



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD**  
**ANIMAL**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**Efecto *in vitro* de la somatotropina sobre larvas de *Toxocara canis***

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**INGRID ESTELA ROQUE LUNA**

**TUTOR PRINCIPAL**

DR. FERNANDO ALBA HURTADO (FESC-UNAM)

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

DRA. LORENA ELIZABETH CHÁVEZ GÜITRON (UTTEC)

DR. JORGE MORALES MONTOR (IIBO-UNAM)

**Cuautitlán Izcalli, Estado de México. 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y  
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL  
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

**Efecto in vitro de la somatotropina sobre larvas de *Toxocara canis***

que presenté para obtener el grado de -----Maestría----- es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

**Atentamente**

Ingrid Estela Roque Luna

No. Cuenta: 311024450

**(Nombre, firma y Número de cuenta de la persona alumna)**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi mamá, que siempre me apoya en todas mis decisiones académicas y personales. Muchas gracias mamá, eres la persona más importante en mi vida.

Al doctor Fernando Alba, por abrirme las puertas de su laboratorio, guiarme y aconsejarme durante esta etapa de mi formación académica y continuar con la siguiente.

A la doctora Lorena Chávez y al doctor Jorge Morales, por compartir su sabiduría y guía durante el desarrollo de mi investigación.

Al doctor Hugo Ramírez, doctor Marco Muñoz y doctor Eduardo Acevedo, por su ayuda y apoyo durante el desarrollo de mis pruebas.

A Sandra y Omar, por su amistad y apoyo incondicional, se han vuelto personas clave de mi día a día.

A mi familia, por siempre recordarme que no estoy sola en el camino que he elegido.

Al CONAHCYT, por brindarme la beca, un apoyo muy importante para poder comenzar, continuar y concluir con este proyecto.

## ABREVIATURAS

**ADNg:** ADN genómico

**ANOVA:** Análisis de varianza

**ARNm:** ARN mensajero

**cm:** centímetros

**DEC:** dominio extracelular

**DIC:** dominio intracelular

**DTM:** dominio transmembranal

**EE:** error estándar

**ERK:** cinasas reguladoras de la señalización extracelular

**L<sub>1</sub>:** larva de primer estadio

**L<sub>2</sub>:** larva de segundo estadio

**L<sub>3</sub>:** larva de tercer estadio

**L<sub>4</sub>:** larva de cuarto estadio

**L<sub>5</sub>:** larva de quinto estadio

**g:** gramos

**GHBP:** proteína de transporte de la hormona del crecimiento

**GHRH:** hormona liberadora de la hormona del crecimiento

**GHRP:** Péptidos relacionados a la hormona del crecimiento

**HC:** hormona del crecimiento

**HSR:** ritmo hipotálamo-somatótrofo

**IGF:** factor de crecimiento de tipo insulínico

**IRS:** substrato receptor de insulina

**JAK:** cinasa Jano

**kDs:** kilodaltons

**LMO:** larva migrans ocular

**LMV:** larva migrans visceral

**MAPK:** proteína cinasas activadas por mitógenos

**mL:** mililitros

**mm:** milímetros

**ng:** nanogramos

**pb:** pares de bases

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**RHC:** receptor de la hormona del crecimiento

**SNC:** sistema nervioso central

**Socs:** supresor de proteínas de señalización de citoquinas

**SS:** somatostatina

**STAT:** traductor de señal activador de transcripción

***T. canis:*** *Toxocara canis*

***T. cati:*** *Toxocara cati*

**µm:** micrometros

**µL:** microlitros

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	I
ABREVIATURAS.....	II
ÍNDICE.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS.....	VI
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
<i>Toxocara canis</i> .....	2
Morfología de <i>T. canis</i> .....	4
Morfología el huevo.....	7
Ciclo de vida.....	7
Epidemiología.....	10
Patogenia.....	12
Cuadro clínico.....	13
Lesiones.....	14
Importancia zoonótica.....	15
Somatotropina.....	16
Transrregulación.....	21
JUSTIFICACIÓN.....	23
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVO GENERAL.....	24
OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
Ubicación.....	24
Material biológico.....	24
Obtención de los huevos de <i>T. canis</i> .....	25
Obtención de las larvas de <i>T. canis</i> .....	25
Estimulación de las larvas.....	26
Determinación de motilidad.....	26

Medición de longitud de las larvas.....	27
Medición del ancho de las larvas.....	27
PCR.....	29
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	31
RESULTADOS.....	31
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIONES.....	44
REFERENCIAS.....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

<b>Figura 1.</b> Extremo anterior de <i>T. canis</i> , donde se puede observar su par de aletas cervicales y 3 labios.....	4
<b>Figura 2.</b> Extremo posterior de macho de <i>T. canis</i> , donde se puede observar su par de espículas iguales .....	4
<b>Figura 3.</b> Donde se observan las alas laterales a lo largo del cuerpo de la larva (flechas). Las puntas de flecha indican las papilas sensoriales. ....	5
<b>Figura 4.</b> Huevo de <i>T. canis</i> , visto en microscopio óptico con aumento de 40x.....	7
<b>Figura 5.</b> Desarrollo de huevos de <i>T. canis</i> hasta larvas infectivas de tercer estadio. (A) Estadio unicelular, (B) Estadio bicelular, (C) Mórula temprano, (D) Huevo embrionado que contiene la larva de tercer estadio, (E) Eclosión de larva de tercer estadio, (F) Larva de tercer estadio eclosionada. (E) y (F) suelen ocurrir dentro del hospedador. La barra representa 20 $\mu\text{m}$ .....	8
<b>Figura 6.</b> Distribución de huevos de <i>T. canis</i> en lugares públicos en diferentes países mediante un sistema de información geográfica. ....	12
<b>Figura 7.</b> Estructura primaria de la somatotropina.....	17
<b>Figura 8.</b> Esquema representativo del mecanismo transduccional que resulta de la activación del receptor de la hormona del crecimiento. ....	20
<b>Figura 9.</b> Medición de longitud de las larvas.....	27
<b>Figura 10.</b> Medición del diametro de las larvas. ....	28
<b>Figura 11.</b> Comparativa de secuencias de una fracción de la región del precursor de la somatotropina en varios mamíferos. Cada letra indica la inicial de un aminoácido. Los puntos indican similitud, mientras que una letra diferente lo contrario; los guiones indican inserciones de lesiones que redacta el propio Software. ....	29
<b>Figura 12.</b> Aumento vs control (0) de la longitud de las larvas de <i>Toxocara canis</i> cultivadas en RPMI-1640 en presencia de diferentes concentraciones de somatotropina.....	33

<b>Figura 13.</b> Aumento vs control (0) del diámetro de las larvas de <i>Toxocara canis</i> cultivadas en RPMI-1640 en presencia de diferentes concentraciones de somatotropina.....	35
<b>Figura 14.</b> Aumento vs control (0) de la motilidad de las larvas.....	37
<b>Figura 15.</b> Secuencia obtenida del ADNg de una muestra de hígado de cachorro.....	38
<b>Figura 16.</b> Búsqueda en BLAST® para la secuencia obtenida de una muestra de hígado de cachorro. ....	39
<b>Figura 17.</b> Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra los amplicones de la PCR de un fragmento del gen que codifica para el receptor de somatotropina separados por electroforesis; carril 1: marcador de bases, carril 2: ADNg de células de hígado de perro, carril 3: ADNg de adultos de <i>T. canis</i> ; carril 4: testigo negativo.....	40
<b>Cuadro 1.</b> Evaluación de motilidad usando los criterios de Kiuchi.....	26
<b>Cuadro 2.</b> Matriz de indentidad.....	30
<b>Cuadro 3.</b> Datos de las medias de la longitud de larvas de <i>T. canis</i> .....	32
<b>Cuadro 4.</b> Datos de las medias del diámetro de larvas de <i>T. canis</i> .....	34
<b>Cuadro 5.</b> Datos de las medias de la motilidad de larvas de <i>T. canis</i> .....	36
<b>Cuadro 6.</b> Secuencia de primers para amplificación del gen del receptor de somatotropina.....	38

## RESUMEN

En este trabajo, se estudió el efecto *in vitro* de la somatotropina sobre larvas 3 (L<sub>3</sub>) de *Toxocara canis*. Los adultos de este parásito se desarrollan principalmente en cachorros, a diferencia de los perros adultos y hospedadores paraténicos, en los cuales, tras la infección con este nematodo, las larvas se enquistan en diferentes órganos sin llegar a desarrollarse las fases adultas. Uno de los eventos fisiológicos importantes en los cachorros son las cantidades elevadas de somatotropina, hormona que tiene un nivel mayor en los cachorros a diferencia de los perros adultos, y que además es específica de especie. Por lo anterior, los objetivos de este trabajo fueron: evaluar el efecto *in vitro* de la somatotropina sobre L<sub>3</sub> de *T. canis*, así como determinar la presencia de un gen que codifica para el receptor de somatotropina en células de este nematodo. Las L<sub>3</sub> de *T. canis* se incubaron con diferentes concentraciones de somatotropina ovina durante diferentes periodos de tiempo. Las larvas estimuladas a una concentración de 0.5 ng/mL durante 5 días aceleraron su longitud y diámetro. Se diseñaron iniciadores para amplificar un fragmento del gen que codifica el receptor de somatotropina, basándose en una región conserbada del gen identificadas en diferentes secuencias de mamíferos disponibles en el GenBank. El fragmento amplificado a partir del ADNg de hígado de cachorro, tuvo un tamaño de 649 pb y una similitud del 99.67% con el recrptor de somatotropina canina. Se amplificó por PCR un fragmento con una longitus de 649 pb de ADNg de *T. canis*, lo que sugiere la presdencia de este gen relacionado con el receptor de la somatotropina canina.

## INTRODUCCIÓN

El parasitismo es una relación heteroespecífica en la que se involucra un hospedador que alberga un parásito, esta relación es muy exitosa y se encuentra en muchos niveles de todos los ecosistemas. Los parásitos se alimentan de sus hospedadores causándoles pérdidas de nutrientes y diversos componentes corporales (Glickman and Schantz, 1981). El parasitismo está ampliamente distribuido en la naturaleza, afecta a una enorme variedad de organismos; entre ellos a todos los animales, de esta situación no escapan las especies animales que el humano ha domesticado e incluso a las que ha adoptado como mascotas (Pritchard, 1995, Guerrant; et al., 2002, Despommier, 2003).

Los parásitos intestinales se encuentran ampliamente diseminados en la población canina y los efectos de estos parásitos en la salud, humana o canina, es considerablemente mayor en lugares donde estos individuos no reciben ninguna atención médica. Estas infecciones representan un problema potencial en la salud pública en diversas partes del mundo; en donde México no es la excepción (Campos and Cantó, 2002).

### ***Toxocara canis.***

Este es uno de los nematodos intestinales más importantes en perros de todo el mundo, especialmente en perros jóvenes (Schnieder et al., 2011). Los adultos se localizan en el intestino delgado de los perros, principalmente en cachorros, sus larvas pueden afectar a muchos animales que actúan como hospedadores paraténicos, entre ellos los humanos (Strube et al., 2012). Debido a su alta incidencia y patogenicidad en el humano, la toxocariosis constituye un serio problema de salud pública en muchos países (Barriga, 1988; Glickman, 1986). En un meta-análisis realizado por Fakhri et al. (2018) a partir de bases de datos sobre estudios relevantes publicados hasta abril de 2018, la prevalencia global conjunta de *Toxocara canis* (*T. canis*) en

perros es del 21%. Esta alta prevalencia de *T. canis* en los perros es debida a la eficiente transmisión prenatal, por lo que la mayoría de los cachorros recién nacidos están infectados con este parásito. Otra causa de esta parasitosis es el alto poder biótico que presentan estos parásitos, ya que las hembras de *T. canis* son capaces de producir hasta 200,000 huevos diarios (Mahmoud and Warren, 1977; Shrad, 1964).

El desarrollo del ciclo biológico de *T. canis* conlleva complejas relaciones entre el parásito y el hospedador, por lo que conocer estas relaciones es muy importante para lograr un pleno conocimiento de su ciclo vital, la biología del parásito, su epidemiología y comprender los aspectos clínicos de la enfermedad (Schnieder et al., 2011).

*T. canis* es un nematodo parásito de distribución mundial que se estima infecta a decenas de millones de personas al año (Fakhri et al., 2018; Ma et al., 2018; Dutra et al., 2014; Morgan et al., 2013; Macpherson, 2013). Un meta-análisis reciente sugiere que más de 100 millones de perros están infectados con *T. canis*, desprendiendo anualmente miles de millones de huevos al medio ambiente anualmente (Rostami et al., 2020). La mayor prevalencia de *T. canis* se registró en perros jóvenes (<1 año de edad), callejeros, rurales, que viven en países tropicales con un bajo nivel económico (Rostami et al., 2020; Hotez and Wilkins, 2009). Tales condiciones son ideales para la propagación de este nematodo debido a que los hospedadores definitivos (perros) deambulan libremente, con una reproducción descontrolada; que garantiza un gran porcentaje de perros jóvenes que no reciben tratamiento para esta parasitosis mientras viven en condiciones ambientales favorables para el parásito (Schwartz et al., 2020).

*T. canis* vive en el intestino delgado de los perros, generalmente los nematodos adultos están presentes en los cachorros de algunas semanas de vida, en tanto que, en los perros adultos, por lo general, alojan larvas 3 (L<sub>3</sub>) en sus masas musculares y vísceras (Rosa and Ribicich, 2012). Además,

utilizan una gran variedad de hospedadores paraténicos, como cerdos, ovejas, conejos, ratas, ratones, entre otros mamíferos, pollos y otras aves. Algunos invertebrados como lombrices de tierra y las cucarachas, también pueden tener larvas de *T. canis* en sus tejidos o intestino (Alba and Muñoz, 2022).

### **Morfología de *T. canis***

Este parásito, es un nematodo que se caracteriza por ser un gusano cilíndrico, con dimorfismo sexual, reproducción sexual y aparato digestivo completo (De la Fé et al., 2006). Son nematodos relativamente grandes, de color blanco, cuya cutícula posee finas estriaciones transversales. Posee unas aletas cervicales largas y estrechas que proporcionan a su parte anterior la forma de punta de flecha (Figura 1). El macho adulto mide de 4 a 10 cm de largo por 2 a 2.5 mm de diámetro y la hembra adulta mide de 10-18 cm de largo por 2.5 a 3 mm de diámetro. Presentan 3 labios en el extremo anterior; el extremo posterior del macho termina enrollado hacia su parte ventral y se observan 2 espículas del mismo tamaño (Figura 2), 20 a 30 papilas preanales, cinco postanales y un estrechamiento terminal en forma de apéndice (Cordero et al., 1999, Quiroz, 1999).



**Figura 1.** Extremo anterior de *T. canis*, con aumento de 4x. Se puede observar su par de aletas cervicales y 3 labios (fotografía tomada en la FES Cuautitlán, 2019).



**Figura 2.** Extremo posterior de macho de *T. canis*, con aumento de 4x. Se puede observar su par de espículas iguales (fotografía tomada en la FES Cuautitlán, 2019).

