript genes from *Toxocara canis* with unrelated coding sequences share untranslated region tracts implicated in the control of gene expression. *Molec & Biochem Parasitol* 162, 60–70.
12. Calum N.L. M. (2013). The epidemiology and public health importance of toxocariosis: A zoonosis of global importance. *Int. J. for Parasitol.* Volume 43, 999–1008

13. Campagna S., Lévesque B., Anassour E.L.S., Côté S., Bouchra S., Ward B.J., Libmane M.D., Drebotf M.A., Makowskif K., Andonovaf M., Ndaod M., Dewailly E. (2011). Seroprevalence of 10 zoonotic infections in 2 Canadian Cree communities. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 70, 191–199
14. Carlyle S. P., Thompson. A., Traub R., Rees R., Robertson. I.D. (2008). National study of the gastrointestinal parasites of dogs and cats in Australia. *Vet. Parasitol*. 151, 181–190
15. Castillo, D., Paredes, C., Zañartu, C., Castillo, G., Mercado, R., Muñoz, V., Schenone, H. (2000). Contaminación ambiental por huevos de *Toxocara* sp. en algunas plazas y parques públicos de Santiago de Chile. *Boletín Chileno de Parasitol*. Vol 55, 86-91
16. Causap A.C., Quilez J., Sfinchez A.C., del Cacho E. (1996). Prevalence of intestinal parasites, including *Cryptosporidium parvum*, in dogs in Zaragoza city, Spain. *Vet Parasitol*. 67, 161-167
17. Duarte T., Robles M.L., Nascimento G., Costa G., Montiel R., Coelho A. V., Simões N. (2009). An apoptosis inducing serine protease secreted by the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *Intl Jrnal for Parasitol* 39, 1319–1330
18. Dubna, S. I., Langrova I., Jankovska, J., Vadlejch S., Pekar J., Napravnik J. F. (2007) Contamination of soil with *Toxocara* eggs in urban (Prague) and rural areas in the Czech Republic *Vet Parasitol* 144 81–86
19. Durand I.P., Hernández J., Dolz G., Romero J.J.Z., Schnieder, T. Epeb C. (2007). Prevalence of *Toxocara* spp., *Toxascaris leonina* and ancylostomidae in public parks and beaches in different climate zones of Costa Rica. *Acta Tropica* 104, 30–37
20. Elaine C. N., Alvares V. S., Rubinsky G. E., Giuffrida R. (2013). Anti-*Toxocara* spp. antibodies in an adult healthy population: Serosurvey and risk factors in southeast Brazil. *Asian Pac J Trop Biomed*; 3, 211-216
21. Enríquez C.J.F. (2012). Evaluación de la actividad antiparasitaria de la selamectina contra larvas enquistadas de *Toxocara canis* en ratones blancos. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
22. Fakhar Q.M., Gibson S., Pu Z.Y., Miller R.P. (1987). Resistance of nematode secretory products to cleavage by mast cell proteinases. *Molec and Biochem Parasitol*, 24, 137-145.
23. Foster P. S., Simon P. H., Ming Y., Joerg M., Young I.G., Matthaei K.I., Rakesh K. K., Surendran M., Webb D.C . (2002). Interleukin-5 and eosinophils as therapeutic targets for asthma. *Trends in Molec Med* Vol.8