La fase infectante es la L<sub>3</sub>, la cual tiene una longitud media de 404  $\mu\text{m}$ , con un intervalo de 360 a 434  $\mu\text{m}$ . El ancho a nivel del esófago mide de 18 a 21  $\mu\text{m}$  (Nichols, 1956). Presenta una superficie muy ondulada con marcadas estrías transversales; pequeñas crestas longitudinales en cada estría que confieren un aspecto arrugado a la superficie del cuerpo. Por microscopia de barrido se han observado dos alas laterales que se extienden desde la boca hasta el poro anal, situado cerca de una cola puntiaguda (figura 3) (Talluri et al., 1987).



**Figura 3.** Larva 3 de *T. canis*, se observan las alas laterales a lo largo del cuerpo de la larva (flecha). Las puntas de flecha indican las papilas sensoriales (imagen tomada de Talluri et al., 1987).

El cuarto anterior del cuerpo de la L<sub>3</sub> está inclinado dorsalmente y se estrecha uniformemente hasta una boca que presenta tres labios, la cavidad bucal es triangular y tiene un vestíbulo cuticularizado (Nichols, 1956; Talluri et al., 1987). El poro excretor se encuentra en la línea media ventral, aproximadamente a la mitad del esófago. El poro anal, también está en la línea media ventral, se encuentra a una distancia equidistante de la punta de la cola y de la terminación del intestino (Nichols, 1956). Las papilas cefálicas son apenas reconocibles en el extremo anterior de la larva. Un par de papilas sensoriales se encuentran sobre la cutícula a nivel del poro excretor y otro

par más está situado por detrás de la mitad del cuerpo, cerca de las alas laterales (Talluri et al., 1987).

La cápsula bucal en forma de copa tiene un margen externo completo, con cutícula continua con la de la pared corporal y con el revestimiento cuticular del esófago. El margen ventral prominente de la cápsula es el resultado de un pliegue agudo de cutícula engrosada (Nichols, 1956).

El esófago se extiende aproximadamente en un tercio de la longitud total de la larva. Se observa un revestimiento cuticular central como línea refractiva desde la cápsula bucal hasta el intestino. El esófago está dividido en 4 regiones. La primera de ellas es un procorpus corto y delgado, que comienza en la base de los labios, comunicado directamente con el espacio bucal y extendiéndose en sentido posterior aproximadamente una quinta parte de la longitud del órgano; aquí se ensancha para formar el prominente metacorpus, el cual se estrecha gradualmente en un largo y delgado itsmo, que atraviesa el anillo nervioso y su red ganglionar asociada para terminar en un abrupto ensanchamiento unido al prominente bulbo terminal (Nichols, 1956).

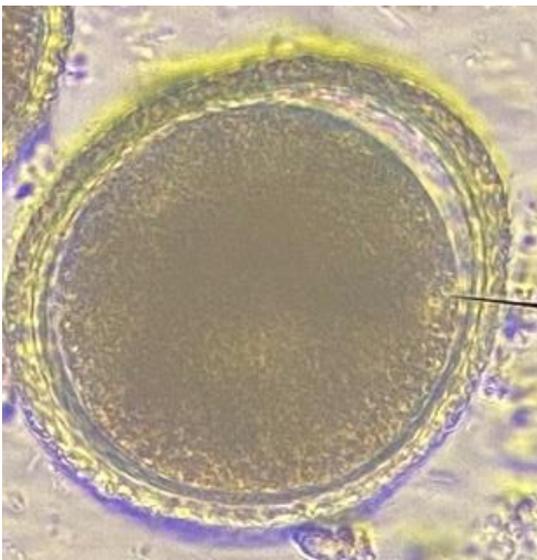
El anillo nervioso está situado justo anterior al poro excretor, inmediatamente anterior a la mitad del esófago, aparece como una estructura clara, homogénea y lisa. Íntimamente asociados con el anillo nervioso y rodeando la mayor parte del esófago, hay un gran número de núcleos ganglionares que forman una vaina que separa parte del procorpo (Nichols, 1956, Talluri et al., 1987).

El intestino carece de luz aparente y consta de 7 células alargadas dispuestas de forma lineal. El intestino está fuertemente comprimido lateralmente y forzado dorsalmente por las columnas excretoras. Después de las columnas se expande y llena la cavidad corporal. La séptima célula intestinal termina de 20 a 25  $\mu\text{m}$  antes del poro anal, al que está conectada por un fino tubo cuticular (Nichols, 1956). Finalmente, el primordiogenital

es una pequeña masa en forma de lente situada anterior al nivel medio del intestino; consta de 4 células que no se disciernen individualmente (Nichols, 1956).

### **Morfología del huevo**

El huevo mide de 75-85  $\mu\text{m}$  y tiene una masa protoplasmática que ocupa todo el interior. Se observan 3 capas externas que forman la cáscara; la capa más externa es albuminosa, la intermedia es lipóide y la interna quitinosa. La cáscara presenta depresiones en la superficie, denominadas fosetas, que le dan un aspecto similar al de una pelota de golf (figura 4) (Alba and Muñoz, 2022).

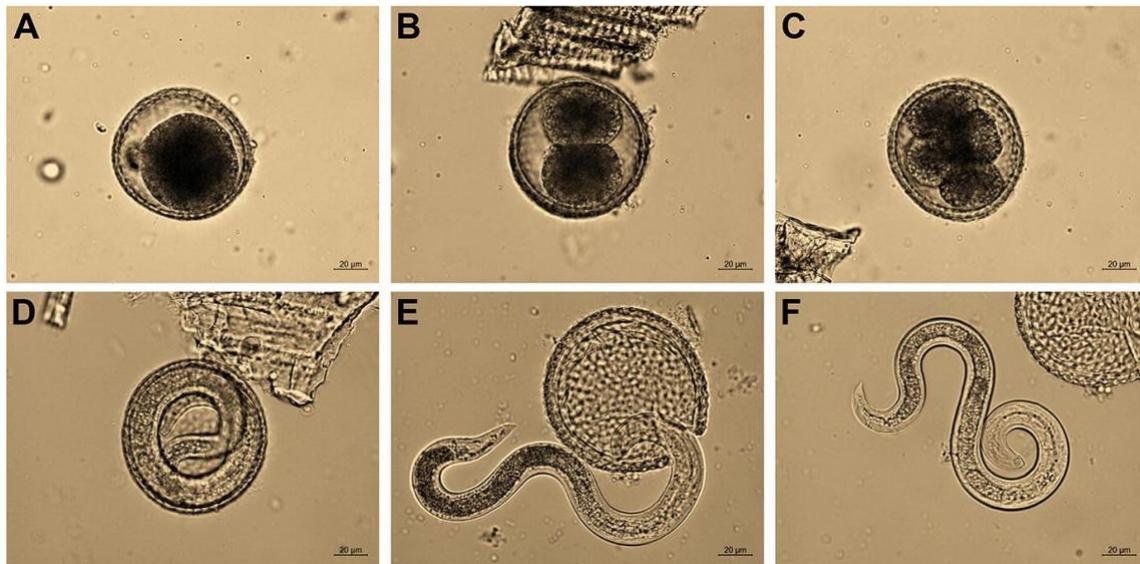


**Figura 4.** Huevo de *T. canis*, visto en microscopio óptico con un aumento de 40x. (fotografía tomada en la FES Cuautitlán, 2022).

### **Ciclo de vida**

Los huevos embrionados de *T. canis* son eliminados en las heces de los cachorros. Dependiendo de la humedad y la temperatura, el desarrollo del estadio infeccioso requiere de 2 a 5 semanas en el medio ambiente (Schnieder, et al., 2011). La embrionación comienza alrededor de los 10 °C y se acelera con el aumento de la temperatura. La temperatura óptima para la embrionación y la supervivencia de los huevos en suelos es de 23 a 35 °C

(Rocha et al., 2011). En el medio ambiente se desarrolla una larva de primer estadio ( $L_1$ ) en el interior del huevo, que muda dos veces hasta convertirse en larva 3 ( $L_3$ ) (figura 5). Los huevos larvados ( $L_3$  pasiva en su interior) constituyen el estadio infeccioso. En los hospedadores susceptibles, tras la ingestión del estadio infeccioso, eclosiona la  $L_3$  ( $L_3$  activa) en el duodeno y atraviesa la pared intestinal; las larvas pasan al flujo linfático o a los capilares sanguíneos. A partir de este momento, el desarrollo y la migración de las larvas varía en función de si el hospedador es un perro joven (<3 meses), un perro adulto, una perra gestante o un hospedador paraténico (ratas, ratones, aves y humanos, entre otros) (Schnieder, et al., 2011).



**Figura 5.** Desarrollo de huevos de *T. canis* hasta larvas infectivas de tercer estadio. (A) Estadio unicelular, (B) Estadio bicelular, (C) Mórula temprana, (D) Huevo embrionado que contiene larva de tercer estadio, (E) Eclosión de larva de tercer estadio, (F) larva de tercer estadio eclosionada. (E) y (F) suelen ocurrir dentro del hospedador (Waindok et al., 2020).

En cachorros, las  $L_3$  migran por vía sanguínea o linfática hacia el hígado, donde permanecen por 1 o 2 días. Posteriormente, migran a través de la sangre, atraviesan el lumen de la aurícula y ventrículo derecho del

corazón y por la arteria pulmonar, llegan a los pulmones y cruzan los capilares para alcanzar los alvéolos. Las L<sub>3</sub> migran a través del lumen de los bronquios, tráquea, laringe, faringe (migración traqueal), donde son deglutidas; durante esta migración traqueal las larvas mudan a L<sub>4</sub>. Las larvas permanecen en el estómago durante algún tiempo (hasta el día 10 postinfección), vuelven al duodeno y mudan a L<sub>5</sub> o preadultos para convertirse finalmente en adultos (19-27 días postinfección). El periodo prepatente es de 4-5 semanas (Schnieder, et al., 2011).

En hospedadores paraténicos y perros adultos (machos y hembras que nunca gestan), las L<sub>3</sub> migran a través de la sangre y se distribuyen por todo el organismo, principalmente en el músculo estriado, hígado, pulmones, riñones y cerebro, donde permanecen durante años en estado de latencia o como larvas somáticas infectivas (larvas dormantes) hasta que mueren y se calcifican (Muñoz and Alba, 2018).

En perras gestantes, aproximadamente el día 20 de la gestación, algunas de las larvas dormantes son reactivadas por la influencia de la progesterona y la prolactina, las larvas atraviesan la placenta e infectan a los fetos. Las larvas permanecen en el hígado del feto hasta el nacimiento; después, por vía sanguínea migran hacia los pulmones donde permanecen durante la primera semana de vida, la muda a L<sub>4</sub> ocurre durante esta etapa o después cuando la larva llega al estómago por la vía traqueal. Para el final de la tercer semana, la larva muda a L<sub>5</sub> y se desarrollan rápidamente en gusanos adultos. Después de la cópula, las hembras producen huevos que pasan a las heces de los cachorros a partir de los 15 días de edad. En las perras recién paridas, algunas larvas reactivadas llegan por influencia de la prolactina en la glándula mamaria y son excretadas en el calostro y la leche, para ser ingeridas por los cachorros, constituyendo otra importante fuente de infección para la camada. Las larvas ingeridas de esta forma mudan a L<sub>4</sub> y

L<sub>5</sub> en la luz intestinal, donde se convierten en gusanos adultos sin migración traqueal (Muñoz and Alba, 2018).

En las perras recién paridas, algunas larvas pueden reactivarse durante la gestación, migrar al intestino, mudar a L<sub>4</sub>, L<sub>5</sub> y convertirse en gusanos adultos. Las perras pueden permanecer hasta 60 días eliminando huevos en las heces, hasta que los gusanos adultos se eliminan espontáneamente. Esta es una de las formas en que los gusanos adultos pueden desarrollarse en perros adultos (Deplazes et al., 2016).

## **Epidemiología**

La toxocariosis canina es una enfermedad ampliamente distribuida en todo el mundo (Ruiz, 2011). Los hospedadores definitivos son perros y otros cánidos. Los hospedadores paraténicos son prácticamente todos los mamíferos y muchas aves. En los humanos, las larvas de *T. canis* tienen se comportan en forma similar a como lo hacen en los hospedadores paraténicos.

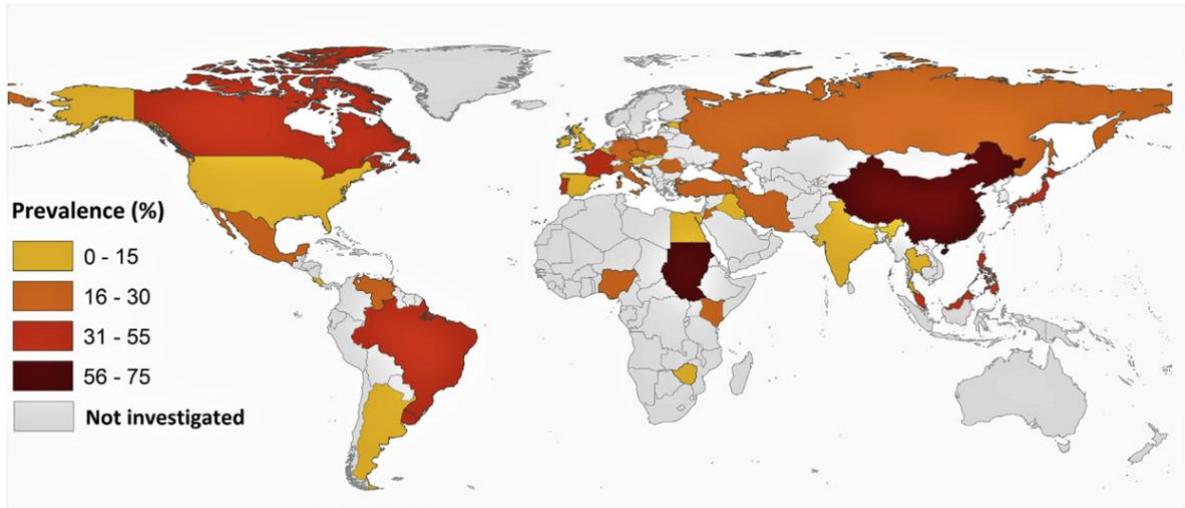
Los gusanos adultos se presentan principalmente en el intestino de los cachorros y estos eliminan huevos en su materia fecal, siendo la principal fuente de contaminación de huevos en el ambiente. La contaminación del medio con los huevos de *T. canis* es el factor más relevante para la infección, tanto para hospedadores definitivos como para humanos y hospedadores paraténicos (Deplazes et al., 2016). En un meta-análisis reciente se calculó que más de 100 millones de perros alrededor del mundo están infectados por *T. canis* y que liberan billones de huevos al medio ambiente cada año (Rostami et al, 2020). Se ha estimado que las hembras adultas de *T. canis* producen diariamente entre 25,000-85,000 huevos. Los cachorros infectados pueden arrojar enormes cantidades de huevos en sus heces (>100,000 huevos/g), causando así una intensa contaminación del medio. En adición a la contaminación local, los perros y zorros ferales infectados, contribuyen a

una amplia diseminación de huevos de *T. canis* por defecación en áreas rurales y urbanas, incluyendo áreas agrícolas, jardines, parques públicos, playas, etc. El grosor y resistencia del cascarón de los huevos favorece una larga supervivencia y contribuye a su acumulación en el medio ambiente. En un medio húmedo los huevos de *T. canis* pueden sobrevivir desde varios meses hasta 4 años, pueden resistir periodos fríos, pero son sensibles a la desecación y temperaturas arriba de 35°C (Deplazes et al., 2016).

Existen muchas vías de transmisión de *T. canis* en perros y el periodo prepatente varía según el modo de transmisión. La transmisión vertical se produce cuando las larvas somáticas se reactivan durante el tercer trimestre de la gestación, atraviesan placenta e infectan a los embriones en desarrollo (Roberts et al., 2013; Schnieder et al., 2011). Los cambios fisiológicos durante la gestación alteran las vías de señalización de las larvas que conducen a la reactivación y migración de las mismas (Schnieder et al., 2011; Ma et al., 2019). Los cachorros nacen infectados, se ha informado que la expulsión de huevos comienza alrededor del día 16 postparto (Lloyd et al., 1991). La transmisión vertical continúa después del parto, ya que las larvas pueden pasar lactogénicamente a los cachorros recién nacidos (Ma et al., 2019; Burke and Roberson, 1985) con un periodo de prepatencia de 28 días (Stoye, 1976). La transmisión horizontal de perro a perros se produce a través de la ingestión de huevos embrionados, el periodo de prepatencia es de 32-35 días (Dubey, 1978) o a través de la ingestión de hospedadores paraténicos con L<sub>3</sub> enquistadas en sus tejidos, el periodo de prepatencia es de 34-48 días (Manhardt and Stoye, 2010).

En un meta-análisis realizado por Fakhri et al. (2018) sobre estudios relevantes publicados de las tasas de prevalencia de huevos de *T. canis* en lugares públicos hasta abril de 2018, se observó que la prevalencia global fue del 21% (Figura 6). Donde las tasas de prevalencias estimadas en diferentes regiones de la OMS oscilaron entre el 13% y el 35%. En el Pacífico

occidental (35%), África (27%), Sudamérica (25%), Sudeste Asiático (21%), Oriente Medio y Norte de África (18%), Europa (18%), y América del Norte y Central (13%). Una prevalencia elevada se asoció significativamente con una longitud geográfica elevada, una latitud baja y una humedad ambiental relativa elevada.



**Figura 6.** Distribución de huevos de *T. canis* en lugares públicos en diferentes países mediante un sistema de información geográfica (Fakhri et al., 2018).

## Patogenia

El proceso se inicia a partir de las migraciones larvarias y de su localización en diferentes órganos y tejidos. Las larvas ejercen una acción traumática sobre los tejidos, que se asocia con la producción de hemorragias y la aparición de respuesta inflamatoria en hígado, pulmones, con ruptura de hepatocitos y alvéolos. Es especialmente importante el efecto antigénico ejercido por medio de sustancias liberadas con los componentes de la epicutícula de las larvas (antígenos de secreción-excreción), que pueden producir grandes cantidades de anticuerpos inespecíficos o generar reacciones de tipo alérgico ligadas a una inflamación importante (Cordero et al., 1999).

En el caso de la infección por los gusanos adultos, suele haber un gran número en el lumen del intestino delgado. Si la carga parasitaria es extremadamente alta, los perros pueden presentar un intestino delgado impactado que puede conducir a la ruptura intestinal y posterior peritonitis séptica, así como hemorragia regional, infarto y posiblemente intususcepción (Schnieder et al., 2011). La diarrea no suele observarse en animales infectados con gusanos adultos, pero puede observarse especialmente cuando hay coinfección con otros patógenos (Duijvestijn et al., 2016). Los cachorros pueden presentar a menudo un abultado abdomen, especialmente cuando la carga parasitaria es alta y puede ser una causa contribuyente del síndrome del cachorro desvanecido (Cordero et al., 1999).

Los gusanos juveniles y adultos en el intestino se alimentan de contenido intestinal, se asocian con pérdida de nutrientes, lo cual se va a manifestar como un problema nutricional, retraso en el desarrollo y pérdida de condición corporal, irritan la mucosa intestinal y producen cambios en su composición celular que puede ligarse con un síndrome de pérdida proteica y ascitis, además, hay efectos mecánicos de obstrucción y pueden producir la perforación de la pared intestinal o invadir el conducto biliar. La acción expoliatriz selectiva la ejercen sobre los nutrientes como vitaminas, proteínas o hidratos de carbono, lo que supone competencia con el hospedador y contribuye al deterioro de su nutrición (Cordero et al., 1999).

En cachorros con infección prenatal intensa, la acción de las larvas de *T. canis* a su paso por el hígado y pulmones pueden provocar muertes que suelen presentarse entre la primera y tercer semana de vida. Las infecciones intestinales masivas producen enteritis catarral y, ocasionalmente, oclusión y perforación intestinal, así como invasión de los conductos biliares y pancreático (Cordero et al., 1999).

## **Cuadro clínico**

Los cachorros son los más afectados clínicamente, mientras que en los adultos la enfermedad suele ser subclínica debido al potencial inmunomodulador de los parásitos y a las bajas cargas parasitarias que presentan (Rosa and Ribicich, 2012).

La infección intestinal es de ligera a moderada en cachorros y en perros adultos suele ser asintomática u ocasionalmente puede haber vómitos, diarrea, heces con mucho moco y retardo en el crecimiento de los cachorros (Deplazes et al., 2016), sin embargo, son fuente de contaminación para el entorno humano.

Las infecciones intensas pueden manifestarse con tos, taquipnea, flujo nasal y signos nerviosos de intranquilidad, que podrían deberse a la acción irritativa de los adultos en el intestino, o bien a larvas erráticas en el sistema nervioso central. Paralelamente, se observan alteraciones digestivas como emisión de heces blandas, a veces diarreicas y con frecuencia se acompañan de abundante mucosidad y sangre. El abdomen está muy dilatado, con reacción dolorosa a la palpación y no es rara la eliminación de nematodos con los vómitos o de forma espontánea con las heces. El raquitismo que se observa con frecuencia en los cachorros puede obedecer a invasiones intensas por ascaroideos (Quiroz, 1999; Cordero et al., 1999; Rosa and Ribicich, 2012).

El curso crónico ofrece una progresiva desnutrición con o sin diarreas intermitentes y, a veces, manifestaciones nerviosas convulsivas periódicas. Hay un considerable retraso en el crecimiento de los cachorros, con anemia, bajo peso corporal y pelo hirsuto. Excepcionalmente puede producirse obstrucción intestinal y perforación. El paso de nematodos y contenido intestinal hacia la cavidad abdominal causa peritonitis, generalmente mortal (Cordero et al., 1999).

## Lesiones

En los perros, el paso de las larvas especialmente en pulmones, hígado, riñón y músculo cardíaco causan inflamaciones focales, inicialmente hemorrágicas y más tarde de carácter granulomatoso-eosinofílico. En los ojos: retinitis granulomatosa y coriorretinitis (Cordero et al., 1999; Deplazes et al., 2016).

La presencia de gusanos adultos en la luz intestinal provoca irritación de la mucosa, lo que induce a una menor absorción de nutrientes y es responsable de la diarrea y vómitos observados en algunos animales jóvenes. Además, ejercen una acción mecánica obstructiva sobre el flujo normal del contenido intestinal. Microscópicamente, la presencia de estos gusanos produce hipertrofia de la mucosa intestinal, atrofia de las vellosidades e hiperplasia de las criptas (Alba and Muñoz, 2022)

Las lesiones en los hospedadores paraténicos (como roedores, aves, cerdos, ovinos, humanos) son causadas por el curso de la migración somática de la L<sub>3</sub>, la cual invade varios órganos (pulmones, hígado, músculo esquelético, sistema nervioso central, entre otros) y puede causar ciertas reacciones y desórdenes de variable severidad dependiendo del número de larvas y de reacción en el hospedador. Entre estas se pueden incluir múltiples hemorragias, necrosis y granulomas en hígado y pulmones, a menudo eosinofilia, formación de anticuerpos específicos contra antígenos de *Toxocara* pero también una gran cantidad de tipo inespecífico (contra antígenos bacterianos y virales), daño tisular en el sistema nervioso central con meningitis, encefalitis, mielitis, signos neurológicos y algunos cambios patógenos en el ojo (coriorretinitis, turbidez del cuerpo vítreo, etc.) (Deplazes et al., 2016).

## Importancia zoonótica

La toxocariosis humana es una zoonosis mundial desatendida causada por nematodos del género *Toxocara* (*T. canis* y *T. cati*). Los datos actuales indican que la toxocariosis es una infección de distribución mundial cuya importancia se ha subestimado considerablemente. La toxocariosis humana se presenta en cuatro formas clínicas: síndrome de larva migrans visceral (LMV), síndrome de larva migrans ocular (LMO), neurotoxocariosis y toxocariosis encubierta (Alba and Muñoz, 2022).

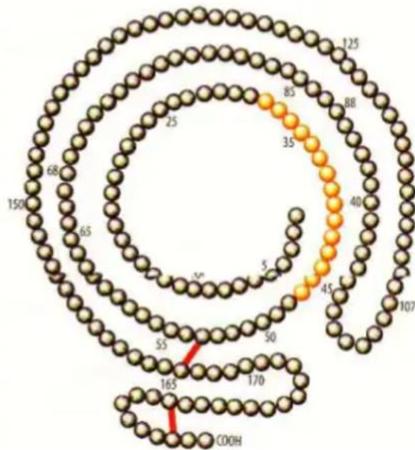
Los humanos llegan a ser infectados por la ingesta accidental de los huevos de *T. canis* que contengan la L<sub>3</sub> infecciosa (geofagia, comida contaminada, contacto mano-oral). En el cuerpo del humano la L<sub>3</sub> migra en una ruta somática, invade varios órganos (hígado, pulmones, músculos, sistema nervioso central [SNC], etc.) y causa lesiones y granulomas. (Deplazes et al., 2016). La infección ocurre principalmente en niños, en especial en los menores de 4 años de edad. Esta frecuencia por edad no se basa en la falta de resistencia por parte del niño, sino simplemente en el hecho epidemiológico de que los niños y los cachorros tienden a tener contacto íntimo, estando los cachorros dentro del grupo de edad más susceptible. Los niños que sufren de pica (perversión del apetito) son más susceptibles a infectarse, y en general los de las comunidades pobres, que juegan en el suelo contaminado con excremento de perro e incluso compartiendo dormitorios con cachorros, son los que tienen el riesgo más elevado de infectarse (Dunn, 1983).

El síndrome de LMV afecta, en su mayoría, a niños menores de 3 años, mientras que la LMO ha sido vista en niños más grandes y algunos adultos. LMO es una causa importante de ceguera, comúnmente asociada al contacto con cachorro infectados o malas prácticas de higiene en el hogar. Se asocia a pérdida repentina de la visión, generalmente unilateral, coriorretinitis

granulomatosa y turbidez en el cuerpo vítreo (Barragry 1994; Deplazes et al., 2016).

## **Somatotropina (hormona del crecimiento)**

La hormona del crecimiento (GH, por sus siglas en inglés para Growth Hormone) o también llamada somatotropina, es una hormona proteica de cadena sencilla, sintetizada y secretada por células somatotropas en la pituitaria o adenohipófisis como un péptido de 191 aminoácidos (Kato, 1990), con un peso molecular de aproximadamente 22 kDa, un punto isoelectrico de 5.1 y con dos puentes disulfuro intracatenarios uniendo a las cisteínas que ocupan las posiciones 53 y 182, con las 165 y 189, respectivamente, como se observa en la figura 7 (De Palo et al., 2006).



**Figura 7.** Estructura primaria de la somatotropina (De Palo et al., 2006).

Existe un mecanismo de retroalimentación o feedback llevado a cabo por las propias hormonas adenohipofisiarias de modo que se liberan las diferentes hormonas en las concentraciones necesarias y requeridas por el organismo, ya que dicho mecanismo actúa a nivel tanto de hipotálamo como hipófisis (Salamanca, 2018). A nivel hipotalámico, se libera somatoliberina, también llamada hormona liberadora de la somatotropina (GHRH), que se transporta vía porta hasta la adenohipófisis, glándula que finalmente secreta somatotropina. La somatotropina se distribuye a través de la sangre hacia sus

tejidos diana, entre los que se encuentra el hígado. Una vez allí, permite la secreción de factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) que propicia el crecimiento). Todas o la mayoría de las actividades biológicas son mediadas por factores somatotropina -dependientes: IGF-1 e IGF-2 (somatomedinas). Estas participan en el mecanismo de feedback negativo, donde IGF-1 estimula la síntesis de somatostatina (SS) e inhibe la somatoliberina. A su vez, tanto la síntesis como la liberación de somatoliberina y SS se regulan por un gran número de neurotransmisores, hormonas y señales metabólicas. La liberación de estas neurohormonas a la circulación portal hipotálamo-hipofisaria ocurre de forma rítmica y alternante, lo que lleva a que la secreción de la somatotropina sea episódica. Esta secreción pulsátil se origina por el vertido rítmico y alternante, con un desfase de 180°, de somatoliberina y SS a la circulación portal. Cada secreción es consecuencia de un incremento en la liberación de la somatoliberina acompañada de una disminución en la liberación de SS. Se establece así un ritmo hipotálamo-somatótrofo (HSR), de máxima amplitud durante la fase de sueño de ondas lentas, variable en cuanto a la intensidad y frecuencia de los episodios secretores en función de la edad y el género (Salamanca, 2018).