24. García M. G., Marcal S., Lima P. T., Mendoca M., Moreira A.N., McBride A. J., Scaini C.J., Rochedo. F. C. (2014). Human toxocarosis: Current advances in diagnostics, treatment, and interventions. *Trends in Parasitol* 30, 456-464.
25. Gillespie S.H., Pereira M., Ramsay A. (1991). The prevalence of *Toxocara canis* ova in soil samples from parks and gardens in the London area. *Public Health*. Vol, 105. 335-339.
26. Gillian R., Stafford P., Holland C., Wolfe. A. (2008). Contamination of dog hair with eggs of *Toxocara canis*. *Vet. Parasitol*. 152, 85–93
27. González G. T. B. (2009). Comparación de los patrones de reconocimiento de los antígenos de secreción-excreción de *Toxocara canis* obtenidos en México y España por sueros de pacientes mexicanos y españoles. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
28. González S. O. (2009). Determinación del contenido de PAH's en partículas PM2.5 en una zona de alto tráfico vehicular y otra con potencial exposición industrial del Área Metropolitana de Monterrey. Universidad Autónoma De Nuevo León. Monterrey, Nuevo León.
29. Gonzalo E.G. P., Argüello R.G., Alba F. H. (2007). *Toxocara canis*: Proteinases in perivitelline fluid from hatching eggs. *Vet Parasitol* 147, 332–335
30. Grieve R.B. (1990). Immunologic relevance of the cuticle and epicuticle of larval *Dirofilaria immitis* and *Toxocara canis*. *Acta Tropica*, 47, 399-402.
31. Gyang, P. V., Olaoluwa P. A., Yueh L.L., Ting W. C., Akwaowo B. O., Olusola A., Chien W. L., Po C. C., Chia M. C., Ying C. H., Ursula B., Chia K.F. (2015). Seroprevalence, disease awareness, and risk factors for *Toxocara canis* infection among primary schoolchildren in Makoko, an urban slumcommunity in Nigeria. *Acta Tropica* 146, 135–140
32. Habluetzel, G. T., Ruggieri S., Attili A.R., Scuppa P., Marchetti R., Menghini G., Esposito F. (2003). An estimation of *Toxocara canis* prevalence in dogs, environmental egg contamination and risk of human infection in the Marche region of Italy. *Vet. Parasitol* 113, 243–252
33. Holland C. V., Huw V. S. (2006) *Toxocara*. The enigmatic parasite. C.V Holland, H.V Smith CABI International. Oxfordshire, UK.
34. Huw S., Holland C., Taylor M., Magnaval J.F., Schantz P., Maziels R. (2009). How common is human Toxocarosis? Towards standardizing our knowledge. *Trends in Parasitol* 25, 182-188.
35. Kwung C.F., Chien.WL., Yu C. C. (2013). Factors affecting disease manifestation of toxocarosis in humans: Genetics and environment. *Vet Parasitol* 193, 342– 352

36. Kwung C.F., Yun H.L., Wen Y.D., Kua E.S. (2003). Infectivity and pathogenicity of 14-month-cultured embryonated eggs of *Toxocara canis* in mice. *Vet Parasitol* 113, 145–155
37. López F.B., Ledesma Y.S., Romero Y.S., Calleja E., Martínez P. L., Terrazas L.I. (2013). Signal Transducer and Activator of Transcription Factor 6 signaling contributes to control host lung pathology but favors susceptibility against *Toxocara canis* infection. *BioMed Research Intl*
38. Magaña L.R., Pabello V.M., Barrera J.A.G., Orta de Velásquez M.T., Fernández G.V. (2016). Effect of mineral aggregates on the morphology and viability of *Toxocara canis* eggs. *Ecol Engineering* 90, 125-134.
39. Maizels R.M. (2013). *Toxocara canis*: Molecular basis of immune recognition and evasion. *Vet Parasitol* 193, 365– 374
40. Maizels R.M., Page A.P. (1990). Surface associated glycoproteins from *Toxocara canis* larval parasites. *Acta Tropica*, 47, 355-364.
41. Maizels R.M., Tetteh K.A, Loukas A. (2000). *Toxocara canis*: genes expressed by the arrested infective larval stage of a parasitic nematode. *Intrnl Jrnl for Parasitol* 30, 495-508.
42. Maizels R.M., Yazdanbakhsh. (2003). immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nature Reviews Immunol* Volume 30, 733.
43. Maizels, R. (2009). Exploring the immunology of parasitism, from surface antigens to the hygiene hypothesis. *Parasitol.* 136, 1549-1564.
44. Manini M.P, Ariella A. M., Colli C.M., Nishi L., Falavigna A.L.G. (2012). Association between contamination of public squares and seropositivity for *Toxocara* spp. in children. *Vet Parasitol* 188, 48–52
45. Martínez I. B., Gutiérrez M.Q., Ruiz L.A.G., Gutiérrez E.M.C., Alpizar A.S.E., Valencia. J. L. J., Gaona E. (2008) Prevalence of anti-*T. canis* antibodies in stray dogs in Mexico City *Vet Parasitol* 153, 270–276
46. Martínez I. B., Presas F.A.M., Tsuji V.O., Hernández R.A. (1998). Frecuencia de *Toxocara canis* en perros y áreas verdes del sur de la Ciudad de México, Distrito Federal. *Vet Mex.* 29.
47. Martínez L.J.P. (2005). Detección del depósito de antígenos de excreción-secreción de larvas somáticas de *Toxocara canis* en los tejidos de jerbos con infección inducida. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
48. Martínez L.J.P. (2005). Eosinofilia y evasión inmune en la toxocariosis. *AMMVEPE* Vol 16, 59-62
49. Martínez L.J.P. (2014). Antígenos de secreción y excreción como herramientas para evasión inmune y generación de lesiones a hospedadores; el caso del nematodo *Toxocara*

- canis*. Avances Recientes en el Estudio de Helmintos Parásitos. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
50. Maureen C. G., Thomas J. N. (2009). Endoparasite prevalence and recurrence across different age groups of dogs and cats. *Vet. Parasitol.* 166, 153–158
 51. McCarthy J.S., Moore T.A. (2011) *Toxocariosis and larva migrans syndromes*. Guerrant Richard L., Walker David H., Weller Peter F. *Tropical Infectious Diseases. Principles, Pathogens & Practice.* (pp. 763-767).
 52. Meeusen E.N.T. (1999). Immunology of helminth infections, with special reference to immunopathology. *Vet. Parasitol.* 84, 259–273.
 53. Meghji M., Maizels, R. (1986). Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *Molec and Biochem Parasitol*, 18, 155-170.
 54. Ming S. W., Chien W.L., Wen Y. D., Ting C. K., Kua E.S., Yun H.L., Chun C.C., Chia K.F. (2008). Enhanced expression of transforming growth factor- β in inflammatory cells, α -smooth muscle actin in stellate cells, and collagen accumulation in experimental granulomatous hepatitis caused by *Toxocara canis* in mice. *Acta Trop.* 105, 260–268
 55. Mulcahy G., O'Neill S., Donnelly S., Dalton J.P. (2004). Helminths at mucosal barriers interaction with the immune system. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56, 853– 868
 56. Nussenblatt R.B. Whitcup S.M. (2010). *Uveitis, fundamentals and clinical practice: Toxocara canis*. Cuarta edición. Mosby Elsevier. California, U.S.A.
 57. Oliveira T.C.G. S., Amarante A.F.T., Ferrari T.B., Nunes L.C.. (2002). Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol* 103, 19–27
 58. Pam V. G., Olaoluwa P. A., Yueh L.L., Ting W.C., Akwaowo B. O., Olusola A., Chien W.L., Ching C. P., Chia M.C., Ying C.H., Barghouthf U., Chia K.F. (2015). Seroprevalence, disease awareness, and risk factors for *Toxocara canis* infection among primary schoolchildren in Makoko, an urban slum community in Nigeria. *Acta Tropica.* 146, 135–140
 59. Pecinali N.R., Gomes R.N., Amendoeira F. C., Pereira A.C.M.B., Martins M.J.Q.A., Pegado C.S., Pereira O.M.B, Bozza P.T., Castro H.C.F.N. (2005). Influence of murine *Toxocara canis* infection on plasma and bronchoalveolar lavage fluid eosinophil numbers and its correlation with cytokine levels. *Vet Parasitol* 134, 121–130
 60. Pérez G. F., López C. L. (2011). Evolución de la calidad del aire en la ciudad de León. Universidad de León. Monterrey, Nuevo León.

61. Pérez L.I. (2008). Evaluación del depósito de productos de secreción-excreción de larvas somáticas de *Toxocara canis* en las lesiones producidas por el parásito en animales con infección inducida tratados con selamectina. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
62. Ramírez C.A.A. (2014). Inhibición migratoria y actividad sobre larvas enquistadas de *Toxocara canis* de un producto formulado a base de ivermectina de liberación controlada en ratones de la Cepa CD-1 con infección inducida. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
63. Rodríguez V.R.I., Bolio M.E.G., Ojeda M.M.C., Rosado J.A.A., Trinidad I.M., Gutiérrez E.J.R., Reyes E.N. (2014). *Ancylostoma caninum* y *Toxocara canis* como agentes de los síndromes *larva migrans* cutánea y *larva migrans* visceral. Zoonosis, Cambio Climático y Sociedad. Notabilis Scientia.
64. Romero N.C., Mendoza G.D.M., Heredia R.C., Hernández A.E., Guiliana L.B.G. (2014). Factores de riesgo y toxocariosis en humanos. Zoonosis, Cambio Climático y Sociedad. Notabilis Scientia.
65. Romero N.C., Mendoza G.D.M., Ramírez N.D. (2014). Contaminación y viabilidad de huevos de *Toxocara* en heces de perros y parques en tres municipios del Estado de México. Zoonosis, Cambio Climático y Sociedad. Notabilis Scientia.
66. Romero N.C., Mendoza G.D.M., Yañez S.A., Bustamante P.M., Ramírez N.D. (2013) Contaminación y viabilidad de huevos de *Toxocara Spp.* en suelo y heces colectadas en parques públicos, calles y perros en Toluca, México Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XXIII, N° 6, 475 – 479.
67. Romero N.C., Mendoza G.D.M., Yañez S.A., Ponce M. M., Bustamante P.M., Ramírez N.D. (2013). Prevalence and risk factors associated with *Toxocara canis* infection in children. The Scientific World Jrnl.
68. Romero N.C., Nava P.E.L., Olivia T.R.C., Pineda J.C. (2014). Potencial infectivo de suelos contaminados con huevos de *Toxocara spp.* Zoonosis, Cambio Climático y Sociedad. Notabilis Scientia.
69. Sabynne C.S.R., Ribeiro L.M., Santos N.S., Cavalcante V.C.D., Neuza M.A.N., Barrouin S.M.M. (2011). Seroprevalence and risk factors for canine toxocariosis by detection of specific IgG as a marker of infection in dogs from Salvador, Brazil. Acta Tropica 120, 46–51