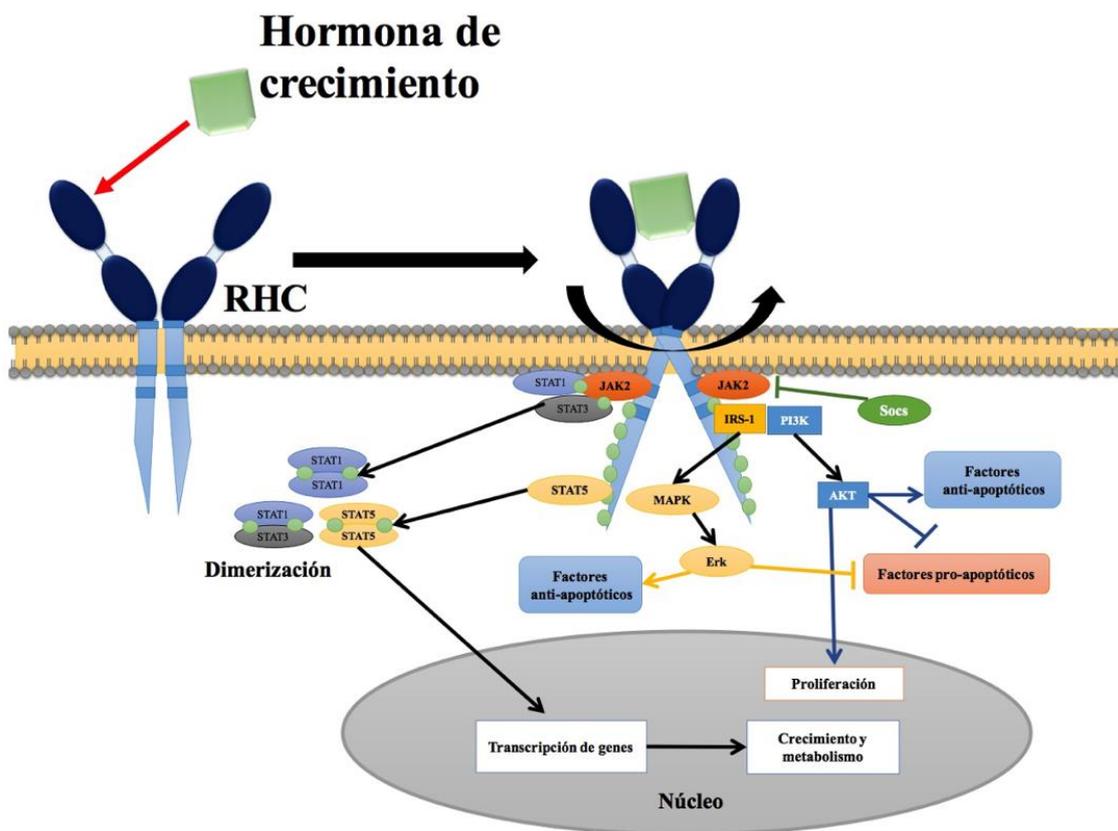
Además de estas neurohormonas existen otros factores hipotalámicos y periféricos implicados en el control de la secreción de somatotropina como es el caso de los péptidos denominados genéricamente GHRP (Growth Hormone Releasing Peptides) y más concretamente del factor gástrico grelina (Salamanca, 2018).

El gen de esta hormona, en el perro, se encuentra codificado en el cromosoma 6. En el torrente sanguíneo, cerca de la mitad de la somatotropina circula unida a una proteína de transporte de alta afinidad (GHBP, por sus siglas en inglés para Growth Hormone-Binding Protein), lo que aumenta su vida media, para posteriormente llegar a su célula blanco y unirse a su receptor específico, el receptor de la hormona del crecimiento (GHR). Este

receptor se encuentra distribuido en varios órganos y tejidos del cuerpo, tales como el hígado, el pulmón, el riñón, las glándulas mamarias, músculoestriado, tejido adiposo, hueso, cartílago y cerebro (Zamora et al., 2020). Además de regular primordialmente el crecimiento, presenta otras funciones biológicas de importancia tales como la regulación del metabolismo y el control de procesos fisiológicos relacionados con los sistemas hepatobiliar, cardiovascular, renal, gastrointestinal y reproductivo. La activación de JAK2 es necesaria para la activación de STAT1, STAT3 y STAT5 mediada por la hormona del crecimiento, y la regulación negativa de la señalización de JAK-STAT cumple un paso importante en el control de esta vía de señalización (Salamanca, 2018).

Este receptor es un miembro de la familia de receptores de citocinas de clase I (Salamanca, 2018) y utiliza la vía de la señalización de JAK-STAT. El precursor para este receptor se encuentra en una fracción del brazo largo del cromosoma 17. Estructuralmente, el GHR está conformado por un dominio extracelular (DEC), un dominio intracelular (DIC) y un dominio transmembranal (DTM); el DIC se encuentra asociado a moléculas de actividad tirosina cinasa como JAK2 (Janus Kinase 2). El GHR existe predominantemente de forma dimérico, unido por sus hélices transmembranales, mismas que se encuentran de forma paralela en estado basal y de forma cruzada o de tijera (crossover) en estado activo. La interacción de la GH con su receptor, como se muestra en la figura 8, promueve que las proteínas JAK2 que se encuentran acopladas en la secuencia Box1 del DIC se transfosforilan por su cercanía y fosforilan sustratos como los IRS-1 e IRS-2 (por sus siglas en inglés para Insulin Receptor Substrate), mismos que activan la vía de la proteína cinasa B (akt), la cual conduce a una respuesta proliferativa y antiapoptótica. Posteriormente, las fosfotirosinas distales del DIC, por medio de interacciones con los dominios SH-2 STAT, activan al transductor de señal

y activador de la transcripción STAT 1, 3, 5a y 5b. Las STATs se dimerizan y traslocan al núcleo celular, se unen a secuencias específicas del ácido desoxirribonucleico y promueven la transcripción de genes. Sin embargo, existen otros mecanismos transduccionales relacionados con la somatotropina, tal es el caso de la vía de señalización que implica al proto-oncogén c-Src y que es independiente de JAK 2. Esta vía implica la activación de MAPK y ERK 1 y 2. Por otro lado, existen también moléculas supresoras de la señal de transducción de receptores de citoquinas y “Socs” (por sus siglas en inglés para Supresor of Cytokine Signaling), quienes regulan negativamente el mecanismo transduccional desencadenado por la unión de somatotropina a su receptor (Zamora et al., 2020).



**Figura 8.** Esquema representativo del mecanismo transduccional que resulta de la activación del GHR (Zamora et al., 2020).

Los efectos biológicos de la somatotropina pueden ser clasificados como somatogénicos y metabólicos. Los efectos somatogénicos son aquellos en los que estimula células en proliferación (Rechler, 1993), específicamente, produciendo el crecimiento longitudinal (Ohlsson, 1998), crecimiento de los músculos (Florini, 1996), disminución de la masa del tejido adiposo y promoviendo la lactación en rumiantes. Por otro lado, los efectos metabólicos son una acción directa de la hormona que involucra una gran variedad de tejidos y el metabolismo de toda clase de nutrientes: carbohidratos, lípidos, proteínas y minerales (Etherton, 1998). Claramente, la somatotropina es una hormona multifuncional que por su intervención en el crecimiento somático está relacionada con la distribución de los nutrientes a los distintos tejidos, con la fisiología de la reproducción, balance energético, osmorregulación, desarrollo gonadal e ingesta de alimentos (Lilido, 2007).

En el perro se han documentado valores basales de somatotropina plasmática en un rango de 1.8 a 6.4 ng/mL. No se han encontrado diferencias significativas de los valores basales de esta hormona entre sexos; a excepción de las hembras durante la fase de diestro del ciclo estral, las cuales presentan valores de somatotropina plasmática más elevados, debido a la alta concentración de la progesterona (Corrada et al., 2003).

## **Transrregulación**

El papel que juegan las hormonas en la infección y desarrollo de *T. canis* es uno de los aspectos más interesantes de la relación hospedador-parásito. Todos los eventos y sustancias dentro de los hospedadores tienen contacto con los parásitos y pueden repercutir en ellos. En este contexto, las hormonas que regulan una gran variedad de funciones dentro del de los hospedadores, también pueden tener un efecto directo sobre los parásitos que albergan, incluso que estos parásitos Puedan ser dependientes de estas

hormonas y que regulen algunos de sus eventos fisiológicos. Las hormonas y factores de crecimiento pueden tener efectos directos e indirectos sobre el establecimiento y proliferación de algunos parásitos (Escobedo et al., 2009). En otros casos las hormonas del hospedador regulan funciones vitales del parásito, este fenómeno ha sido llamado transregulación (Escobedo-González y Morales, 2004).

Jin et al., (2010), demostraron que la prolactina promueve la migración de *T. canis* hacia la glándula mamaria en ratones (Dunsmore et al., 1983), sugiriendo que un camino similar para la reactivación de larvas puede aplicarse a los perros. Se ha demostrado también que células de larvas de *T. canis* presentan gran cantidad de receptores de membrana para progesterona; así como, receptores nucleares para progesterona, prolactina y estradiol (Chavez-Gúitron, 2016; Chavez-Gúitron et al., 2016; 2019).

## JUSTIFICACIÓN

Todos los eventos fisiológicos que ocurren en el hospedero repercuten directamente en el desarrollo de los parásitos. Se ha demostrado *in vitro* que algunas hormonas como la prolactina y la progesterona tienen efecto sobre el desarrollo de larvas de *T. canis* y que las células de larvas de *T. canis* presentan gran cantidad de receptores de membrana y nucleares para progesterona, prolactina y estradiol (Chavez-Güitron, 2016; Chavez-Güitron et al., 2016; 2019). Sin embargo, el desarrollo de gusanos adultos se presenta principalmente en cachorros y éstos no tienen niveles elevados de prolactina o de progesterona.

Fisiológicamente uno de los eventos hormonales más importantes en los cachorros son las cantidades elevadas de la somatotropina, hormona esencial para el crecimiento somático posnatal. Por lo anterior, en este estudio se pretende estudiar si el efecto de la estimulación directa *in vitro* de larvas de *T. canis* con somatotropina induce cambios morfológicos y efectos sobre el crecimiento y motilidad larvaria. Además, por PCR si *T. canis* presenta un gen que codifica para una molécula similar a la del receptor de somatotropina. Lo anterior podría ser de notable relevancia para entender a un nivel más profundo la interacción hospedero-parásito en esta parasitosis.

## HIPÓTESIS

1. La adición *in vitro* de somatotropina tiene un efecto directo sobre el aumento en el desarrollo y motilidad de las larvas 3 de *T. canis*.
2. El nematodo *Toxocara canis* presenta un gen que codifica para una molécula similar al receptor de la somatotropina en perros.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar y evaluar el efecto *in vitro* de la somatotropina sobre algunos parámetros morfológicos de las larvas 3 de *T. canis* y buscar la presencia de receptores de somatotropina canina.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Evaluar longitud, diámetro, motilidad y viabilidad de larvas de *T. canis* cultivadas en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de somatotropina ovina.
2. Determinar por PCR en tiempo real, la presencia del gen que codifica para el receptor de somatotropina canina en *T. canis*.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Ubicación**

El presente proyecto se desarrolló en el laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES Cuautitlán, UNAM, Campo 4, en el municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

### **Material biológico**

Para la obtención de los gusanos adultos, se utilizaron cachorros de entre 2 y 3 meses de edad infectados naturalmente con *T. canis*. Los cuales eran parte de la mortalidad normal del Centro de Atención Canina y Felina de Ecatepec, ubicado en el municipio de Ecatepec de Morelos, Estado de México.

En el mismo centro se realizaron las necropsias a los cachorros, donde se diseccionó el intestino delgado para la búsqueda y obtención de los

gusanos adultos; una vez obtenidos estos nematodos, eran enjuagados con agua corriente y colocados en frascos de vidrio y plástico con solución salina fisiológica y transportados al laboratorio en 1 de la Unidad de Investigación de la FES-Cuautitlán.

### **Obtención de los huevos de *T. canis***

La obtención y cultivo de los huevos de estos nematodos se realizó modificando el método de Oshima (1961). Los nematodos fueron sexados, a las hembras se les realizó una incisión en el tercio superior para obtener el útero y posteriormente era incidido para colectar los huevos. Los restos del parásito fueron eliminados con un colador fino; los huevos fueron lavados con solución salina fisiológica, resuspendidos en una solución de formol al 2% e incubados a 28 °C durante 20 días. La embrionación de los huevos era monitoreada a partir del día 10.

### **Obtención de larvas de *T. canis***

Se realizó siguiendo el método desarrollado por De Savigny (1975) y modificado por Muñoz-Guzmán (1997). Una vez lavados, previa verificación de su viabilidad, los huevos de *T. canis* fueron lavados 3 veces con solución salina fisiológica estéril, por medio de ciclos de centrifugación a 970 g durante 5 minutos y resuspensión. Posteriormente, después de un cuarto lavado, fueron resuspendidos en una solución de hipoclorito de sodio al 1% y centrifugados (en un tiempo máximo de 10 minutos), posteriormente, en condiciones de esterilidad se lavaron 4 veces con medio de cultivo celular (RPMI-1640 bufferado con HEPES a pH de 7.2, 1% de glucosa, L-glutamina, penicilina-estreptomicina 100U/μg/mL y anfotericina 2.5μg/mL). Para producir la eclosión de los huevos estos fueron agitados con una barra magnética por 30 minutos. La suspensión de larvas resultante se

colocó en microaparatos de Baermann estériles y se mantuvieron en una estufa con CO<sub>2</sub> al 5% a 37 °C por 24 horas.

### **Estimulación de las larvas**

Las larvas viables recolectadas del fondo de los micro aparatos de Baermann fueron lavadas y resuspendidas en medio de cultivo celular a una concentración de 1000 larvas en 2 mL de medio, con diferentes concentraciones de somatotropina (GH-Ovina; LSBio, cat. LS-G16765): 0, 0.5, 2, 4, 8, 32, 128 ng/mL; esto se realizó por triplicado. Las larvas fueron mantenidas en placas de polipropileno de 18 pozos por 20 días. El medio con hormona recién preparada se cambiaba cada 48 horas.

### **Determinación de la motilidad**

Los días 0, 5, 10, 15 y 20 de exposición a las diferentes concentraciones de somatotropina, se videograbaron directamente de las placas de cultivo, se registró el movimiento de treinta larvas de cada concentración/día utilizando un microscopio invertido Nikon Eclipse TS100 . La motilidad fue medida siguiendo los criterios sugeridos por Kiuchi et al., 1978 (Cuadro 1).

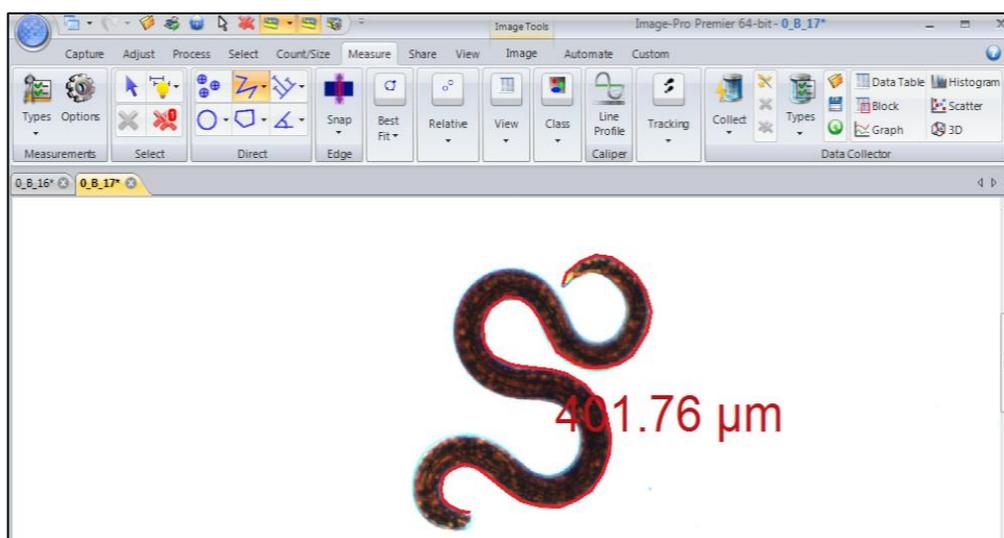
**Cuadro 1.** Evaluación de motilidad usando los criterios de Kiuchi et al., 1978.