70. Saraei M, Zakilo M, Tavazoei Y, Jahanihashemi H, Shahnazi M. (2012). Contamination of soil and grass to *Toxocara* spp. eggs in public parks of Qazvin, Iran. *Asian Pacific Jnl of Tropical Biomed.* 1156-1158
71. Schabussova, I. Hassan A., Van Die I., Kosma P., Maizels. (2007). O-Methylated glycans from *Toxocara* are specific targets for antibody binding in human and animal infections. *Intl Jnl for Parasitol* 37, 97–109.
72. Semra K., Funda D.A., Kivılcım O., Hatice B., Isıl M., Haluk T., Hakan T. (2007). *Toxocara* seroprevalence in adults with bronchial asthma. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 101, 270—274
73. Strube C., Heuer L., Janecek E. (2013). *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. *Vet Parasitol* 193, 375– 389
74. Takamoto M., Ovington K.S., Behm C.A., Suganet K., Young G., Matthaet K. (1997). eosinophilia, parasite burden and lung damage in *Toxocara canis* infection in C57BL/6 mice genetically deficient in IL-5. *Immunology* 90, 511-517
75. Wael F.E., Holt H.R., Ahmed A.T. (2011). Risk of *Toxocara canis* eggs in stray and domestic dog hair in Egypt. *Vet Parasitol* 178, 319–323
76. Yan RY., Ming J.D., Wei W. L., Sheng J.Z., Mo Z.J., Huang J., Fen Y.Q. (2014). Endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis is activated in intestines of mice with *Trichinella spiralis* infection. *Exp Parasitol* 145, 1–6

Apéndice.

Reactivos para Inmunohistoquímica.

1. Kit utilizado para el desarrollo de la reacción de inmunohistoquímica.

Código DAB150-150Slide Kit Immunoperoxidase Secondary Detection System.

Merck Millipore IHC Select para marcar anticuerpos de conejo o ratón.

Es un anticuerpo biotinilado para su unión con estreptavidina, para la demostración cualitativa de antígenos en tejidos incluidos en parafina.

Los reactivos incluidos en este kit son:

- Reactivo de Bloqueo: Suero normal de cabra en PBS conteniendo una proteína transportadora.
- Anticuerpo Secundario: IgG de cabra anti conejo biotinilado en PBS conteniendo una proteína transportadora.
- Estreptavidina HRP: Diluida en TBS.
- DAB Cromógeno A: 3,3'Diaminobencidina diluida en TBS.
- DAB Cromógeno B: Peróxido de Hidrógeno diluida en TBS, con Tween²⁰.
- Hematoxilina: Hematoxilina de Mayer como colorante de contraste.
- 20X Buffer de Lavado: TBS.

2. Fijador Formol.

Preparación:

- Formalina (10mL)
- Agua destilada (90mL)

3. PBS-T.

- PBS concentrado (5mL)
- Tween²⁰ (2mL)
- Agua destilada (c.b.p 1000mL)

4. Solución de Ovoalbumina.

- 100mL de PBS-T agregarle la clara de un huevo y homogenizar para integrarla.

5. Solución de Leche al 5%.

Preparación

- Leche en polvo adicionada con biotina de nombre comercial Lactum marca Mead Johnson Nutrition (2.5g)
- Agua destilada (c.b.p 50mL).