<b>Estado</b>	<b>No.</b>
Mueve cuerpo completo	3
Mueve sólo una parte del cuerpo en el periodo de observación	2

Inmóvil pero no muerto	1
Muerto	0

### Medición de longitud de las larvas

Los días 0, 5, 10, 15 y 20 de exposición a la hormona se obtuvieron 100  $\mu$ L de medio con larvas de cada pozo, se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL, se les agregó 100  $\mu$ L de lugol y se dejó reposar durante 20 minutos. Posteriormente, se fotografiaron 30 larvas de cada tubo con un microscopio óptico Olympus BX43 y utilizando el programa Image-Pro Premier se midió la longitud de cada larva (Figura 10) los datos fueron agregados a base de datos.

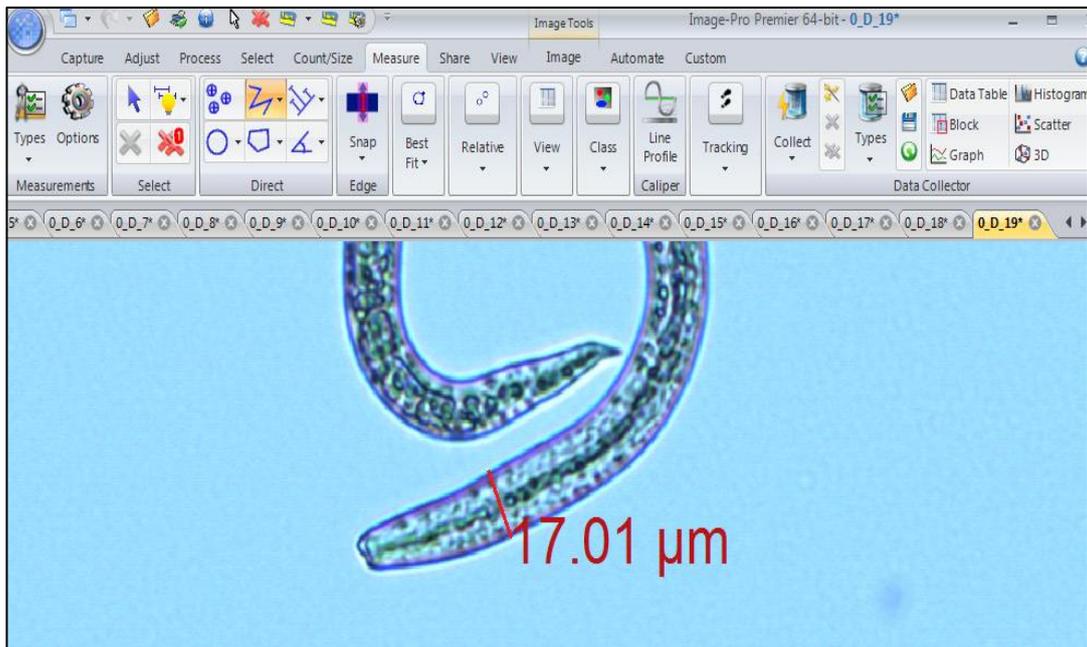


**Figura 9.** Medición de longitud de larvas 3 de *T. canis*.

### Medición de ancho de las larvas

Los días 0, 5, 10, 15 y 20 de exposición a la hormona se obtuvieron 100  $\mu$ L de medio con larvas de cada pozo y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL, se centrifugaron a 280 g por 3 minutos, se eliminó el sobrenadante y se les agregó 100  $\mu$ L de alcohol ácido, se dejaron reposar durante 24 horas.

Posteriormente se centrifugaron, al sedimento se agregó 100  $\mu\text{L}$  de colorante hemalumbre de Meyer y se dejaron reposar durante 48 horas. Con un microscopio óptico Olympus BX43 se fotografiaron veinte larvas por pozo/concentración/día y se utilizó el programa Image-Pro Premier para medir el ancho de las larvas a la altura del anillo nervioso (figura 11).

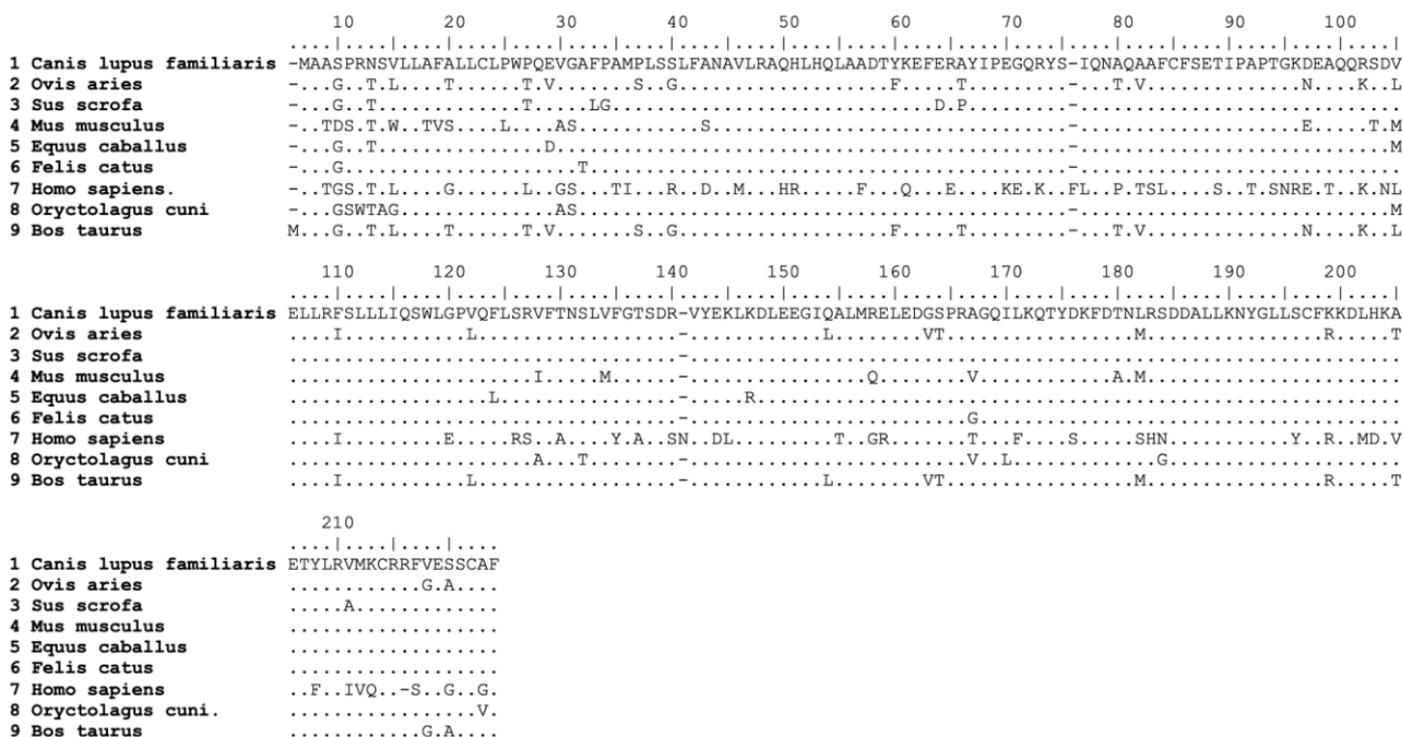


**Figura 10.** Medición del diámetro de larvas 3 de *T. canis*.

## PCR.

### Diseño de iniciadores

Se diseñaron iniciadores para amplificar un fragmento del gen que codifica el receptor de somatotropina, utilizando el software Primer3 Input 0.4.0, basándose en una región conservada del gen a partir de secuencias nucleotídicas disponibles en el GenBank de diferentes mamíferos: perro (NM\_001003123.1), gato (FCU25973), cerdo (NM\_213869), caballo (AB358959), ratón (NM\_008117), conejo (NM\_001329075), ovino (X15976), bovino (EF451794) y humano (AH002706). Se hizo un alineamiento de estas secuencias para identificar la región en la que hubo una mayor similitud (figura 11).



**Figura 11.** Comparativa de secuencias aminoacídicas de una fracción de la región del precursor de somatotropina de varios mamíferos. Cada letra indica la inicial de un aminoácido. Los puntos indican similitud, mientras que una letra en la misma posición muestra divergencia; los guiones indican gaps (inserciones o deleciones).

En el cuadro 2 se muestra la matriz del porcentaje de identidad de las secuencias. Los números son referentes a cada especie mostrada en el alineamiento.

**Cuadro 2.** Matriz de identidad entre diferentes secuencias de una región parcial del receptor de la somatotropina. Se remarca con negritas el valor de similitud entre la secuencia del receptor de somatotropina del perro y del ovino, la cual es mayor a 85%, lo que dio una pauta para mayor confiabilidad en la utilización de la hormona comercial de ovino disponible.

Seq->	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	ID	<b>0.884</b>	0.962	0.902	0.972	0.986	0.674	0.930	0.884
2	<b>0.884</b>	ID	0.879	0.828	0.884	0.879	0.665	0.842	1.000
3	0.962	0.879	ID	0.879	0.953	0.958	0.665	0.912	0.879
4	0.902	0.828	0.879	ID	0.898	0.898	0.665	0.902	0.828
5	0.972	0.884	0.953	0.898	ID	0.967	0.669	0.930	0.884
6	0.986	0.879	0.958	0.898	0.967	ID	0.674	0.930	0.879
7	0.674	0.665	0.665	0.665	0.669	0.674	ID	0.669	0.665
8	0.930	0.842	0.912	0.902	0.930	0.930	0.669	ID	0.842
9	0.884	1.000	0.879	0.828	0.884	0.879	0.665	0.842	ID

### **Amplificación de genes por PCR del receptor de somatotropina**

El aislamiento de ácido desoxirribonucleico genómico (ADNg) de los gusanos adultos de *T. canis* se llevó a cabo siguiendo el método de extracción con TRIzol™ descrito por Lucchetti et al., 2019. Mientras que la extracción del ADNg del hígado de cachorro (control positivo) se llevó a cabo utilizando el kit comercial FavorPrep Tissue Genomic DNA Extraction (Favorgen, cat. FATGK001-1). La concentración y pureza del ADNg se

cuantificó en un nano-espectrofotómetro (NanoDrop Lite de Thermo Scientific™). La PCR se realizó siguiendo el método descrito por Jacobs et al., 1997.

### **Análisis estadísticos**

Se utilizó un ANOVA multifactorial para analizar los factores longitud/día/concentración de somatotropina, diámetro/día/concentración de somatotropina y motilidad/día/ concentración de somatotropina. Se utilizó un ANOVA de una sola vía para comparar entre las concentraciones de somatotropina en cada día de exposición. Las diferencias entre medias fueron determinadas por la prueba de Fisher LSD. Para el análisis de los datos se utilizó el software GraphPad 9.5.1

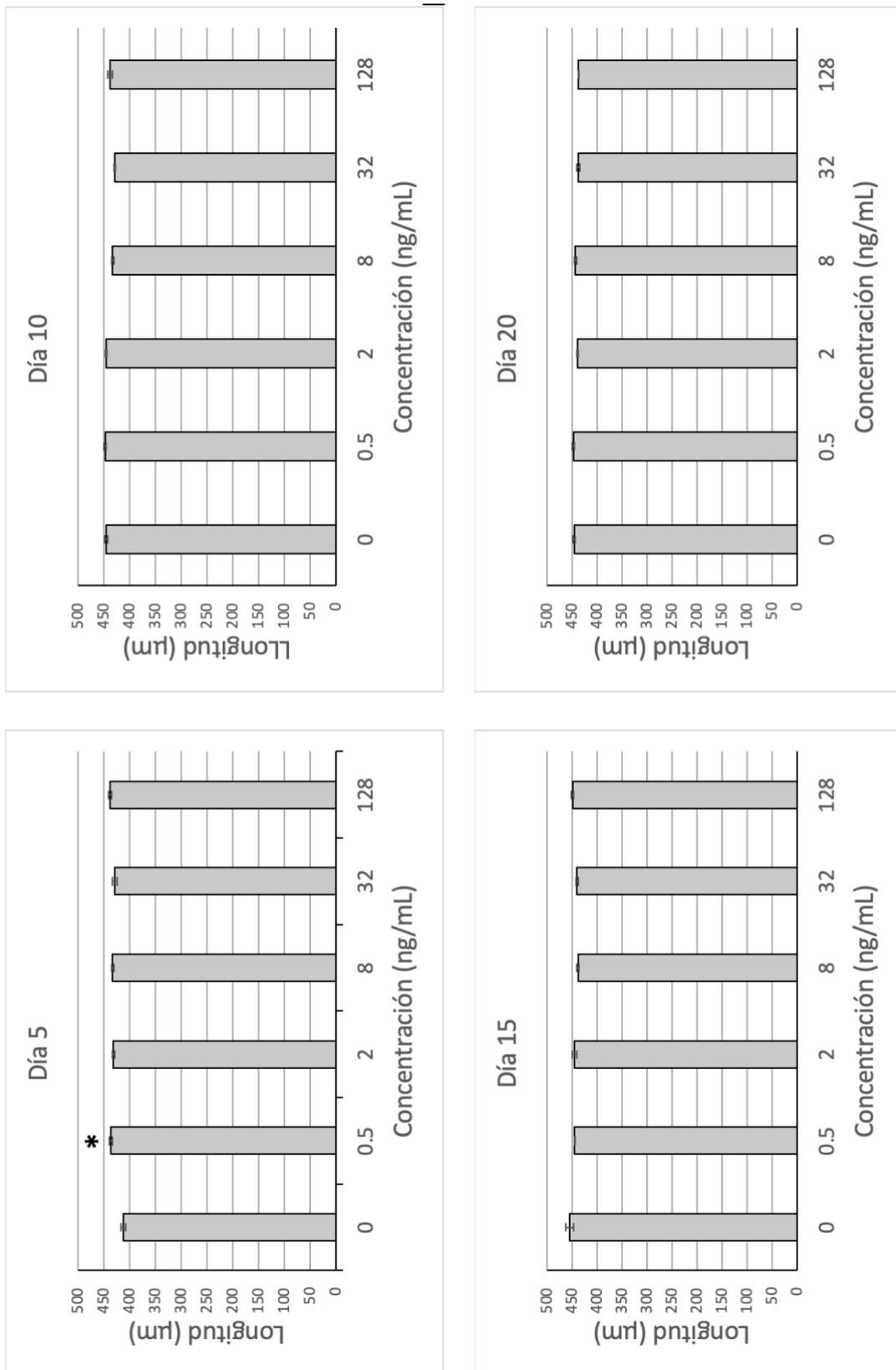
## **RESULTADOS**

Los datos de la longitud de larvas de *T. canis* los días 5, 10, 15 y 20 de exposición a las diferentes concentraciones de somatotropina se presentan en el cuadro 3 y en la figura 13. El análisis ANOVA multifactorial mostró un efecto día, en donde las larvas cultivadas con diferentes concentraciones somatotropina durante cinco días ( $429 \pm 9.2$ ) son más pequeñas ( $p < 0.05$ ) que las larvas cultivadas con las mismas concentraciones de somatotropina a los días 10 ( $441 \pm 8.5$ ), 15 ( $445 \pm 8.2$ ) y 20 ( $441 \pm 4.8$ ). No se observaron diferencias ( $p > 0.05$ ) de longitud de las larvas cultivadas con las mismas concentraciones de somatotropina durante 10, 15 y 20 días.

Las larvas cultivadas durante 5 días con todas las concentraciones de somatotropina tuvieron una longitud mayor ( $p < 0.001$ ) que las cultivadas en ausencia de somatotropina. No se observaron diferencia de longitud entre las larvas cultivadas con las diferentes concentraciones de somatotropina los días 10, 15 y 20.

**Cuadro 3.** Datos de las medias ( $\pm$  EE) de la longitud de larvas de *T. canis* tratadas con diferentes concentraciones de somatotropina.

concentración de somatotropina ng/mL	Días de exposición			
	5	10	15	20
0	412.07 $\pm$ 2.8	445.38 $\pm$ 11.7	454.81 $\pm$ 2.1	445.22 $\pm$ 1.7
0.5	435.77 $\pm$ 2.6*	446.97 $\pm$ 3.5	444.55 $\pm$ 2	447.22 $\pm$ 1.7
2	430.71 $\pm$ 3.4	445.18 $\pm$ 2.9	444.96 $\pm$ 2.4	438.41 $\pm$ 1.6
8	432.19 $\pm$ 1.7	432.19 $\pm$ 4.3	437.51 $\pm$ 8	442.63 $\pm$ 1
32	428.26 $\pm$ 2.5	428.26 $\pm$ 2.2	439.76 $\pm$ 2.2	437.10 $\pm$ 2.6
128	437.23 $\pm$ 1.7	437.23 $\pm$ 2.7	448.78 $\pm$ 3.5	436.96 $\pm$ 0.9

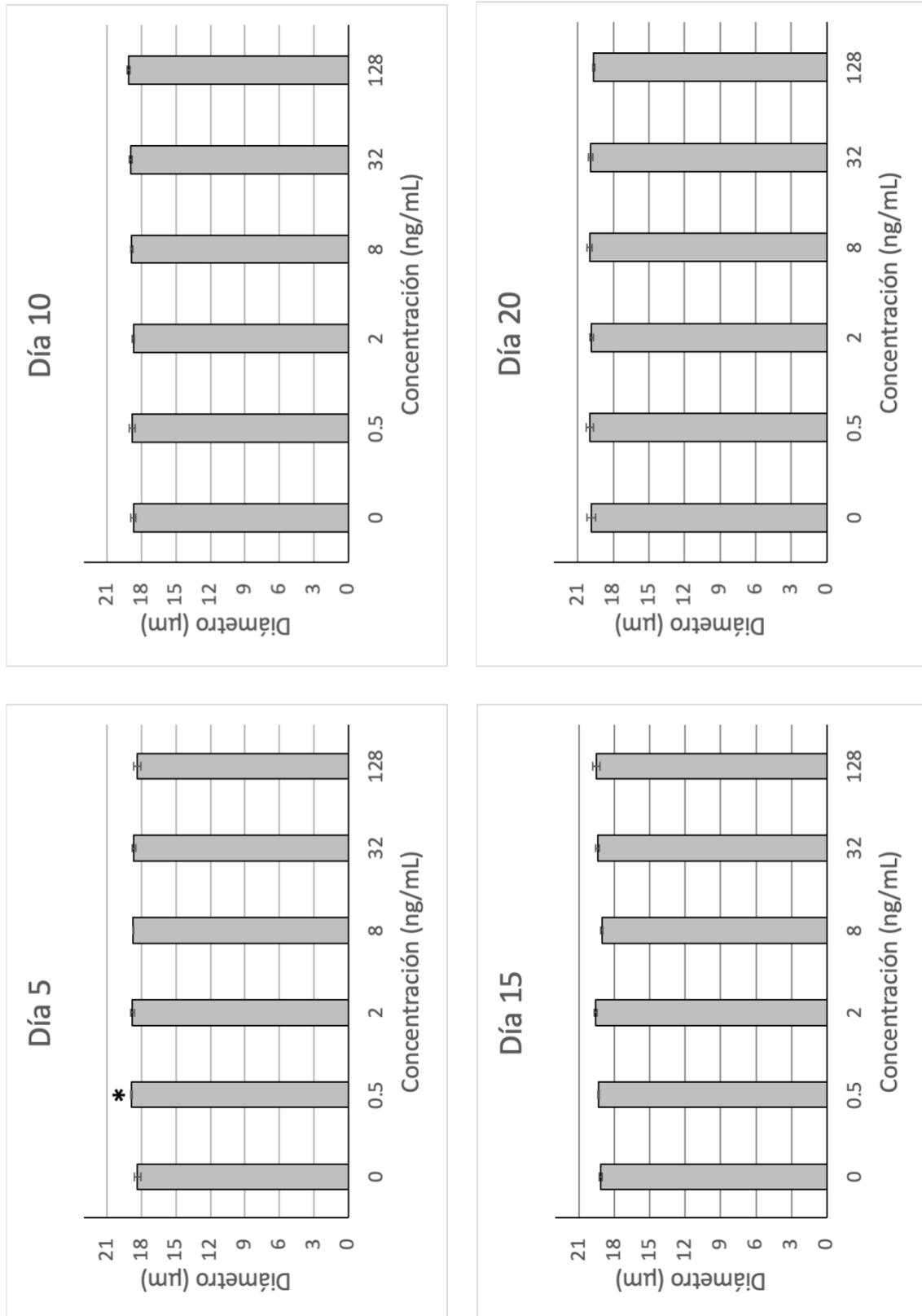


**Figura 12.** Aumento de la longitud vs control (0) de la longitud de las larvas de *T. canis* cultivadas en RPMI-1640 en presencia de diferentes concentraciones de somatotropina.

Los datos del diámetro de larvas de *T. canis* los días 5, 10, 15 y 20 de exposición a las diferentes concentraciones de somatotropina se presentan en el cuadro 4 y en la figura 14. El análisis ANOVA multifactorial mostró un efecto día, en donde las larvas cultivadas con diferentes concentraciones somatotropina durante cinco días ( $18.52 \pm 0.6$ ) tiene un diámetro menor ( $p < 0.05$ ) que las larvas cultivadas con las mismas concentraciones de somatotropina a los días 10 ( $18.86 \pm 0.3$ ), 15 ( $19.35 \pm 0.3$ ) y 20 ( $19.87 \pm 0.4$ ). No se observaron diferencias ( $p > 0.05$ ) en el tamaño del diámetro de las larvas cultivadas con las mismas concentraciones de somatotropina durante 10, 15 y 20 días.

**Cuadro 4.** Datos de las medias ( $\pm$  EE) del diámetro de larvas de *T. canis* tratadas con diferentes concentraciones de somatotropina.

Concentración de somatotropina ng/mL	Días de exposición			
	5	10	15	20
0	18.35 $\pm$ 0.29	18.71 $\pm$ 0.24	19.15 $\pm$ 0.13	19.85 $\pm$ 0.35
0.5	18.88 $\pm$ 0.04*	18.81 $\pm$ 0.24	19.36 $\pm$ 0.04	19.96 $\pm$ 0.31
2	18.79 $\pm$ 0.15	18.71 $\pm$ 0.1	19.59 $\pm$ 0.11	19.83 $\pm$ 0.15
8	18.73 $\pm$ 0.03	18.86 $\pm$ 0.08	19.06 $\pm$ 0.08	19.99 $\pm$ 0.22
32	18.67 $\pm$ 0.15	18.92 $\pm$ 0.12	19.42 $\pm$ 0.16	19.91 $\pm$ 0.17
128	18.38 $\pm$ 0.29	19.15 $\pm$ 0.12	19.53 $\pm$ 0.28	19.67 $\pm$ 0.09

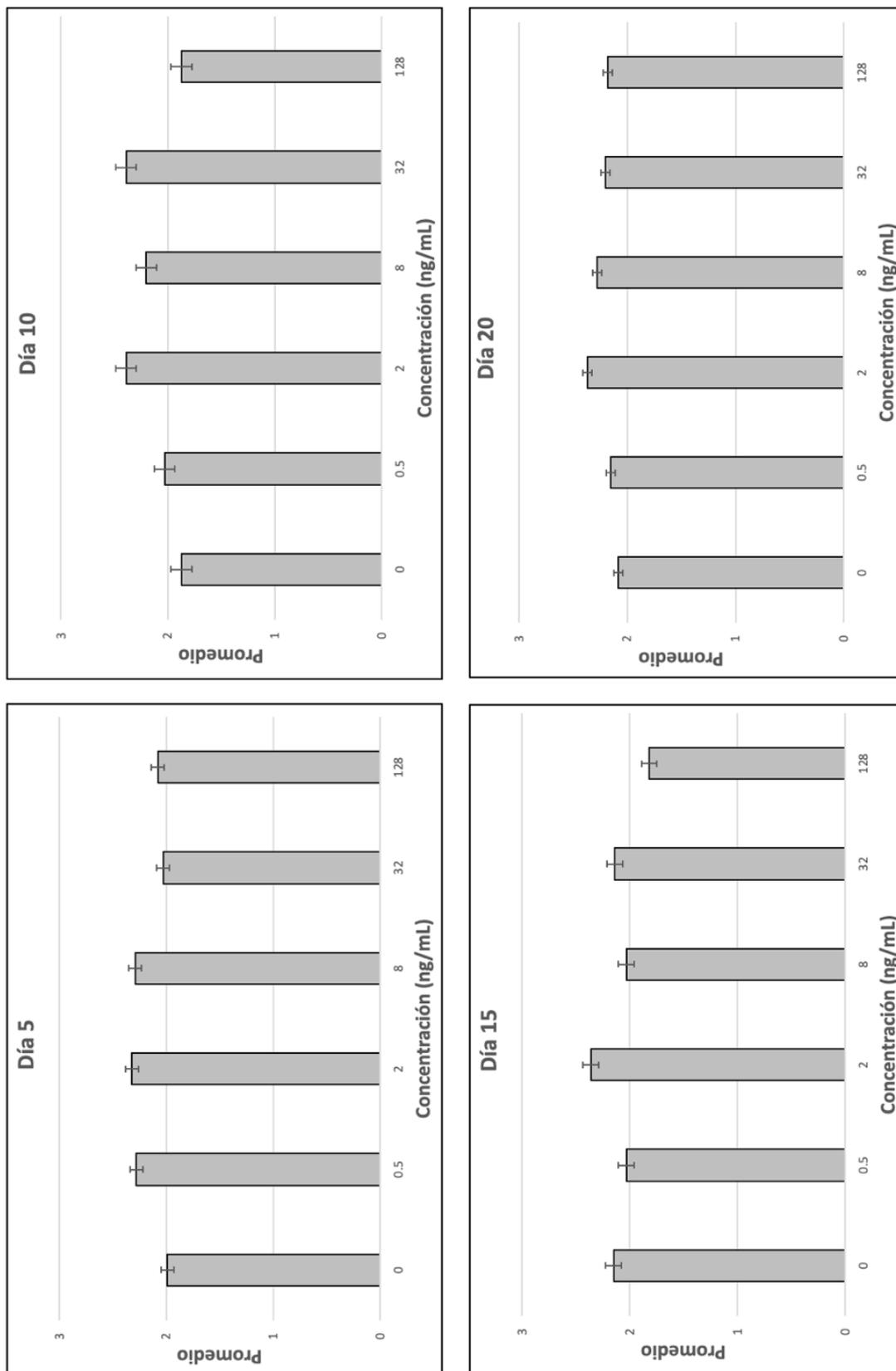


**Figura 13.** Aumento vs control (0) del diámetro de las larvas de *T. canis* cultivadas en RPMI-1640 en presencia de diferentes concentraciones de somatotropina vs control (0).

Los datos de la motilidad de las larvas de *T. canis* los días 5, 10, 15 y 20 de exposición a las diferentes concentraciones de somatotropina se presentan en el cuadro 5 y en la figura 15. El análisis ANOVA multifactorial no mostró diferencias entre los días ni entre las concentraciones ( $p>0.05$ ).

**Cuadro 5.** Datos de las medias ( $\pm$  EE) de la motilidad de larvas de *T. canis* tratadas con diferentes concentraciones de somatotropina.

Concentración de somatotropina ng/mL	Días de exposición			
	5	10	15	20
0	1.99 $\pm$ 0.09	1.87 $\pm$ 0.11	2.15 $\pm$ 0.14	2.08 $\pm$ 0.12
0.5	2.28 $\pm$ 0.23	2.03 $\pm$ 0.14	2.03 $\pm$ 0.1	2.15 $\pm$ 0.2
2	2.32 $\pm$ 0.1	2.39 $\pm$ 0.04	2.36 $\pm$ 0.1	2.37 $\pm$ 0.1
8	2.29 $\pm$ 0.16	2.20 $\pm$ 0.04	2.03 $\pm$ 0.17	2.28 $\pm$ 0.14
32	2.03 $\pm$ 0.1	2.39 $\pm$ 0.08	2.14 $\pm$ 0.22	2.20 $\pm$ 0.07
128	2.08 $\pm$ 0.15	1.87 $\pm$ 0.19	1.82 $\pm$ 0.13	2.18 $\pm$ 0.06



**Figura 14.** Aumento vs control (0) de la motilidad de las larvas de *T. canis* cultivadas en RPMI-1640 en presencia de diferentes concentraciones de somatotropina vs control (0).

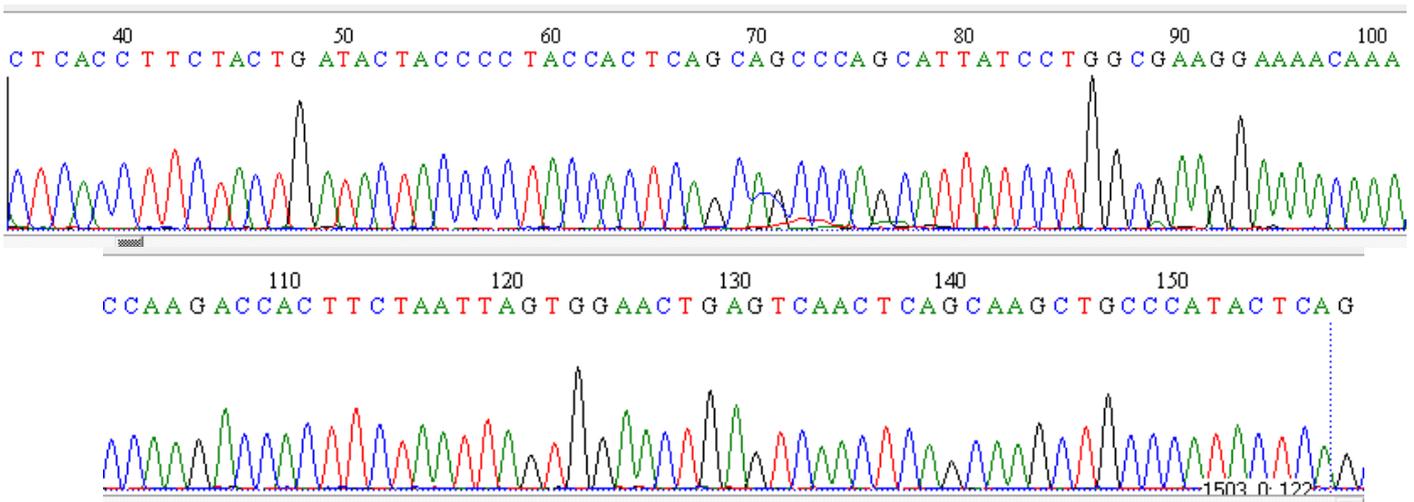
## INICIADORES.

Considerando el fragmento de ADN<sub>g</sub> con mayor similitud entre especies que codifica para el receptor de somatotropina utilizando la metodología ya descrita, se diseñaron los siguientes iniciadores que se muestran en el cuadro 6.

**Cuadro 6.** Secuencia de iniciadores utilizados para la amplificación del gen del receptor de somatotropina.

	<b>Secuencia 3'-5'</b>
Sentido	GCTCAGCCACAGAGGTTAAA
Antisentido	CRTAGCCACATGATGAGAGA
<b>Tamaño del amplicón</b>	649 pb

El fragmento amplificado por PCR a partir del ADN<sub>g</sub> de hígado de cachorro, tuvo un tamaño de 649 pb y una similitud del 99.67% (figura 17) con el del receptor de somatotropina canina. Este fragmento fue secuenciado obteniendo la secuencia mostrada en la figura 16.



**Figura 15.** Secuencia nucleotídica obtenida por PCR del ADN<sub>g</sub> de una muestra de hígado de cachorro.

NIH National Library of Medicine  
National Center for Biotechnology Information

BLAST® » blastn suite » results for RID-Y5TGGYXV016

Home Recent Results Saved Strategies Help

< Edit Search Save Search Search Summary

How to read this report? BLAST Help Videos Back to Traditional Results Page

**Job Title** Nucleotide Sequence

RID [Y5TGGYXV016](#) Search expires on 02-09 07:00 am [Download All](#)

Program BLASTN [Citation](#)

Database nt [See details](#)

Query ID Icl|Query\_57859

Description None

Molecule type dna

Query Length 622

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

**Filter Results**

Organism *only top 20 will appear*  exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity  to  E value  to  Query Coverage  to

[Filter](#) [Reset](#)

**Descriptions** Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

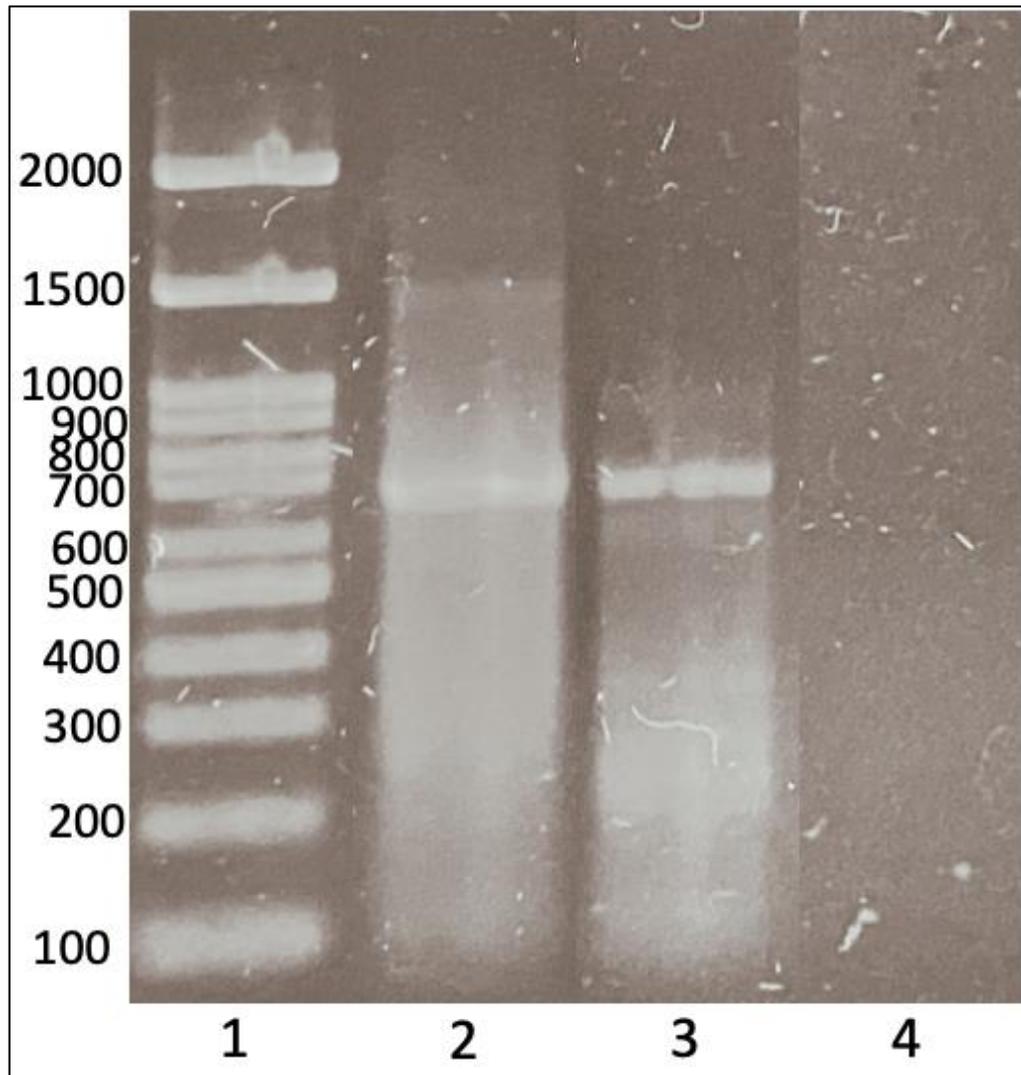
select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Canis lupus familiaris breed Labrador retriever chromosome 04a</a>	<a href="#">Canis lupus fa...</a>	1118	1118	98%	0.0	99.67%	86937822	<a href="#">CP050572.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Canis lupus genome assembly, chromosome: 4</a>	<a href="#">Canis lupus</a>	1118	1118	98%	0.0	99.67%	88630877	<a href="#">HG994386.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">PREDICTED: Canis lupus familiaris growth hormone receptor (GHR), transcript variant X12, mR...</a>	<a href="#">Canis lupus fa...</a>	1118	1118	98%	0.0	99.67%	4044	<a href="#">XM_038862224.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">PREDICTED: Canis lupus familiaris growth hormone receptor (GHR), transcript variant X11, mR...</a>	<a href="#">Canis lupus fa...</a>	1118	1118	98%	0.0	99.67%	4109	<a href="#">XM_038862222.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">PREDICTED: Canis lupus familiaris growth hormone receptor (GHR), transcript variant X10, mR...</a>	<a href="#">Canis lupus fa...</a>	1118	1118	98%	0.0	99.67%	3958	<a href="#">XM_038862221.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">PREDICTED: Canis lupus familiaris growth hormone receptor (GHR), transcript variant X9, mRNA</a>	<a href="#">Canis lupus fa...</a>	1118	1118	98%	0.0	99.67%	3985	<a href="#">XM_038862220.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">PREDICTED: Canis lupus familiaris growth hormone receptor (GHR), transcript variant X8, mRNA</a>	<a href="#">Canis lupus fa...</a>	1118	1118	98%	0.0	99.67%	3986	<a href="#">XM_038862219.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">PREDICTED: Canis lupus familiaris growth hormone receptor (GHR), transcript variant X7, mRNA</a>	<a href="#">Canis lupus fa...</a>	1118	1118	98%	0.0	99.67%	3985	<a href="#">XM_038862218.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">PREDICTED: Canis lupus familiaris growth hormone receptor (GHR), transcript variant X6, mRNA</a>	<a href="#">Canis lupus fa...</a>	1118	1118	98%	0.0	99.67%	3986	<a href="#">XM_038862217.1</a>

**Figura 16.** Búsqueda en BLAST® para la secuencia nucleotídica obtenida de una muestra de ADN de hígado de cachorro. Utilizando los iniciadores diseñados, el PCR del ADNg de células de hígado de perro y el ADNg de adultos de *T. canis* amplificaron un segmento de aproximadamente 649pb (figura 16), el cual tiene una similitud del 99.67% con el del GHR del perro.

## PCR

En la figura 17 se presenta el amplicón del gen del GHR canina. Se amplificó un fragmento de 649 pb de las muestras de ADNg de hígado de cachorro y de muestra de ADNg de adultos de *T. canis*.



**Figura 17.** Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra los amplicones obtenidos por PCR de un fragmento del gen que codifica para el receptor de somatotropina separados electroforéticamente. Carril 1: marcador de pared de bases, carril 2: ADNg de células de hígado de perro (control positivo), carril 3: ADNg de adultos de *T. canis*; carril 4: testigo negativo.

## DISCUSIÓN.

Se ha demostrado que la presencia de diferentes hormonas repercute en el desarrollo de las larvas de *T. canis*. Muñoz and Alba (2018) sugieren que las larvas enquistadas en los tejidos de las perras gestantes son reactivadas por acción de la progesterona y la prolactina a mitad de la gestación; siendo la progesterona la que induce una secreción proporcional de somatotropina aumentando los niveles basales de esta hormona. Verstegen (2008) menciona que la somatotropina tiene efecto a nivel de la glándula mamaria aumentando la producción en esta acompañada también de la prolactina, es conocido que la vía lactogénica constituye también una fuente importante de infección para los cachorros. Los niveles de somatotropina son diferentes dependiendo de la edad y sexo, siendo en los cachorros donde hay mayor pico de producción de esta hormona. Una forma de observar el efecto de las hormonas sobre el parásito es su exposición directa a estas y la evaluación de sus cambios morfológicos y de motilidad.

La somatotropina tiene su liberación hacia el torrente sanguíneo desde la adenohipófisis de forma pulsátil y cíclica, es decir, que ocurre de forma episódica durante cortos periodos de tiempo y sigue un ritmo circadiano, donde el nivel más alto se da durante el sueño profundo y desciende a niveles basales cuando el animal despierta (French et al., 1987). En este trabajo se utilizaron diferentes concentraciones de somatotropina ovina siguiendo un rango por debajo del basal y hasta 250% más alto que el pico mayor. Se observó que en el día 5 de exposición a la hormona a partir de una concentración de 0.5 ng/mL hubo un aumento en el tamaño de las larvas tanto longitudinal como del diámetro a diferencia del grupo control, lo cual indica que la presencia de la hormona aún en un rango más bajo del normal tuvo un efecto sobre las larvas los primeros 5 días de exposición a esta.

Gutiérrez (2018) estudió el efecto de la exposición *in vitro* de la progesterona expuesta a larvas de *Haemonchus contortus*, teniendo como

resultado que había un aumento del tamaño de las larvas solo los primeros 5 días, similar a lo observado en este estudio. En otros estudios como el de Kobayashi et al. (2002) donde evaluaron el efecto directo de tres hormonas (progesterona, estradiol-17 $\beta$  y corticosterona) sobre el crecimiento del taquizoito de *Neospora caninum*, y donde no se observó ningún efecto sobre el crecimiento del parásito *in vitro* o *in vivo* concluyendo que niveles fisiológicos de algunas hormonas pueden no tener un efecto en los parásitos. Arasu (2001) evaluó *in vitro* el efecto del estrógeno y estradiol a larvas 3 de *Ancylostoma caninum*, sabiendo que las larvas enquistadas en músculo estriado de este nematodo se reactivan durante la gestación, sin embargo, no observó una acción directa sobre la respuesta de reactivación de las larvas en tejidos.

En este estudio por medio de un ANOVA multifactorial se pudo observar un efecto día de crecimiento de las larvas, es decir que en los días 10, 15 y 20 se observaron tamaños promedios entre las diferentes concentraciones e incluyendo al grupo control, lo que da a entender que la presencia de la hormona no interfiere con el desarrollo normal de las larvas.

Chávez et al., (2016, 2019) observaron que la exposición de las larvas de *T. canis* a progesterona y prolactina aumentaba su motilidad a partir de una concentración normal en la perra gestante. En este estudio no se observaron diferencias significativas en la motilidad de las larvas expuestas o no a la hormona, sin embargo se observó que esta exposición no inhibió la actividad de las larvas descartando un efecto negativo.

En otros estudios se ha observado la presencia de receptores para diferentes hormonas en algunas células de diferentes parásitos. Escobedo et al. (2010), mediante la técnica de PCR amplificaron una banda de un tamaño similar al del receptor de progesterona en el cisticerco de *Taenia solium*, reafirmando su estudio sobre el efecto de esta hormona para la evaginación del escólex de este metacestodo. Gutiérrez (2018), buscó por PCR

fragmentos de genes que codificaran para el receptor de progesterona y el de prolactina, en células de ADN obtenido de células de *H. contortus*, como resultado no observó un receptor para progesterona y a nivel *in vitro* observó una inhibición en el desarrollo de las larvas de este parásito, en su trabajo observó la amplificación de un gen para el receptor de prolactina, sin embargo, no observó un efecto de cambios morfológicos en las larvas en el cultivo *in vitro* con esta hormona. Lim et al. (2013) observaron la presencia de un receptor para testosterona amplificando un fragmento de un transcrito de ARNm de células de *Toxoplasma gondii*. Así mismo, Chávez et al., (2016, 2019), también reportaron la amplificación tanto del gen que codifica para el receptor de progesterona y para el receptor de prolactina en larvas de *T. canis*. En este estudio se amplificó por PCR a partir de ADNg obtenido de células de *T. canis*, un producto con un tamaño aproximado de 649 pb, similar al amplificado con ADNg derivado de hígado de cachorro, del cual previamente se obtuvo un amplicón del mismo tamaño y que al secuenciar y mediante un análisis en BLAST® se obtuvo una secuencia con una similitud del 99.67% con la secuencia nucleotídica del receptor de somatotropina canina.

La evaluación de parámetros morfológicos es una forma de observar el efecto que algunas hormonas del hospedador pueden tener en los parásitos; sin embargo, los efectos de las hormonas pueden ser también del tipo fisiológico y metabólico en el parásito (Gutiérrez, 2018). En este trabajo solo se evaluaron parámetros morfológicos, por lo tanto, no se descarta que la somatotropina tenga un efecto a nivel metabólico en las larvas de *T. canis*.

Dentro del organismo del hospedador los eventos fisiológicos no actúan de forma aislada, es decir, que pueden estar involucradas más de una hormona para que en conjunto exista un efecto en el hospedador, las cuales a su vez actúan de forma indirecta sobre los tejidos, en este trabajo sólo se evaluó el efecto de la somatotropina pero sería conveniente la evaluación de

la acción de esta hormona en conjunto con otras presentes durante el mismo periodo dentro del hospedador para evaluar si hay un efecto en las larvas de *T. canis*.

En este estudio se utilizó somatotropina ovina ya que fue la hormona disponible comercialmente y con mayor similitud con la del perro; sin embargo, Kievits et al. (1988) mencionan que esta hormona es específica de especie, ya que tiene una composición de aminoácidos variable que la hace tener como efecto biológico una interacción específica a su receptor. *T. canis* no tiene un desarrollo hacia su fase sexual madura en los ovinos, por lo tanto, aunque haya un porcentaje de similitud entre las hormonas de ambas especies, podría no existir un efecto mayor al observado debido a esta especificidad que tiene *T. canis* por el desarrollo en los perros.

## CONCLUSIONES

1. La somatotropina, a una dosis de 0.5 ng/mL, *in vitro*, induce el crecimiento en larvas de *Toxocara canis* al día 5 de exposición.
2. Se amplificó por PCR, un fragmento de 649 pb del receptor de somatotropina, a partir de ADNg de hígado de cachorro.
3. El amplicón obtenido tuvo una similitud del 99.67% con el del receptor de somatotropina canina disponible en el GenBank.
4. Se amplificó un fragmento con un tamaño similar al del receptor de somatotropina canina a partir de ADNg de *Toxocara canis*.

## REFERENCIAS

1. Alba-Hurtado F. (2020). Parasitología Veterinaria. Ciudad de México: UNAM; P. 184.
2. Alba-Hurtado F., Muñoz-Guzmán MA. (2022). Toxocariosis: From a One Health Perspective [Internet]. Parasitic Helminths and Zoonoses-From Basic to Applied Research. IntechOpen.
3. Arasu P. (2001). *In vitro* reactivation of *Ancylostoma caninum* tissue-arrested third-stage larvae by transforminf growth factor-beta. The Journal of Parasitology. Aug;87(4): 733-738.
4. Azira NM, Zeehaida M. (2011). A case report of ocular toxocariasis. Asian Pac J Trop Biomed. Apr;1(2):164-5.
5. Barriga, O. (1988). A critical look at the importance, prevalence and control of toxocariasis and the possibilities of immunological control. Vet. Parasitol. 63:473-479.
6. Beckage NE. (1993). Endocrine and neuroendocrine host-parasite relationships. Receptor. Fall;3(3):233-45.
7. Burke TM, Roberson EL. (1985). Prenatal and lactational transmission of *Toxocara canis* and *Ancylostoma caninum*: experimental infection of the bitch before pregnancy. Int J Parasitol (1): 71-5.
8. Campos F, Cantó G. (2002). Frecuencia de helmintos en intestinos de perros sin dueño sacrificados en la ciudad de Querétaro, Querétaro, México. Redalyc.
9. Chávez LE, Morlaes J, Muñoz MA, Nava KE, Ramírez H, Moreno NA, Hernández R, Alba F. (2016) The *in vitro* effect of prolactin on the growth motility and expression of prolactin receptors in larvae of *Toxocara canis*. Veterinary Parasitology, vol. 224, pp: 33-38.
10. Chávez LE, Morales J, Nava KE, Ramírez H, Moreno NA, Prado MG, Muñoz MA, Alba F. (2019). Progesterone *in vitro* increases growth,

- motility and progesterone receptor expression in third stage larvae of *Toxocara canis*. *Experimental Parasitology*, vol. 198, pp: 1-6.
11. Chávez- Güitrón LE. (2016). Estudio de algunos factores endócrinos sobre la reactivación de larvas 2 de *Toxocara canis* (tesis doctoral). Estado de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México.
  12. Cordero M, Rojo F, Marínez A, Sánchez M, Navarrete I, Diez P, Quiroz H, Carvalho M. (1999). *Parasitología Veterinaria*. España: McGraw-Hill.
  13. Corrada, Y., Humbert, A., Dragonetti, A., Goya, R. & Gobello, C. (2003). Enanismo Pituitario Canino: Reporte de dos casos. *Rev FCV-LUZ*, vol. XIII (6):448-451.
  14. Cruz KS, Wondracek DS, Melo CM. (2020). Enanismo pituitario en un canino Poodle: hallazgos clínicos y de laboratorio. *Rev Inv Vet Perú* 31(1).
  15. De la Fé P, Duménigo BE, Brito, Aguilar J. (2006). *Toxocara canis* y Síndrome *Larva Migrans Visceralis*. REDVET. *Revista Electrónica de Veterinaria*, VII(4), 1-42.
  16. Deplazes P, Eckert J, Mathis A, Samson G, Zahner H. (2016). *Parasitology in Veterinary*. *Parasitol Vet Med*. Switzerland: Wageningen Academic Publishers.
  17. Despommier D. (2003). Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clin. Microbiol. Rev.* (16): 265-272.
  18. Dubey JP. (1978). Patent *Toxocara canis* Infection in Ascarid-Naive Dogs. *The Journal of Parasitology*, 64(6), 1021–1023.
  19. Duijvestijn M, Mughini L, Schuurman N, Schijf W, Wagenaar J, Egberink H. (2016). Enteropathogen infections in canine puppies:

- (co)occurrence, clinical relevance and risk factors. *Vet. Microbiol.* (195): 115-122.
20. Dumsmore JD, Thompson RC, Bates IA. (1983). The accumulation of *Toxocara canis* larvae in the brains of mice. *Int. J. Parasitol.* 47: 652-656.
21. Escobedo G, López L, Morales J. (2009). Neuroinmunoendocrine modulation in the host by helminth parasites: a novel form of host coevolution?. *NeuroInmmunomodulation* 16(2):65-7.
22. Escobedo G, Morales J. (2004). Trans-regularización por hormonas del hospedero de la Fisiología Parasitaria. *REB* 23(1):12-17.
23. Escobedo G, Terrazas LI, Camacho I, Hernández OT, Ostoa P, García M, Morales J. (2010). Progesterone Induces Scolex Evagination of the Human Parasite *Taenia solium*: Evolutionary Implications to the Host-Parasite Relationship. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Vol 2010, pages: 591079.
24. Fakhri Y, Gasser R, Rostami A, Fan C, Ghasemi S, Javanian M, Bayani M, Armoon B, Moradi B. (2018). *Toxocara* eggs in public places worldwide-A systematic review and meta-analysis. *Environmental Pollution*. Elsevier. Vol 242 Part B, 1467-1475.
- French MB, Vaitkus P, Cukerman E, Sirek A, Sirek OV. Secretory pattern of canine growth hormone. *AM J Physiol.* 1978 Feb;252 (2 Pt 1): E268-72.
25. Glickman L, Schantz P. (1981). Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidemiologic Reviews*, Oxford Academic (3):230-250.
26. Guerrant R, Walker D, Weller P. (2002). *Enfermedades infecciosas tropicales*. España: Elsevier Science.
27. Gutiérrez R. (2018). Identificación de receptores para estrógenos, prolactina y progesterona en larvas de *Haemonchus contortus* (tesis

- doctoral). Estado de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- 28.Hotez P, Wilkins P. (2009). Toxocariasis: America's Most Common Neglected Infection of Poverty and a Helminthiasis of Global Importance? PLoS Negl Trop Dis 3(3): e400.
- 29.International Helminth Genomes Consortium. (2019). Comparative genomics of the major parasitic worms. Nature Genetics. Jan;51(1):163-174.
- 30.Jacobs MV, Snijders PJ, van den Brule AJ, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Walboomers JM. (1997). A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR- enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. J Clin Microbiol. Mar; 35(3):791-5.
- 31.Jin Z, Akao N, Ohta N. (2008). Prolactin evokes lactational transmission of larvae in mice infected with *Toxocara canis*. Parasitol. Int. 57:495-498.
- 32.Kato Y, Shimokawa N, Kato T, Hirai T, Yoshihama K, Kawai H, Wakabayashi K. (1990). Porcine growth hormone: molecular cloning of cDNA and expression in bacterial and mammalian cells. BBA-Gene Struc. and Express; 1048(2-3):290-293.
- 33.Kievits JM, van Dam HC, Hessel HW, Brand A. (1988). Somatotropin: estructura, (bio)synthesis and species specificity. Tijdschrift Voor Diergeneeskunde. Jul; 113 (14): 791-800.
- 34.Kiuchi F, Myashita N, Tsuda Y, Kondo K, Yoshimura H. (1987). Studies on crude drugs effective of visceral larva migrans. I. Identification of larvicidal principles in betel nuts. Chem. Pharma. Bull. 35(7):2880-2886.
- 35.Kobayashi A, Katagiri S, Kimura T, Ochiai K, Umemura T. (2002). Steroid hormones do not reactivate *Neospora caninum* in

- ovariectomized mice. Journal of Veterinary Medical Science, vol 64;9 pp: 773-777.
- 36.Kooistra HS, Okkens AC. Secretion of prolactin and growth hormone in relation to ovarian activity in the dog. Reprod Domest Anim, 2001 Aug; 36 (3-4): 115-9.
- 37.Kopchick J, Cioffi JA. (1991). Exogenous and endogenous effects of growth hormone in animals. Liv. Prod. Sci. 27(1):61-75.
- 38.Lee RM, Moore LB, Bottazzi ME, Hotez PJ. (2014). Toxocariasis in North America: A Systematic Review. PLoS Negl Trop Dis. 8(8): e3116.
- 39.Lim A, Kumar V, Hari Dass SA, Vyas A. (2013). *Toxoplasma gondii* infection enhances testicular steroidogenesis in rats. 2013. Mol Ecol, 22: 102-110.
- 40.Lucchetti C, Genchi M, Venco L, Bazzocchi C, Kramer L, Vismarra A. (2019). Optimized protocol for DNA/RNA co-extraction from adults of *Dirofilaria immitis*. MethodsX. Vol 6, pp: 2601-2065.
- 41.Ma G, Holland C, Wang T, Hofmann A, Fan C, Maizels R, Hotez P, Gasser R. (2018). Human toxocariasis. PubMed.NIH(1):e14-e24.
- 42.Macpherson C. (2013). The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A zoonosis of global importance. International Journal for Parasitology. Vol. 43, Issues 12-13, pp: 999-1008.
- 43.Manhard J, Stoye M. Comportamiento de las larvas de *Toxocara canis* WERNER 1782 (Anisakidae) durante y después de la migración pulmonar en el anfitrión definitivo (Beagle). (1982). Zoonoses and Public Health. Vol 28, issue 5; pp 386-406.
- 44.Martínez AN. (2014). Seroprevalencia de *Toxocara spp* en niños de Chalco Estado de México (Tesis). Amecameca de Juárez. Universidad Autónoma del Estado de México.

45. Miller A. (2020). Chapter Twenty-Six-Pathology of larvae and adults in dogs and cats. *Advances in Parasitology* (109): 537-544.
46. Muñoz MA, Alba F. (2018). Progesterone and prolactin: Hormones important for the reactivation of *Toxocara canis* larvae in bitches. *Advances in Neuroimmune Biology* (7): 67-78.
- Nap RC, Mol JA, Hazewinkel HAW (1993). Age-related plasma concentration of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor I (IGF-I) in great dane pups fed different dietary levels of protein. *Domestic Animal Endocrinology*. Vol. 10, Issue 3: 237-247.
47. Nichols RL. (1956). The Etiology of Visceral Larva Migrans: I. Diagnostic Morphology of Infective Second-Stage *Toxocara* Larvae. *The Journal of Parasitology*. Vol 42 (4): 349-362.
48. Pritchard D. (1995). The survival strategies of hookworms. *Parasitol*: 255-259.
49. Quiroz H. (1999). *Parasitología y Enfermedades Parasitarias en Animales Domésticos*. México: Limusa.
50. Renostro R, Ramathan A, Bach L, Fitz Y, Braghin I, Zevallos S, Roldan W, Drulla A, de Barros I, Pettan C, Borges F, Pires A, Turra C, Alvares V, Welker A. (2021). One health approach on human seroprevalence of anti-*Toxocara* antibodies, *Toxocara* spp eggs in dogs and sand samples between seashore mainland and island areas of southern Brazil. *One health*, vol. 13, 100353.
51. Rosa A, Ribicich M. (2012). *Parasitología y Enfermedades Parasitarias en Veterinaria*. Buenos Aires, Argentina: Hemisferio Sur.
52. Rostami A, Mohammad S, Hofmann A, Ma G, Wang T, Behniafar H, Taghipour A, Fakhri Y, Spotin A, Chand B, Macpherson C, Hotez P, Gasser. (2020). Global prevalence of *Toxocara* infection in dogs. *Adv Parasitol* (109):561-583.

53. Ruiz R. (2011). Prueba crítica para la evaluación de un antiparasitario formulado a base de Fenbendazol, 15 mg, Pamoato de Pirantel 14.5 mg, Praciquantel 5 mg, Ivermectina 0.2 mg en perros con infestación natural por *Toxocara canis* y *Ancylostoma caninum* (tesis de licenciatura). México (Estado de México) México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México.
54. Schacher JF. (1957). A Contribution to the Life History and Larval Morphology of *Toxocara canis*. The Journal of Parasitology. Vol 43 (6): 599-612.
55. Schnieder T, Laabs E, Welz C. (2011). Larval development of *Toxocara canis* in dogs. Vet. Parasitol (175): 193-206.
56. Schwartz R, Bidaisee S, Fields P, Machpherson M, Machpherson C. (2022). The epidemiology and control of *Toxocara canis* in puppies. Parasite Epidemiology and Control. Vol 16, e00232.
57. Sowemimo OA, Lee YL, Asaolu SO, Chuang TW, Akinwale OP, Badejoko BO, Gyang VP, Nwafor T, Henry E, Fan CK. (2017). Seroepidemiological study and associated risk factors of *Toxocara canis* infection among preschool children in Osun State, Nigeria. Acta Trop. Sep;173:85-89.
58. Stoye M. (1976). [Galactogenic and prenatal *Toxocara canis* infections in dogs (Beagle). (Brief communication)]. Dtsch Tierarztl Wochenschr; 83(3):107-8.
59. Strube C, Heuer L, Janecek E. (2013). *Toxocara spp* infections in paratenic hosts. Vet Parasitol. 193(4):375-389.
60. Talluri MV, Paggi L, Precchia P, Dallai R. (1987). Fine Structure of Buccal Cavity and Esophagus in *Toxocara canis* (Nematoda, Ascarididae) Infective Larvae. Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research, Vol 97: 144-157.

61. Verstegen K, Verstegen J. (2008). Endocrinology of pregnancy in the dog: A review, *Theriogenology*, vol 70, Issue 3; pp: 291-299.
62. Warren EG (1968). *Toxocara* and *Neoscaris*: studies on morphology development and migratory behaviour, PhD Thesis, School of Veterinary Science, The University of Queensland.
63. Zamora I, López M. (2020). Interacción entre la hormona del crecimiento y el sistema glutamatérgico: Implicaciones para la plasticidad cerebral. Centro de Investigaciones Cerebrales, México. *Rev. Elec. Neurobiología*. Vol 11.